



**T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**IN VITRO ENFLAMASYON MODELİNDE
HİPERPOLARİZASYON İLE AKTİVE OLAN SIKLIK
NÜKLEOTİD KAPILI KANALLARIN MOLEKÜLER DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Yeşim CİVİL ÜRKMEZ
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

SAMSUN-2022



**T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**IN VITRO ENFLAMASYON MODELİNDE
HİPERPOLARİZASYON İLE AKTİVE OLAN SİKLİK
NÜKLEOTİD KAPILI KANALLARIN MOLEKÜLER DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Yeşim CİVİL ÜRKMEZ
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bahattin AVCI**

SAMSUN-2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimi hazırlama sürecinde desteğini esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsüyle yanımda çalışmaktan gurur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Bahattin AVCI'ya;

Asistanlık dönemim boyunca bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Nermin KILIÇ, Prof. Dr. Birşen BİLGİCİ, Doç. Dr. Özgür Korhan TUNÇEL'e;

Asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan, tanımaktan keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Dr. Dilek GÜL'e, Dr. Emil RZAYEV'e, Dr. Köksal ŞEREFLİ'ye, Dr. Betül ÖZÇAĞLAYAN'a, Dr. Mücahit KAYA'ya;

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Zülfinaz Betül ÇELİK'e ve Dr. Öğr. Üyesi Caner GÜNAYDIN'a;

Yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak beni destekleyen, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim kıymetli annem Hava CİVİL'e ve babam Adil CİVİL'e, abim Koray CİVİL ve eşi Gamze CİVİL'e, neşe kaynağım canım yeğenim Beril CİVİL'e;

Dürüstlüğü, çalışkanlığı ve azmine her daim hayran olduğum, en büyük destekçim ve yol gösterenim biricik hayat arkadaşım Sebati Sinan ÜRKMEZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Eylül / 2022

Yeşim CİVİL ÜRKMEZ

BEYAN

“In Vitro Enflamasyon Modelinde Hiperpolarizasyon ile Aktive Olan Siklik Nükleotid Kapılı Kanalların Moleküler Düzeyde Araştırılması” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim. Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (PYO.TIP.1904.21.017).

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda nöroenflamasyon ve nörodejenerasyonda ekspresyonlarının değiştiği bilinen hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid-kapılı (HCN) kanalların oluşturduğumuz enflamasyon modelinde makrofaj ile endotel hücre hatlarındaki ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: Çalışmamızda HUVEC ve RAW hücre hatları kullanıldı. Hücelere 1µg/ml Lipopolisakkarit (LPS) uygulandı. Altı saat sonra hücre vasatları alındı. TNF-α, IL-1, IL-2, IL-4, IL-10 konsantrasyonları ELISA yöntemiyle ölçüldü. LPS uygulaması sonrası hücre vasatları 24 saat boyunca hücelere çapraz olarak uygulandı. HCN1/HCN2 protein düzeyleri Western-Blot yöntemiyle belirlendi. HCN-1/HCN-2 gen ekspresyonları RT-qPCR yöntemiyle belirlendi.

Bulgular: Enflamasyon modelinde RAW hücre vasatında kontrole kıyasla TNF-α, IL-1 ve IL-2 seviyelerinde anlamlı artış gözlemlendi. IL-4 seviyesinde anlamlı fark görülmezken, IL-10 seviyesinde anlamlı azalma olduğu gözlemlendi. HUVEC hücre vasatında TNF-α düzeyinde anlamlı artış gözlenirken, diğer sitokinlerde fark gözlenmedi. Enflamasyon modelimizde HUVEC hücrelerinde HCN1 gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre 8,44 kat anlamlı artış gözlemlendi. HCN2 gen ekspresyonunda anlamlı değişim gözlenmedi. RAW hücrelerinde HCN1 gen ekspresyonunda kontrole göre 6,71 kat anlamlı artış gözlemlendi. HCN2 ekspresyonundaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi. Western-Blot analizinde HUVEC hücrelerinde LPS grubunda kontrole göre HCN1 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken; HCN2 düzeyinde anlamlı artış gözlenmedi. RAW hücrelerinde LPS grubunda kontrole göre HCN1 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken; HCN2 düzeyinde anlamlı artış gözlenmedi. İmmunfloresan incelemede HUVEC ve RAW hücrelerinde HCN1 ve HCN2 proteinlerinin hücre membranındaki ekspresyonunun LPS grubunda kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç: Enflamasyon modelinde RAW ve HUVEC hücrelerinde HCN1 gen/protein ekspresyonları artarken, HCN2 gen/protein ekspresyonlarında anlamlı değişiklik gözlenmedi. Elde ettiğimiz veriler endotel ve makrofajlarda HCN1 alt tipinin hakim olduğunu ve enflamasyonda kritik rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: HCN kanal proteini, enflamasyon, endotel, makrofaj

ABSTRACT

Aim: In our study, we aimed to create an inflammation model in endothelial and macrophage cell lines and to examine the changes in the expression of hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels at the molecular level.

Material and Method: HUVEC and RAW cell lines were used in our study. 1 µg/ml LPS was applied to the cells. Cell media were taken six hours later. TNF-α, IL-1, IL-2, IL-4, IL-10 concentrations were measured by ELISA method. Cell media were cross-applied to cells for 24 hours after LPS. HCN1/HCN2 protein levels were determined by Western-Blot method. HCN-1/HCN-2 gene expressions were determined by RT-qPCR method.

Results: In the inflammation model, a significant increase in TNF-α, IL-1 and IL-2 levels was observed in RAW cell media compared to the control. While no significant difference was observed in IL-4 level, a significant decrease was observed in IL-10 level. While a significant increase in TNF-α level was observed in HUVEC cell medium, no difference was observed in other cytokines. In our inflammation model, an 8,44 fold increase in HCN1 gene expression was observed in HUVEC cells compared to the control group. No significant change was observed in HCN2 gene expression. 6,71 fold increase in HCN1 gene expression was observed in RAW cells compared to the control. The change in HCN2 expression was not statistically significant. In the Western-Blot analysis, a statistically significant increase in HCN1 level was observed in the LPS group in HUVEC cells compared to the control; no significant increase in HCN2 level was observed. While a statistically significant increase in HCN1 level was observed in the LPS group in RAW cells compared to the control; no significant increase in HCN2 level was observed. In immunofluorescence examination, it was observed that the expression of HCN1 and HCN2 proteins in the cell membrane of HUVEC and RAW cells increased in the LPS group compared to the control group.

Discussion and Conclusion: While HCN1 gene/protein expressions were increased in RAW and HUVEC cells in the inflammation model, no significant change was observed in HCN2 gene/protein expressions. Our data suggest that the HCN1 subtype is dominant in endothelium and macrophages and may play a critical role in inflammation.

Keywords: HCN channel protein, inflammation, endothel, macrophage

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Teşekkür.....	i
Özgeçmiş.....	ii
Beyan.....	iii
Özet	iii
Abstract	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve kısaltmalar dizini.....	viii
Tablo ve şekiller dizini.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. HCN Kanallarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması.....	3
2.1.1. Transmembran segmentleri ve voltaj sensörü	5
2.1.2. Gözenek yapısı ve iyon seçicilik filtresi.....	5
2.1.3. C-Bağlayıcı ve siklik nükleotid bağlayıcı domain (CBND).....	6
2.2. HCN Kanal Tiplerinin Temel Biyofiziksel Özellikleri	8
2.2.1. Voltaj bağımlı aktivasyon.....	8
2.2.2. Aktivasyon kinetiği.....	9
2.2.3. cAMP ile düzenlenme.....	9
2.2.4. İkili kanal aktivasyon modeli.....	10
2.3. HCN Kanal Aktivasyonunun Yapısal Özellikleri	11
2.4. HCN Kanallarının Düzenlenmesi.....	12
2.4.1. PIP2 ile düzenlenme	12
2.4.2. Protonlar ile düzenlenme	13
2.4.3. Klorür ile düzenlenme	14
2.4.4. Tirozin kinaz, p38-MAP kinaz ile düzenlenme	14
2.4.5. İnteraktive proteinler ile düzenlenme	14
2.5. Doku Düzeyinde HCN Kanal Ekspresyonu	16
2.6. Kardiyak Ritmin Oluşumunda Ih Akımının Rolü	18
2.7. Ih Akımın Hastalıklarla İlişkisi	20
2.7.1. Kalıtsal kanalopatiler	21
2.7.2. Kazanılmış (transkripsiyonel) kanalopatiler.....	21
2.8. Kalp Hücrelerinde HCN Kanallarının Ekspresyonu	25
2.9. HCN Kanalları ve İnflamasyon	28
2.10. Sitokinler	29
3. MATERYAL VE METOT.....	34
3.1. Gereçler	34

3.1.1. Kullanılan malzemeler.....	34
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	35
3.2. Yöntemler.....	36
3.2.1. Hücre kültürü.....	36
3.2.2. Hücrelerin pasajlanması.....	36
3.2.3. Sitotoksosite testleri.....	37
3.2.4. Uygulanacak lipopolisakkaritin (LPS) hazırlanması,.....	38
3.2.5. Biyokimyasal Analizler.....	38
3.2.6. İmmünofloresans analizler.....	39
3.2.7. Total RNA izolasyon yöntemi.....	40
3.2.8. İzole edilen RNA'lerden cDNA elde edilmesi.....	42
3.2.9. Eş zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi.....	43
3.2.10. HCN1 ve HCN2 gen ifade düzeylerinin ölçümü.....	43
3.2.11. Total protein miktarının tayin edilmesi.....	45
3.2.12. Western Blot analizi.....	46
3.3. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Sitotoksosite Testlerinin Sonuçları.....	50
4.2. BCA Yöntemi ile Ölçülen Protein Konsantrasyonları.....	51
4.3. RNA İzolasyon Sonuçları.....	51
4.4. Kültür Vasatlarında ELISA Yöntemi ile Ölçülen Sitokin Seviyeleri.....	52
4.5. Western Blot Analizi Bulguları.....	53
4.6. PCR Analizi Bulguları.....	54
4.7. HCN1 ve HCN2 Ekspresyonunun İmmünofloresans Yöntem İle Gösterilmesi.....	55
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
7. KAYNAKLAR.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
APC	: Antijen sunan hücre
APS	: Amonyum persülfat
AT1	: Anjiyotensin 1
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albümini
CA1	: Cornu ammonis 1
CaM	: Kalmodulin
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
cDNA	: Komplementer deoksiribo nükleik asit
CFA	: Freund's Complete Adjuvant
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CHO	: Chinese hamster ovary
CNBD	: Siklik nükleotid bağlama alanı
CNG	: Siklik nükleotid kapılı
CO ₂	: Karbondioksit
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CT	: Cycle treshold
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
dNTP	: Deoksinükleozidtrifosfat
dPBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
DRG	: Dorsal kök ganglionu
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asid
ELISA	: Enzim-linked immunosorbent assay
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
F12	: Ham's F12 medium
FBS	: Fetal sığır serumu
FRET	: Floresan rezonans enerji transferi
GAPDH	: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GYG	: Glisin-tirozin-glisin
HCN	: Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid-kapılı
HEK293	: Human embryonic kidney cells
hERG	: Human ether-a-go-go related gene
HRP	: Horseradish peroksidaz
HUVEC	: İnsan umblikal ven endotel hücreleri
ICaL	: L tipi kalsiyum kanal akımı
ICaT	: T tipi kalsiyum kanal akımı
If	: Funny akım
IFN- γ	: İnterferon gama
Ih	: Hiperpolarizasyon ile aktive olan akım
IKr	: Hızlı potasyum akımı
IKs	: Yavaş potasyum akımı
IL-1	: İnterlökin-1
IL-10	: İnterlökin-10
IL-2	: İnterlökin-2

IL4	: İnterlökin-4
IP3	: İnositol trifosfat
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
KCR1	: Potassium Channel Regulator Protein
Kv kanalları	: Voltaj kapılı potasyum kanalları
Kir2.1	: İçeri doğrultucu K kanalları
LBP	: LPS bağlayıcı protein
LPS	: Lipopolisakkarit
MAP	: Mitojen aktive edici protein
MAPK	: Mitogen-Aktive Protein Kinaz
MDP	: Maksimum diyastolik potansiyel
MinK	: Misshapen-like kinase 1
miR-1	: MicroRNA-1
miR-133	: MicroRNA 133
MiRP1	: MinK ile ilişkili protein
MODS	: Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür
mV	: Milivolt
MyD88	: Myeloid differentiation primary response 88
NF-κB	: Nuklear Factor Kappa-B
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PGE2	: Prostaglandin E2
pH	: Power of hidrogen
pHe	: Hücre dışı pH
pHi	: Hücre içi pH
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfat
PVDF	: Poliviniliden florür
RAW 264.7	: Fare makrofaj hücreleri
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay buffer
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SIRS	: Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu
TBS-T	: Tris tamponlu Salin-tween
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TIR	: Toll-interlökin reseptör-1
TLR	: Tool like reseptör
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör- α
TRIP8b	: TPR içeren Rab8b etkileşimli protein
V _{0.5}	: Yarı maksimum aktivasyon voltajı
ZD7288	: 4-(N-etil-N-fenilamino)-1,2-dimetil-6-(metil-amino) pirimidinyum klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.	HCN kanalının yapısı 2
Şekil 2.	HCN kanallarının transmembran domainleri ve voltaj segmenti..... 4
Şekil 3.	CNBD ve C bağlayıcı bölgenin detaylı gösterimi..... 7
Şekil 4.	HCN2 kanal aktivitesinin cAMP ile değişimi..... 10
Şekil 5.	HUVEC hücrelerinin pasajlama öncesi ve kaldırıldıktan sonra 10X büyütmedeki görüntüsü 32
Şekil 6.	PCR reaksiyonu sonrası elde edilen temsili amplifikasyon grafiği..... 40
Şekil 7.	Jel dökme standına jellerin yerleştirilmesi (A). Numune yüklemesi yapılmış jellerin elektroforez tankına yüklenip elektrik alana maruz bırakılması (B)..... 43
Şekil 8.	LPS'in artan konsantrasyonlarının RAW hücrelerinin canlılığına etkisi 46
Şekil 9.	LPS'in artan konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinin canlılığına etkisi 46
Şekil 10.	BCA yönteminde elde edilen standart konsantrasyon/absorbans grafiği... 47
Şekil 11.	İzole edilen RNA miktarlarının nanodrop cihazıyla ölçümü 48
Şekil 12.	RAW ve HUVEC hücre hatlarının kültür vasatında kontrol ve LPS grupları arasındaki sitokin seviyelerinin kıyaslaması 49
Şekil 13.	HUVEC ve RAW hücrelerinde HCN1 ve HCN2 protein ekspresyonlarının kontrol ve LPS grupları arasındaki kıyaslaması..... 50
Şekil 14.	HUVEC ve RAW hücrelerinin kontrol ve LPS gruplarında HCN1 ve HCN2 protein ekspresyonlarının Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.... 50
Şekil 15.	HUVEC ve RAW hücrelerinde HCN1 ve HCN2 gen ekspresyonlarının kontrol ve LPS grupları arasındaki kıyaslaması..... 51
Şekil 16.	HUVEC ve RAW hücrelerinde LPS ve kontrol grubunun HCN1 antikoru için floresans yoğunluğunun gösterilmesi..... 52
Şekil 17.	HUVEC ve RAW hücrelerinde LPS ve kontrol grubunun HCN2 antikoru... için floresans yoğunluğunun gösterilmesi..... 52
Şekil 18.	Makrofaj polarizasyonu..... 54
Şekil 19.	TLR4 reseptörleri aracılığıyla LPS tanınması..... 55

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. HCN kanal alttipleri ve özelliklerinin karşılaştırılması.....	17
Tablo 2. Proinflamatuvar ve Antiinflamatuvar Sitokinler.....	31
Tablo 3. cDNA sentezi için kullanılan ters transkripsiyon PCR reaksiyon karışımı	40
Tablo 4. Ters transkripsiyon PCR programı.....	41
Tablo 5. qRT-PCR reaksiyon karışımı	43
Tablo 6. Gen ekspresyon düzeylerinin tayin edildiği RT-PCR programı	43
Tablo 7. %10'luk ayırma jelinin İçeriği	45
Tablo 8. %5'lik yükleme jelinin İçeriği	45



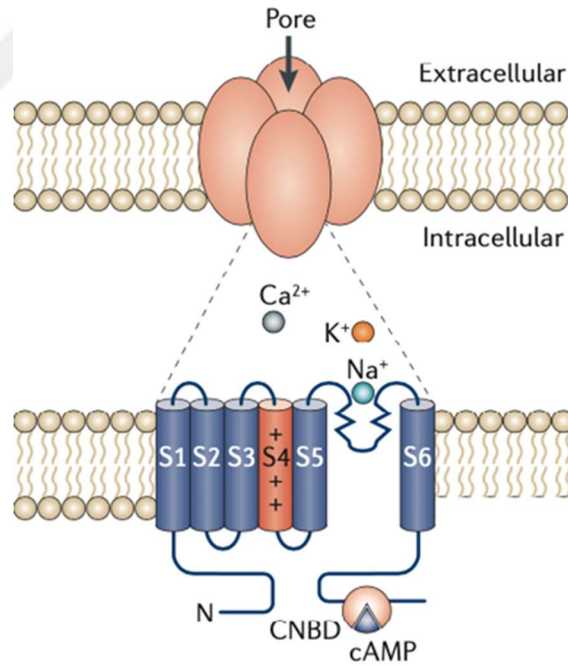
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid-kapılı (HCN) kanallar, kalp ve beyin hücrelerinin plazma zarlarında seçici olmayan voltaj kapılı katyon kanalları olarak görev yapan integral membran proteinleridir. HCN kanalları, kalp ve beyin hücre grupları içinde ritmik aktivite oluşturmaya yardımcı oldukları için pacemaker kanalları olarak da adlandırılırlar. HCN kanallarından geçen akım, kardiyak ve nöronal ritmikliğin kontrolünde anahtar bir rol oynar ve pacemaker akımı, If “funny akım” veya Ih “hiperpolarizasyon ile aktive olan akım” olarak adlandırılır. Hücre membran akımlarının büyük çoğunluğunun aksine, Ih depolarizasyondan ziyade membran hiperpolarizasyonu ile aktive edilir. Ayrıca, Ih'nin aktivasyonu doğrudan protein kinaz A'dan yani fosforilasyondan bağımsız bir tarzda siklik adenozin monofosfat (cAMP) tarafından kolaylaştırılır. Ih pacemaker aktivite yanı sıra istirahat membran potansiyelinin sağlanması, dendritik entegrasyon, sinaptik iletim ve öğrenme de dahil olmak üzere pek çok nörolojik işlevlerde de görev alır. Daha önce yapılan pek çok çalışmada özellikle nöronal sinir hasarında ve enflamasyonda HCN kanallarının farklı ekspresyon düzeylerine sahip oldukları gösterilmiştir. Literatürde kardiyovasküler hasarın olduğu bir durumda HCN kanallarının ekspresyon düzeyleri ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Epilepsi gibi bozulmuş nöronal aktivite ile ilgili hastalıkların tedavisinin aydınlatılmasında oldukça önemli bir hedef olan HCN kanalları, sepsis başta olmak üzere kardiyovasküler enflamasyonun ve çağımızın en önemli mortalite ve morbidite sebebi olan kardiyovasküler hasarın tedavisinde de önemli bir hedef olabilir. Kardiyovasküler ve serebrovasküler hasarın etyopatogenezinde temel rol oynayan aterosklerozun endotelial enflamasyon ile başladığı ve devam eden bu kronik endotel enflamasyonunun tedavi edilmediği takdirde stabil anjinadan anstabil anjinaya ve ani kardiyak ölüme kadar gidebilen klinik tablolara yol açtığı bilinmektedir. Çalışmamızda kardiyovasküler hasar, enflamasyon ve sepsis modelini temsil etmek üzere endotelial enflamasyon oluşturmayı ve bu sürecin en önemli iki hücresi olan makrofaj ve endotel hücrelerindeki HCN kanallarının ekspresyon düzeyinin ne şekilde etkileneceğini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı (HCN) kanallar, voltaj kapılı K^+ kanallarının altı transmembran domainli üst ailesine aittir ve yaklaşık 16 yıl önce keşfedilmiştir (1). HCN kanalları omurgalılardan ve birkaç omurgasızdan klonlanmıştır ancak maya ve prokaryotlarda bulunmamaktadır (2).

HCN kanallarının çekirdek birimi, diğer birçok gözenek içeren kanalinkine benzer bir mimariye sahiptir. Merkezi olarak yerleştirilmiş gözenek etrafında düzenlenmiş dört alt birimden oluşur. Her bir HCN kanalı alt birimi, iki ana yapısal modülden, transmembran çekirdekten ve sitozolik C-terminal alanından oluşur (Şekil1). Memelilerde dört homolog HCN kanal alt birimi (HCN1–4) mevcuttur. Bu dört farklı izoform kalp ve beyin dokularında farklı şekilde eksprese edilirler (3). Bu alt birimler, farklı biyofiziksel özelliklere sahip dört farklı homotetramer oluştururlar. Potansiyel HCN kanal tiplerinin sayısının in vivo olarak heterotetramerlerin oluşumuyla arttığına dair kanıtlar mevcuttur (4, 5).



Şekil 1. HCN1 kanalının yapısı (6)

HCN2 beyindeki ana izoformdur, HCN4 ise esas olarak kalbin sinoatriyal nodunda bulunur (7). HCN kanalları, nöronal ve kardiyak ateşleme hızının düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Hem kalp hem de beyindeki If ve Ih akımları için “pacemaker”

kanalı olarak işlev görürler (8, 9). Pacemaker işlevinin yanı sıra HCN kanalları, istirahat membran potansiyelinin belirlenmesi, sinaptik iletim, dendritik entegrasyon ve öğrenme dahil olmak üzere çeşitli faaliyetlerde de yer alırlar (10, 11). Bu kanallar, membran hiperpolarizasyonu ve siklik nükleotitlerin ağırlıklı olarak cAMP ve cGMP (siklik guanozin monofosfat) bağlanmasıyla düzenlenen ikili mekanizma ile aktive edilirler (12, 13). HCN kanalları tarafından üretilen akımlar, membran hiperpolarizasyonunu sigmoidal aktivasyon kinetiğinin takip ettiği karakteristik profillere sahiptir (6). HCN1 aktivasyonu hızlı kinetik gösterir; bunu HCN2, HCN3 ve ardından HCN4 takip eder (14). Ayrıca HCN1 kanalları, HCN2 ve HCN4'e kıyasla daha pozitif potansiyellerde aktive olur (15).

2.1. HCN Kanallarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması

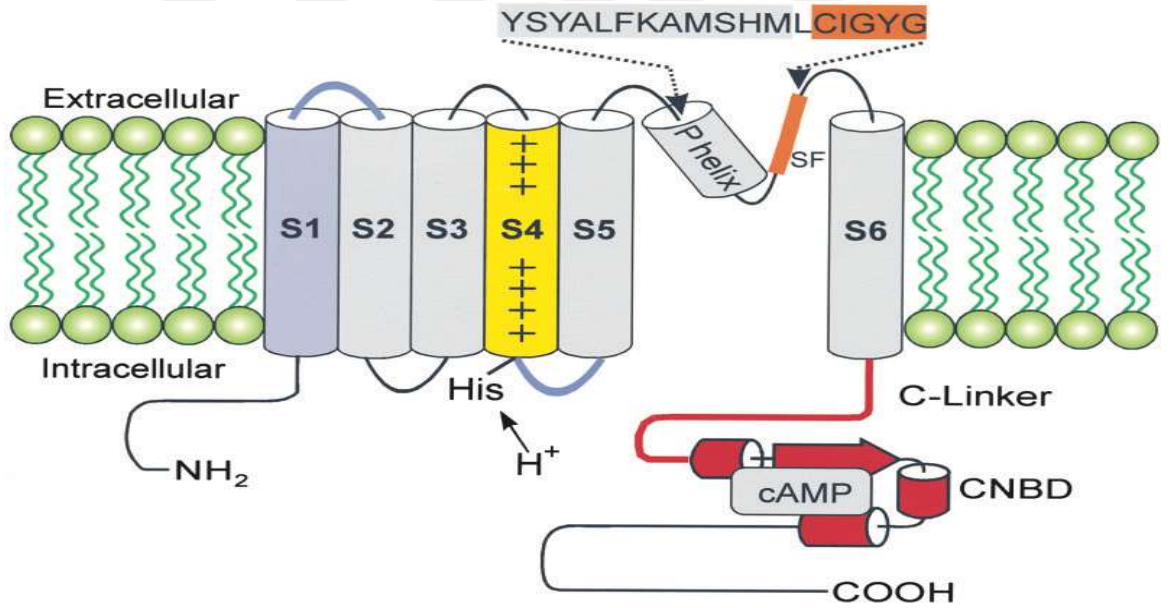
If kanallarını kodlayan birkaç komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) moleküler klonlama ile izole edilmiştir (12, 16). Bu kanallar ikili aktivasyon modeline uygun olarak “hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı katyon (HCN) kanalları” olarak adlandırılmışlardır. Omurgalılarda HCN kanal ailesi dört üyeden (HCN1–4) oluşur. HCN3 kanalı spesifik olarak nöronlarda eksprese edilse de, diğer üç kanalın (HCN1, 2 ve 4) da kalp ve beyinde eksprese edildiği tespit edilmiştir (17). Hidropati analizi ve dizi karşılaştırması, HCN kanallarını voltaj kapılı katyon kanallarının üst ailesinin üyeleri olarak sınıflandırır. Kanallar, K kanallarıyla (18) ve siklik nükleotid kapılı (CNG) kanal sınıfıyla uzaktan ilişkilidir ve bu kanallarla yaklaşık %20–25 dizi özdeşliğine sahiptir (19).

Her bir HCN kanalı alt birimi, iki ana yapısal modülden; altı transmembran segmentinden (S1-S6) oluşan çekirdekten bölge ve C linker ve siklik nükleotid bağlama alanı (CNBD) içeren sitozolik C terminal bölgeden oluşur (Şekil 2). Transmembran çekirdek, geçiş kapısını ve iyon ileten gözeneği içerir, sitozolik C-terminal alanı, siklik nükleotitler tarafından modülasyonu sağlar. Her iki modül de kanal aktivasyonu sırasında birbirleriyle allosterik olarak iş birliği yapar. Voltaj kapılı katyon kanallarının üst ailesinin diğer üyelerine benzer şekilde, HCN kanalları tetramerik kompleksler halinde birleşirler.

HCN kanalları, pozitif yüklü voltaj algılayıcı S4 segmenti ve S5 ile S6 segmentleri arasındaki iyon iletici bir gözeneğe sahip olan altı transmembranöz sarmal (S1–S6)

içerir. C terminalinde CNBD taşır. Bu alan cAMP ve cGMP ile aktifleştirilmiş protein kinazlar (20), cAMP guanin nükleotid değişim faktörü (21) ve CNG (19) kanalları dahil olmak üzere diğer birçok siklik nükleotid bağlayıcı proteinin CNBD'si ile önemli bir sekans benzerliğine sahiptir. Kanalın voltaj sensörü, her üç konumda bir düzenli aralıklarla 9 arginin veya lizin tortusu içeren pozitif yüklü S4 sarmalı tarafından oluşturulmuştur. Kanalların pH duyarlılığı S4-S5 segmenti arasındaki bir histidin kalıntısı ile sağlanmaktadır. HCN kanallarının gözenekleri bir sarmal kısım (P heliks) ve iyon geçirgenliğini kontrol eden bir seçicilik filtresi (SF) içerir (Şekil 2). Burada gösterilen dizi HCN1 ve HCN4'e karşılık gelmektedir, HCN2 ve HCN3 dizilerinden yalnızca bir konumda farklılık göstermektedir (22).

Kanalların S1 sarmalından CNBD'nin C terminaline uzanan çekirdek bölgesi, HCN kanal ailesi içinde yüksek oranda korunur. Buna karşılık, kanalların N ve C terminal uçlarının uzunlukları önemli ölçüde değişir ve bu bölgelerde yalnızca küçük bir dizi homoloji gösterir. Sitosolik N terminalinin işlevi henüz bilinmemektedir.



Şekil 2. HCN kanallarının transmembran domainleri ve voltaj segmenti (22).

2.1.1. Transmembran segmentleri ve voltaj sensörü

HCN kanalları altı alfa helikal segment ve S5 ile S6 arasında iyon ileten bir gözenek halkasından oluşan transmembran kanal çekirdeğine sahiptir. S5 ile gözenek bölgesi arasında bulunan ekstrasellüler halkada, yüksek oranda korunmuş bir asparajin kalıntısı glikozilasyona uğramıştır. Bu posttranslasyonel kanal modifikasyonunun normal hücre yüzeyi ekspresyonu için çok önemli olduğu gösterilmiştir (4). HCN kanallarının voltaj sensörü, düzenli aralıklarla yerleştirilmiş dokuz arjinin veya lizin rezidüsü taşıyan pozitif yüklü bir S4 sarmalından oluşur (23, 24). Pore-loop katyon kanalı süper ailesinin voltaja bağlı tüm üyelerinde pozitif yüklü S4 segmenti bulunur (25). Bununla birlikte, S4 yüklerinin hücre zarı düzlemi boyunca içe doğru hareketi, voltaj kapılı potasyum kanalları (Kv kanalları) gibi depolarizasyonla aktive olan kanalların kapanmasını tetiklerken HCN kanallarının açılmasına yol açar (26). HCN kanallarının ve depolarizasyonla aktive olan kanalların geçiş mekanizmasındaki bu farklı polarite mekanizmasının altında yatan moleküler belirleyiciler henüz belirlenmemiştir. Bununla birlikte, S4'ü S5 segmentine bağlayan spiralın, farklı voltajlarda farklı yanıt oluşmasında çok önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar vardır (27, 28).

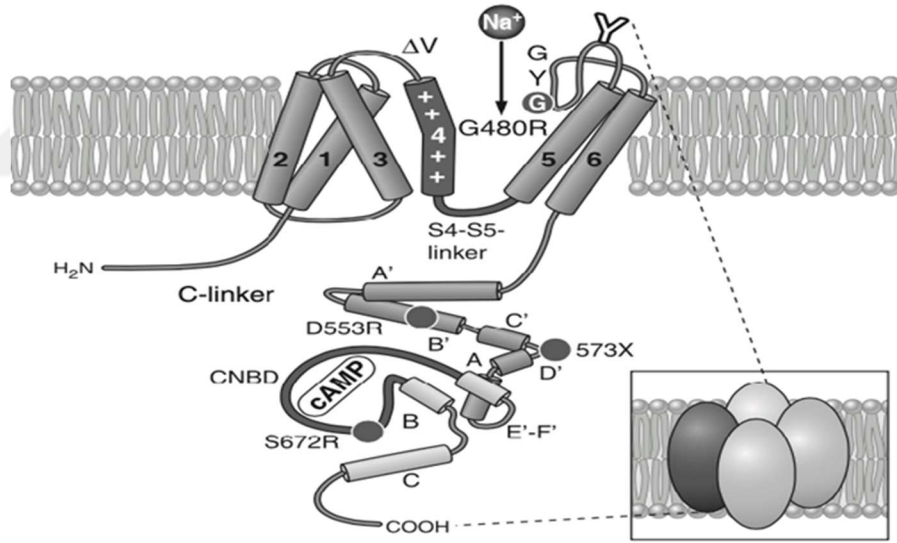
2.1.2. Gözenek yapısı ve iyon seçicilik filtresi

HCN kanalları Na^+ ve K^+ u yaklaşık 1:4 geçirgenlik oranlarıyla iletir ve milimolar Sezyum (Cs^+) konsantrasyonları tarafından bloke edilir (29). K^+ iletkenliğine yönelik bu tercihe rağmen, HCN kanalları fizyolojik koşullar altında içe doğru Na^+ akımı taşır. HCN kanalları aynı zamanda Ca^{2+} için de küçük bir geçirgenlik gösteriyor gibi görünmektedir (30). 2,5 mM Ca^{2+} konsantrasyonunda, HCN2 ve HCN4'ün fraksiyonel Ca^{2+} akımı yaklaşık %0,5'tir. HCN kanalları yoluyla Ca^{2+} girişinin işlevsel önemi şu anda net değildir. Şaşırtıcı bir şekilde, HCN kanal gözenek heliksini sekansı, oldukça seçici K^+ kanallarının sekansı ile oldukça benzerdir (25). Özellikle, HCN kanalları fizyolojik koşullar altında Na^+ iletmesine rağmen, K^+ kanallarında bulunan ve K^+ iyonları için seçicilik filtresini oluşturan bir Glisin-Tirozin-Glisin (GYG) motifi de içerirler. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bu yapısal karmaşıklığı aydınlatacak bir veri elde edilememiştir. Bununla birlikte, tetramerik HCN kanal kompleksinde GYG motifinin, farklı büyüklükteki katyonların girişine izin verecek şekilde, K^+ kanallarından daha az rijit bir şekilde koordine edildiği tahmin edilmektedir.

2.1.3. C-Bağlayıcı ve siklik nükleotid bağlayıcı domain (CBND)

HCN kanallarının cAMP'ye duyarlılığına sitozolik C-terminalinin proksimal kısmı aracılık etmektedir (31). Kanalin bu kısmı, yaklaşık 120 amino asitten oluşan bir CNBD ve CNBD'yi kanal çekirdeğinin S6 segmentine bağlayan 80 amino asit uzunluğunda bir C-bağlayıcı bölge içerir. cAMP'nin CNBD'ye bağlanması, kanal açılmasını hızlandırır ve aktivasyonun voltaj bağımlılığını daha pozitif voltajlara kaydırır (13). Bu nedenle, belirli bir voltajda HCN kanallarından akan akım, cAMP'nin varlığında yokluğundan daha büyüktür. Birkaç çalışma, cAMP'nin, C-bağlayıcı bölge-CNBD tarafından oluşturulan tonik kanal inhibisyonunu ortadan kaldırarak kanal aktivitesini arttırdığını öne sürmüştür (32, 33). HCN2'nin C-bağlayıcı-CNBD bölgesinin kristal yapısının belirlenmesi, cAMP'ye bağlı kanal modülasyonunun moleküler belirleyicileri hakkında önemli bilgiler sağlamıştır (31). CNBD, ilk olarak alfa sarmalı (A helix), ardından 8 sıkışık antiparalel b rulosu (b1- b8), kısa bir B sarmalı ve uzun bir C sarmalından oluşan yüksek oranda korunmuş bir kıvrım gösterir. C-bağlayıcı domain, 6 alfa-heliksinden (A-F) oluşur (Şekil 3). Dört C-bağlayıcı-CNBD kompleksi, gözenek halkası kanallarının tetramerik mimarisi ile uyumlu olan 4 katlı simetrik eksene sahip bir komplekse monte edilir. Tetramerdeki alt birim-alt birim etkileşimlerinin çoğuna C-bağlayıcıdaki amino asit kalıntıları aracılık eder. cAMP için bağlama cebi, b-roll ile C-sarmal arasındaki arayüzde bir dizi kalıntı tarafından oluşturulur (34, 35). HCN2'nin bağlanma cebinde 7 amino asitlik bir grup ligand ile etkileşime girer (34). Bu kalıntıların üçü b-roll'de (R591, T592 ve E582) ve dördü C-sarmalında (R632, R635, I636 ve K638) bulunur. Bunlar arasında, C-sarmalında, siklik nükleotidlerin kanal açılmasını arttırmasının etkinliğini kontrol eden sadece bir rezidü (R632) tanımlanmıştır (34). C-sarmalındaki 4 kalıntı (R632, R635, I636 ve K638) HCN2 kanallarının cAMP için cGMP'ye göre daha yüksek seçicilik sağlamasına katkıda bulunur (34). Ancak, bu kalıntıların cAMP seçiciliğini nasıl oluşturduğu açık değildir. cAMP seçiciliğinin protein etkileşimlerinden kaynaklanmadığı, bunun yerine cGMP'nin cAMP'ye göre daha büyük hidrasyon enerjisine sahip olduğu öne sürülmüştür. Bu, cGMP'nin kanala bağlanmasının daha yüksek bir enerji maliyeti ile sonuçlanabildiğini göstermektedir (36). Literatürde cAMP bağlanmasını kanal açılmasıyla birleştiren allosterik sürecin dinamikleri hakkında oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bir modele göre, cAMP'nin yokluğunda

C-bağlayıcı domainin kanal açılması üzerinde engelleyici bir etki üreten kompakt bir konformasyonda olduğu düşünülmektedir (37). cAMP'nin bağlanması, C-sarmalını içeren CNBD'de konformasyonel bir değişikliğe neden olur. C-sarmalındaki konformasyonel değişiklik daha sonra daha gevşek bir konformasyona sahip C-bağlayıcı ile etkileşir ve bu da komşu alt birimlerin heliksleri arasındaki arayüzde bazı değişikliklere yol açar. Kuaterner konformasyonda ortaya çıkan bu değişiklikler, C-terminalinin inhibisyonunu ortadan kaldırır, kapalı durumu destabilize eder, böylece kanalın açılmasını teşvik eder. Tanımlanan aktivasyon sürecinin C-bağlayıcı-CNBD'deki subdomainlerin translokasyonu ile birlikte oluşması beklenebilir. Ancak son veriler, durumun böyle olamayabileceğini göstermektedir. HCN kanallarının yakın bir akrabası olan CNG bir kanalda floresan rezonans enerji transferi (FRET) ölçümleri, C-bağlayıcı içindeki hareketlerin muhtemelen çok minimal olduğunu ve sadece çok kısıtlı yeniden düzenlemeler içerdiğini ileri sürmektedir (38).



Şekil 3. CNBD ve C bağlayıcı bölgenin detaylı gösterimi. CNBD, ilk olarak alfa sarmalı (A helix), ardından sekiz sıkışık antiparalel b rulosu (b1- b8), kısa bir B sarmalı ve uzun bir C sarmalından oluşan yüksek oranda korunmuş bir kıvrım gösterir. C-bağlayıcı domain, altı alfa-heliksinden (A-F) oluşur (10).

2.2. HCN Kanal Tiplerinin Temel Biyofiziksel Özellikleri

HCN kanallarının olağandışı biyofiziksel profili, dört ayırt edici özellik ile özetlenebilir: hiperpolarizasyon tarafından indüklenen kanal aktivasyonu, cAMP ile doğrudan etkileşim yoluyla aktivasyonun kolaylaştırılması, hem Na⁺ hem de K⁺ geçirgenliği ve ekstrasellüler Cs⁺'un milimolar konsantrasyonları tarafından inhibisyon (6, 10). Doğal I_h, karakteristik sigmoidal bir zaman sürecinde hiperpolarizasyon ile aktive olan cAMP ile modüle edilmiş karışık bir Na⁺/K⁺ akımıdır. Diğer voltaj kapılı akımların çoğundan farklı olarak I_h, voltaja bağlı bir şekilde inaktive olmaz. Xenopus oositleri veya Human embryonic kidney cells (HEK293) hücreleri gibi heterolog sistemlerde HCN1-4'ün cDNA'larının ekspresyonu indüklendiğinde, I_f'nin membran hiperpolarizasyonu üzerine aktivasyon, Na⁺ ve K⁺ iyonlarının iletimi, siklik nükleotidler tarafından zenginleştirilme ve hücre dışı Cs⁺ tarafından blokaj gibi ayırt edici özelliklerini sergilemiştir (14, 17, 39, 40). İyon seçiciliği ve farmakolojik profiller, HCN kanal ailesi içinde oldukça benzer olsa da alt tiplerin aktivasyon kinetiğinde ve voltaj bağımlılığında, ayrıca cAMP ile modülasyonun boyutunda önemli değişkenlikler gözlenir. Dört HCN kanal tipinin tümü (HCN1 – 4), doğal I_h'nin temel biyofiziksel özelliklerini gösterir, ancak voltaj bağımlılıkları, aktivasyon zaman sabitleri (τ) ve cAMP'ye bağlı modülasyonun kapsamı bakımından birbirinden farklıdırlar.

Doğal ve klonlanmış I_f kanalları, karakteristik bir sigmoidal zaman süreci ile aktive olurlar. Akım ilk gecikme fazı hariç genellikle tek veya çift üslü fonksiyonlarla donatılmıştır (29). Kanal aktivasyonunun zaman sabiti membran potansiyeli, iyonik ortam, uyarı süresi, cAMP konsantrasyonu, pH veya sıcaklık gibi deneysel parametrelerden güçlü bir şekilde etkilenir. Bu içsel duyarlılık, farklı laboratuvarlarda aynı kanallar için elde edilen geniş τ değerleri aralığını açıklayabilir. Bununla birlikte, HCN kanal türleri, ilgili aktivasyon kinetiklerine göre sınıflandırılabilir.

2.2.1. Voltaj bağımlı aktivasyon

Voltaja bağlı aktivasyon, HCN kanal alt tipleri arasında nicel olarak farklılıklar gösterir. Yarı maksimum aktivasyon voltajları [midpoint potansiyeli (V_{0.5}) olarak adlandırılır] için tipik değerler HCN1, HCN2, HCN3 ve HCN4 için sırasıyla -70 mV, -95 mV, -77 mV ila -95 mV ve -100 mV'dir (41-43). Çeşitli koşullar, farklı

laboratuvarlar tarafından gözlemlenen geniş bir $V_{0.5}$ aralığına yol açarak bu değerleri önemli ölçüde değiştirebilir (44).

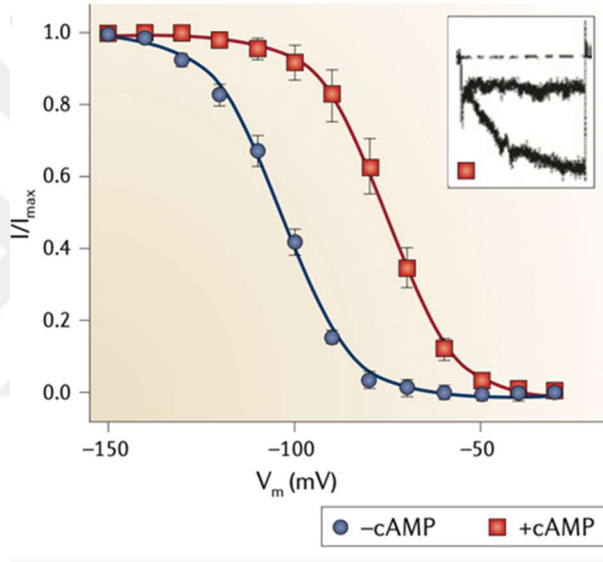
2.2.2. Aktivasyon kinetiği

Voltaja bağlı aktivasyon kinetiği, HCN kanal alt tipleri arasında da farklılık gösterir. Örneğin, murin HCN2 kanalı için -73 mV (23), -91 mV (45) ve -103 mV'lik (12) yarı maksimum aktivasyon voltajları rapor edilmiştir. t değerleri durumunda olduğu gibi, bu değişkenlik büyük olasılıkla akımların deneysel koşullara bağlı hassasiyetini yansıtır. Özellikle hiperpolarize edici voltaj darbesinin uzunluğunun $V_{0.5}$ 'in belirlenmesine önemli ölçüde müdahale ettiği gösterilmiştir (46). Bahsedilen sınırlamalar nedeniyle, HCN kanal ailesi içinde ayrıca klonlanmış ve doğal kanallar arasında geçerli bir $V_{0.5}$ karşılaştırması, ancak akımlar aynı koşullar altında ölçüldüğünde mümkün olacaktır. HCN1 en hızlı kanaldır (voltaja bağlı olarak $25 - 300$ ms t aralığı) (39, 46) HCN4 ise en yavaş kanaldır. Güçlü hiperpolarize edici voltajlarda (-140 mV) birkaç yüz milisaniye, normal dinlenme potansiyelinde (-70 mV) ise birkaç saniye civarında t değerlerine sahiptir. HCN2 ve HCN3, HCN1 ve HCN4 arasında kinetik aktivasyon gösterir (42, 47, 48).

2.2.3. cAMP ile düzenlenme

Dört HCN kanalının tümü yüksek oranda korunmuş bir C-bağlayıcı-CNBD taşımasına rağmen, bunlar cAMP tarafından niceliksel olarak farklı şekilde modüle edilirler. cAMP, aktivasyon kinetiklerini voltaja bağlı bir şekilde hızlandırarak ve $V_{0.5}$ 'i daha pozitif voltajlara kaydırarak doğal ve klonlanmış If kanallarının aktivitesini artırır. cAMP, HCN kanal aktivasyon eğrisini daha pozitif membran potansiyellerine kaydırır (Şekil 4). Böylece kanal aktivitesi, adenilat siklazı aktive eden norepinefrin gibi nörotransmitterler tarafından artırılırken, cAMP sentezini inhibe eden asetilkolin gibi maddeler tarafından azaltılır. Köpek purkinje lifleri (49) ve embriyonik kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerle (50) yapılan çalışmalar, cAMP'nin cAMP'ye bağlı protein kinaz A aracılı fosforilasyon yoluyla da If'yi uyarabileceğini göstermektedir. Modülatör etkinin K_a değerleri, fizyolojik cAMP konsantrasyonları aralığındadır ($K_a=60-500$ nM aralığı) (12, 33). HCN kanalları cGMP'ye de duyarlıdır (13). Bununla birlikte, cAMP ile karşılaştırıldığında, aynı $V_{0.5}$ kaymasını indüklemek için yaklaşık 10 ila 100 kat daha yüksek cGMP konsantrasyonları gerekir (HCN2 kanalı için $K_a = 6$

μM) (12). HCN2 ve HCN4, siklik nükleotitlere tepkileri bakımından HCN1'den oldukça farklıdır. cAMP, HCN2 ve HCN4'ün $V_{0.5}$ 'ini belirgin olarak değiştirirken (yaklaşık +15 mV kayma), HCN1 üzerinde zayıf bir etki gösterir (0mV'den 7mV'ye kayma) (45, 51). Benzer şekilde cAMP, HCN2 ve HCN4 kanallarını büyük ölçüde hızlandırırken; HCN1'in kinetiği üzerinde çok az etkiye sahiptir. cAMP, HCN2 ve HCN4'ün aktivasyon eğrilerini yaklaşık 10 mV ila 25 mV kaydırır ve açılma kinetiğini hızlandırır (41, 47, 52). HCN2 için K_a değerinin cAMP için 0,5 μM ve cGMP için 6 μM olduğu bildirilmiştir (12). Buna karşılık, HCN1 ve HCN3, cAMP'den yalnızca zayıf bir şekilde etkilenir (32, 33, 42).



Şekil 4. HCN2 kanal aktivitesinin cAMP ile değişimi. Grafik, 10 μM cAMP'nin yokluğunda veya varlığında hiperpolarizasyonla aktive edilen HCN2 aktivasyonunun voltaja bağımlılığını göstermektedir. cAMP, aktivasyon eğrisinde pozitif bir kaymaya neden olur (6).

2.2.4. İkili kanal aktivasyon modeli

HCN kanallarının voltaj bağımlı ve siklik nükleotit aracılı ikili aktivasyonu, siklik allosterik bir model tarafından tanımlanmıştır (53, 54). Bu modele göre, tetramerik kanalın dört alt biriminin her biri voltaj tarafından bağımsız olarak geçiş aktivitesini gerçekleştirmektedir. Tek bir voltaj sensörünün etkin duruma geçtiği her seferde kanalın açılma olasılığı artar. Açma/kapama reaksiyonları allosterik olarak meydana gelir ve dört alt birimin hepsinin birlikte uyumlu aktivasyonu ile transport gerçekleşir.

cAMP'nin açık kanallara kapalı kanallara göre daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğu varsayılmaktadır (53-55).

2.3. HCN Kanal Aktivasyonunun Yapısal Özellikleri

HCN kanalları voltaj kapılı katyon kanalları ailesi içinde olup, kanal aktivitesinin depolarizasyon yerine membran hiperpolarizasyonuna bağımlı olması ve cAMP ile modüle olması gibi benzersiz özelliklere sahip olmasıyla diğer kanallardan ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu karmaşık aktivasyon sürecinin altında yatan mekanizmalar hakkında aydınlatıcı veriler elde edilmiştir. C terminalinden komplet olarak yoksun olacak şekilde kesik bir HCN1 kanalı hala membran hiperpolarizasyonu ile aktive edilirken, cAMP'nin bu kanal üzerinde etkisi kalmadığı gözlenmiştir (32). Bu bulgu, HCN kanallarının esasen modüler bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Transmembran bölgesi voltaj algılayan S4 segmenti, kanal girişi ve gözenek dahil olmak üzere kanalın ana çekirdeğini oluşturur (23, 24). C terminali, voltaja bağımlı geçişi etkileyen ancak geçiş aktivasyonu için başlı başına gerekli olmayan modülatör bir etki alanı olarak işlev görür. Şimdiye kadar, HCN kanallarının sitoplazmik N terminallerinin kanal aktivasyonunda önemli rolü olduğuna dair bir kanıt yoktur (33, 56).

S4 ve S4-S5 bağlayıcısının yanı sıra diğer HCN kanal alanları da aktivasyon sürecinde yer alır. HCN1/HCN4 aktivasyon kinetiğini araştıran bir çalışmada, ilk transmembran segmentinin (S1) ve hücre dışı S1-S2 bağlayıcısının kanal açılma hızını kontrol eden major belirleyiciler olduğu gösterilmiştir (57). HCN kanallarının voltaj kontrollü aktivasyon kapısının moleküler kimliği henüz belirlenmemiştir. Son zamanlarda yapılan iki çalışma, voltaj kapılı K kanallarına benzer şekilde geçidin S6 segmentinin C terminal ucunda lokalize olan amino asit kalıntıları tarafından oluşturulabileceğini ve dolayısıyla kanalın hücre içi ağzında bulunabileceğini göstermektedir (58, 59).

Bir dizi delesyon mutantının ve HCN1/HCN2 kanallarının sistematik analizine dayanarak yapılan bir çalışmada cAMP'nin etkisini açıklamak için bir model önerilmiştir (32, 33). Bu modelde, CNBD kanal domaini otoinhibitör rolünü yerine getirir. cAMP'nin yokluğunda, C terminali, kanal çekirdeği ile etkileşime girerek ve böylece aktivasyonu daha hiperpolarize edici voltajlara kaydırarak HCN kanal geçişini inhibe eder. cAMP'nin CNBD'ye bağlanması bu inhibisyonu ortadan kaldırır. Bu

modele göre, farklı HCN kanalları arasında cAMP'ye verilen yanıtın büyüklüğündeki farklılıklar, büyük ölçüde CNBD'nin bazal geçişi engelleme ölçüsündeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. HCN2 ve HCN4 kanalları, siklik nükleotit yokluğunda etkili bir şekilde inhibe edildikleri için cAMP'ye büyük bir cevap gösterirler. Buna karşılık HCN1 cAMP'den sadece zayıf bir şekilde etkilenir, çünkü bu kanalda CNBD'nin inhibitör etkisi cAMP'nin yokluğunda bile zayıftır. CNBD'nin inhibe edici etkisinin, kanal çekirdek alanı ile doğrudan bir fiziksel etkileşimle mi yoksa dolaylı yollarla mı oluştuğu henüz belirlenmemiştir. Son transmembran sarmalı (S6) CNBD'ye bağlayan yaklaşık 80 amino asitlik C linker olarak adlandırılan bir bölgenin, bu süreçte anahtar rol oynadığına dair kanıtlar vardır (33).

2.4. HCN Kanallarının Düzenlenmesi

If kanalları çeşitli nörotransmitterler ve metabolik uyaranlar tarafından düzenlenir (29). Çoğu durumda düzenleme, kanal aktivasyonunun voltaj bağımlılığının pozitif veya negatif yöne kaymasına dayanır. HCN kanalları, sitozol ve hücre dışı boşluktaki küçük moleküllerin [örneğin, PIP2 (Fosfatidilinositol 4,5 bifosfat) protonları, klorür iyonları] yanı sıra proteinler tarafından da sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu moleküller, plazma zarındaki kanalların fonksiyonel özelliklerini kontrol ederler, hücre yüzeyi ekspresyonlarını yani zardaki fonksiyonel kanalların sayısını düzenlerler ve tanımlanmış hücresel bölmelere hedeflenmelerini sağlarlar.

2.4.1. PIP2 ile düzenlenme

Birçok iyon kanalında olduğu gibi, HCN kanallarının voltaja bağlı geçişi, fosfatidil inositol 4,5 bifosfat (PIP2) dahil olmak üzere membran fosfoinositidleri tarafından allosterik olarak düzenlenir (60, 61, 62). Bu membran lipidleri, HCN kanallarının voltaja bağlı aktivasyonunu siklik nükleotidlerin etkisinden bağımsız olarak yaklaşık 20 mV'luk pozitif potansiyellere doğru kaydıran allosterik ligandlar olarak hareket ederler. Sonuç olarak fosfoinositidler HCN kanalının açılmasını Ih kanallarının fizyolojik rolü ile ilgili bir voltaj aralığına ayarlar. Fosfolipidlerin enzimatik bozunması kanal aktivasyonunu azalttığı ve nöronların ateşleme frekansını yavaşlattığı için, HCN kanallarının PIP2 aracılı regülasyonu, nöronal devrelerdeki fonksiyon için fizyolojik öneme sahip olabilir. Farklı PIP2 seviyeleri, farklı gelişim evresindeki veya farklı bölgesel dağılımdaki kalp hücrelerinde Ih'nin yarı maksimum

aktivasyon voltajlarındaki varyasyonlarını da açıklayabilir (63-65). PIP2'nin HCN kanal geçişi üzerindeki etkisini veren moleküler belirleyiciler henüz bilinmemektedir. Büyük olasılıkla, HCN kanalları, fosfoinositidlerin negatif yüklü baş grupları ile kanal proteini arasındaki elektrostatik etkileşim ile aktive edilmektedir.

2.4.2. Protonlar ile düzenlenme

HCN kanallarının aktivitesi hem hücre içi hem de hücre dışı pH'daki değişiklikler tarafından düzenlenir (66, 67, 68). Hücre içi protonlar kanal aktivasyonunun voltaj bağımlılığını daha hiperpolarize edici voltajlara kaydırır ve aktivasyon hızını yavaşlatır. Bu nedenle asidik pH koşulları altında kanal aktivitesi düşüktür ve alkali koşullar altında aktivite artar. Bölgeye yönelik mutajenez kullanılarak, fare HCN2'inde pH duyarlılığını sağlayan voltaj algılayıcı S4-sarmalı ile sitoplazmik S4-S5 bağlayıcısı arasındaki sınırdaki lokalize olan protonlanabilir bir histidin kalıntısı (His321) tanımlanmıştır. Asidik (pH_i: 6.0) ve alkali pH'de (pH_i: 9.0) HCN2 aktivasyonunun orta nokta potansiyeli, fizyolojik pH (pH_i: 7.4) ile karşılaştırıldığında sırasıyla yaklaşık 10 mV daha hiperpolarize ve depolarize potansiyellere kaydırılır (66). Asidik hücre dışı pH (pH_e < 5.0), HCN kanallarının voltaj bağımlılığını daha pozitif voltajlara kaydırarak I_h'yi aktive eder (68). HCN kanallarının pH ile modülasyonu, talamik salınımlar ve solunum frekansı da dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerin kontrolünde yer alabilir. Asidoz tarafından HCN kanal aktivitesinin inhibisyonu, kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsü gibi patolojik durumlarda da önemli olabilir. Hücre içi protonların HCN kanalları üzerindeki etkisi, beyindeki HCN kanal aktivitesini modüle ederek, talamik salınımların ve solunum frekansının düzenlenmesinde önemli fizyolojik etki oluşturur (67). Generalize nöbetlerdeki karbonik anhidraz inhibitörlerinin koruyucu etkisi, HCN kanallarının hücre içi pH'a yüksek duyarlılığına bağlanmıştır (69). Karbonik anhidrazın inhibisyonu pH_i'de artışa neden olur ve talamokortikal nöronlarda I_h'yi artırır. Sonuç olarak, bu nöronlar depolarize olur ve senkronize paroksizmal deşarjlara katılımları azalır. HCN kanallarının hücre içi asidoz tarafından inhibisyonu, kardiyak iskemi ve kalp yetmezliğindeki patofizyoloji ile alakalı olabilir.

2.4.3. Klorür ile düzenlenme

Ih'nin kararlı durum iletkenliği, hücre dışı klorür tarafından düzenlenir. Cl^{-1} 'ün bu etkisinin HCN2 ve HCN4 için belirgin olduğu, HCN1 için ise oldukça zayıf olduğu bulunmuştur (70). Gözenek bölgesindeki tek bir amino asit kalıntısı, hücre dışı Cl^{-1} duyarlılığının moleküler bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır (70). Yüksek Cl^{-1} duyarlılığına sahip kanallar (HCN2 ve HCN4) bu konumda bir arjinin kalıntısı (HCN2'de R405; HCN4'te R483), HCN1 ise bir alanin (A352) kalıntısı taşır. HCN kanallarının Cl^{-1} tarafından düzenlenmesi muhtemelen kalp patofizyolojisi ile de ilgilidir. HCN4 ve HCN2 tarafından düzenlenen sinoatriyal Ih genliğinin azalması, hipokloremide gözlenen aritmilerin oluşumundan sorumlu olabilir.

2.4.4. Tirozin kinaz, p38-MAP kinaz ile düzenlenme

HCN kanalları tirozin kinazlara ek olarak Serin/Treonin kinaz, p38-MAP kinaz tarafından da düzenlenir. Hipokampal piramidal nöronlarda, p38-MAP kinazın aktivasyonu, voltaja bağlı aktivasyonu önemli ölçüde daha pozitif potansiyellere doğru kaydırır (71). Bu düzenleme, temporal sumasyon ve nöronal uyarılabilirliği işlevsel olarak etkileyebilir. p38-MAP kinazın gözlenen etkileri HCN kanal proteininin doğrudan fosforilasyonu ile mi yoksa bu kanallarla etkileşime giren başka bir proteinin fosforilasyonu ile mi indüklediği açık değildir.

2.4.5. İnteraktif proteinler ile düzenlenme

Misshapen-like kinase 1 (MinK) ile ilişkili protein MiRP1'in birkaç HCN kanal tipi ile etkileşime girdiği rapor edilmiştir (72-74). MiRP1, tek transmembran protein ailesinin bir üyesidir ve hERG (human ether-a-go-go related gene) K^{+} kanalının yerleşik bir yardımcı alt birimidir (75-77). MiRP1'in sıçan neonatal kardiyomiyositlerinde ve köpek sinoatriyal düğüm dokusunda HCN2 ile etkileşime girdiği bulunmuştur (74). Xenopus oositlerinde (73) ve neonatal sıçan kardiyomiyositlerindeki (74) overekspresyon çalışmaları, MiRP1'in mevcut HCN2'nin aktivasyon kinetiğini hızlandırdığını ve yoğunluğunu arttırdığını göstermiştir. Overekspresyon sistemlerinde, MiRP1'in HCN1 (73) ve HCN4 (72) ile de etkileşime girdiği bulunmuştur. MiRP1, HCN4'ün akım yoğunluğunu arttırmış, ancak HCN1/HCN2'deki ekspresyon deneylerinden farklı olarak, kinetiği yavaşlatıp kanalın aktivasyon eğrisinde negatif bir kaymaya neden olmuştur (72). Toplu olarak, bu sonuçlarla

MiRP1'in HCN kanallarının yardımcı bir alt birimi olduğu öngörülebilir. Çok yakın zamanda, başka bir transmembran proteinini olan K⁺ channel regulator protein 1 (KCR1) 'in HCN2 ve doğal kardiyak Ih kanalları ile etkileşime girdiği rapor edilmiştir (78). KCR1, MiRP1 gibi hERG K⁺ kanalıyla ilişki kurabilen 12 transmembran bölgesine sahip plazma membranı ile ilişkili bir proteindir (79, 80). KCR1 overekspresyonunun Chinese hamster ovary (CHO) hücrelerinde HCN2 akım yoğunluğunu azalttığı gösterilmiştir. Sıçan kardiyomiyositlerindeki overekspresyon ayrıca doğal Ih'nin mevcut yoğunluğunu da azaltmış ve bu hücrelerin spontan aksiyon potansiyeli aktivitesini bastırmıştır. Bu deneylerden, KCR1'in HCN kanallarını engelleyici bir yardımcı alt birimi olduğu ve kardiyak otomatisitenin düzenleyicisi olarak hizmet ettiği sonucuna varılmıştır. MiRP1 için tartışıldığı gibi, bu hipotezi doğrulamak için daha fazla deney gerekmektedir.

Birkaç iskelet proteini, HCN kanallarının C-terminali ile etkileşime girer. Bu proteinler esas olarak nöronlarda tanımlanmıştır ve farklı hücre alt birimlerine (örneğin dendritler veya sinapslar) yönelik kanal etkinliğini düzenleyebilirler. TPR içeren Rab8b etkileşimli protein (TRIP8b) olarak adlandırılan beyne özgü bir protein, HCN kanallarının C-terminalinde korunmuş bir tripeptit dizisi aracılığıyla kanal ile etkileşime girer (81). Bu proteinin veziküllerin nihai hedeflerine taşınmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (82). TRIP8b, kortikal ve hipokampal piramidal hücrelerin dendritlerinde HCN1 ile aynı yerde bulunur. TRIP8b'nin doğal hücrelerde veya heterolog sistemlerde HCN proteini ile birlikte ekspresyonu, plazma membranında HCN kanallarının güçlü downregülasyonu ile sonuçlanır. Bu deneylere ve HCN1 nakavt farelerin analizine dayanarak, TRIP8'in kortikal piramidal nöronlarda somatodendritik HCN1 kanal aksiyon potansiyeli oluşumunda rol oynadığı tahmin edilmektedir (81).

HCN1'in, filamin A'yı CNBD'nin aşağısında 22 amino asitlik bir dizi yoluyla bağladığı bulunmuştur (83). Filamin A, aktine bağlanan ve böylece K⁺ kanalı olan Kv4.2 ve içeri doğrultucu K kanalları (Kir2.1) gibi transmembran proteinleri aktin hücre iskeletine bağladığı varsayılan bir sitoplazmik iskelet proteindir (84, 85). Filamin A-eksprese eden ve filamin A-eksik hücre hatlarındaki heterolog overekspresyona dayanarak,

filaminin kümelenmeye neden olduğu ve HCN1'in aktivasyon ve deaktivasyon kinetiğini yavaşlattığı öne sürülmüştür (83).

Ih kanalları, sinoatriyal miyositlerde ve doğal sinoatriyal Ih'ye katkıda bulunan ana HCN kanalı izoformu olan HCN4'ü eksprese eden HEK293 hücrelerinde membran lipit hattında lokalize olur (86). Koimmünopresipitasyon deneyleri, HCN4 ile caveola olarak adlandırılan işaretleyici bir protein olan caveolin-3 arasında bir etkileşime işaret etmektedir (87). Caveola, morfolojik olarak farklı bir lipit sal tipini temsil eder. Kardiyomiyositlerde ve kalp pili hücrelerinde, HCN kanal aktivitesini düzenleyen beta-2 adrenoseptörleri de dahil olmak üzere, β -adrenerjik sinyal yolunun birkaç elemanı caveolada lokalizedir. HCN4'ün caveolada kümelenmesinin, bu kanalın normal işlevi ve düzenlenmesi için gerekli olduğu öne sürülmüştür. Gerçekten de, lipid invajinasyonlarının kolesterol tükenmesi ile bozulması, membran içinde HCN kanallarının yeniden dağılımına neden olup kanalların kinetik özelliklerini değiştirmiştir (86).

2.5. Doku Düzeyinde HCN Kanal Ekspresyonu

HCN kanalları esas olarak sinir sistemi ve kalpte ifade edilmektedir. Beyinde HCN1 neokorteks, hipokampus, serebellar korteks ve beyin sapında eksprese edilir (2, 46, 88-90). Ek olarak omurilikte HCN1 ekspresyonu bildirilmiştir (90). HCN2, talamus ve beyin sapı çekirdeklerinde en yüksek ekspresyonla neredeyse bütün beyin bölgesinde dağılmıştır (46, 88, 89). Buna karşılık, HCN3, merkezi sinir sisteminde çok düşük seviyelerde, seyrek olarak bulunur. Orta ila yüksek ekspresyon sadece olfaktör bulbus ve bazı hipotalamik çekirdeklerde tespit edilmiştir. HCN4, beynin bazı bölümlerinde örneğin çeşitli talamik çekirdeklerde ve olfaktör bulbusun mitral hücre tabakasında güçlü bir şekilde ifade edilir (46, 88, 89). Diğer beyin bölgelerinde HCN4'ün ifadesi çok daha düşüktür. Periferik sinir sisteminde ve dorsal kök ganglionunda hakim olan alt tip HCN1'dir ve bu bölgelerde 4 HCN alt tipinin tamamının ekspresyonu tespit edilmiştir(91).

Dört HCN kanalı izoformunun tümü kalpte tespit edilmiştir. Bu izoformların ekspresyon seviyeleri büyük ölçüde kardiyak bölgeye bağlıdır ve ayrıca türler arasında farklılık gösteriyor gibi görünmektedir (Tablo 1). Sinoatriyal düğümde, şimdye kadar analiz edilen tüm türlerde (örneğin tavşan, kobay, fare ve köpek) HCN4, Ih'nin

yaklaşık %80'ini oluşturan ana izoformdur (7, 17). Bu akımın kalan kısmı türe bağlıdır. Tavşanda Ih'nin bu fraksiyonuna HCN1 hakimdir, farelerde ise HCN2 bu fraksiyonu oluşturur (7, 92). Şimdiye kadar, insan sinoatriyal düğümünde HCN kanallarının ekspresyonu hakkında hiçbir veri mevcut değildir.

Kardiyak iletim sisteminin diğer bölümlerinde olduğu gibi, HCN4 atriyoventriküler düğümde (93) ve Purkinje liflerinde (94) de ekspresyonu olan ana izoformdur. HCN3, iletim sisteminde sadece çok düşük seviyelerde ifade edilir. HCN kanalları ayrıca atriyal ve ventriküler miyositlerde bulunur. Bu hücrelerde, HCN2 oldukça yaygın bir dağılım gösteren baskın izoformdur. HCN1, HCN3 ve HCN4'ün transkriptleri de kalp kasında tespit edilmiştir. Genel olarak, iletim sistemi hücrelerine kıyasla normal kalp kasında HCN kanallarının ekspresyon seviyeleri düşüktür. Bununla birlikte, kalp hastalıkları sırasında HCN kanallarının upregülasyonu meydana gelebilir (95-98). Örneğin HCN2 ve HCN4, kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliğinde, atriyal ve ventriküler miyokarda upregüle edilir (99-101). Bu nedenle, Ih aşırı ekspresyonu, hipertrofik kalpte aritmojenik aktivitenin önemli bir tetikleyicisi olabilir.

Tablo 1. HCN kanal alt tipleri ve özelliklerinin karşılaştırılması. (Yavuz ve Onat, 2018)'tan çevrilerek alınmıştır (102).

HCN İzoformları	İfade Edildiği Bölge	Modülatörleri	cAMP Duyarlılığı	Aktivasyon Hızı	Aktive Olduğu Voltaj
HCN1	korteks, hipokampus, serebellum, talamus, dorsal kök gangliyonu, sinoatriyel düğüm, atriyoventriküler düğüm, Purkinje lifleri	cGMP, PIP2, filamin A, Nedd4-2, Thy1, pH	düşük	Hızlı aktivasyon; 30-300 ms	-70mV
HCN2	talamus ve beyin sapı nukleusları, korteks, hipokampus, serebellum, sinoatriyel düğüm, atriyoventriküler düğüm	cGMP, PIP2, MiRP1, pH, tirozin kinazlar	yüksek	orta; 200- 400 ms	-95mV
HCN3	hipotalamus, olfaktör bulbus, kalp kası, karaciğer, akciğer, böbrek	PIP2, pH	-	Yavaş aktivasyon; 400ms-s	-77/-95 mV
HCN4	talamus, bazal gangliyonlar, sinoatriyel düğüm, atriyoventriküler düğüm, Purkinje lifleri, insan testisi, iskelet kası ve akciğer	cGMP, PIP2, pH, tirozin kinazlar	yüksek	Yavaş aktivasyon; 400ms-s	-100 mV

2.6. Kardiyak Ritmin Oluşumunda Ih Akımının Rolü

HCN4, kalbin pacemaker bölgesi olan sinoatriyal düğümde bulunan başlıca HCN kanal alt tipidir. Sinoatriyal düğümde, HCN4 kanalları bir kardiyak aksiyon potansiyelinden sonra hiperpolarizasyon ile aktive olur. Daha sonra HCN kanalları içeri doğru oluşan akımı iletir ve hücreyi depolarize ederek voltaj kapılı Ca^{+2} kanalının aktivasyonuna yol açar, bu da bir sonraki kardiyak aksiyon potansiyelinin ateşlenmesine yol açar. Bu şekilde ritmik ateşleme üretilir. Nörotransmitterler veya farmakolojik müdahale voltaj bağımlılığını sağa kaydırmak ve ardından HCN kanallarının maksimum akım iletkenliğini artırmak için cAMP seviyelerini yükselterek kalp atış hızını hızlandırır (103).

Kalp atışı, sağ atriyumun sinoatriyal nod bölgesindeki özel kalp pili hücrelerinden kaynaklanır. Bu hücreler, -65 ila -45 mV arasındaki voltaj aralığında ilerleyici bir diyastolik depolarizasyon varlığı ile karakterize edilen özel bir tür aksiyon potansiyeli (pacemaker potansiyeli) üretir. Repolarizasyon fazından sonra, SA düğüm hücresinin membran potansiyelini kalsiyum kanalı aktivasyonunun eşğine doğru geri götüren ve böylece ateşlemeyi sürdüren diyastolik depolarizasyondur. Diyastolik depolarizasyon, aralarında Ih'nin önemli bir rol oynadığı kabul edilen birkaç akımın uyumlu eylemiyle üretilir, çünkü negatif potansiyellerde aktive edilir ve bu nedenle Ih potansiyel olarak diyastolik depolarizasyonun birincil başlatıcısı olarak hizmet edebilir. Ih'ye ek olarak, kalsiyum akımları T tipi Ca kanal akımı (ICaT) ve L tipi Ca kanal akımı (ICaL) ve moleküler korelasyonu henüz bilinmeyen sürekli içe akım dahil olmak üzere diğer içe doğru akımlar diyastolik depolarizasyona katkıda bulunabilir (104, 105). Ayrıca, diyastolik depolarizasyonun dışa doğru doğrultucu K^{+} akımları olan hızlı potasyum akımı (IKr) ve yavaş potasyum akımı (IKs)'lerin bozulmasıyla veya ryanodin (106-108) veya İnositol trifosfat (IP3) reseptörleri (109) yoluyla hücre içi Ca^{2+} salınımını içeren mekanizmalarla başlatılabileceği öne sürülmüştür. Ih sadece temel ritim oluşumunda yer almaz, aynı zamanda otonom sinir sistemi tarafından kalp atış hızının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar. Sempatik uyarı, Ih'yi aktive eder ve dolayısıyla, β -adrenoseptör tarafından tetiklenen cAMP üretimi yoluyla kalp hızını hızlandırır. Vagal uyarı, cAMP sentezinin inhibisyonu ve ardından Ih aktivitesinin inhibisyonu yoluyla kalp hızını düşürür.

Son genetik fare modeli çalışmaları, in vivo koşullar altında kardiyak ritmiklikte Ih'nin önerilen rollerini değerlendirmeyi mümkün kılmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi, HCN4, SA düğümde Ih'nin yaklaşık %80'ini oluşturur ve kalp atımının oluşumu için çok önemli olduğu kabul edilir (110-112). Bu görüşü desteklemek için, HCN4 geni bozulan farelerde embriyonik 10. ile 11. günler arasında rahimde öldükleri gösterilmiştir (112). HCN4 eksikliği olan farelerin embriyonik 10. günden önce analiz edilen embriyonik kalpleri, vuruş frekansında yaklaşık %40'luk bir azalma göstermiştir. Daha da önemlisi, bu kalpler β -adrenerjik uyarıya yanıt vermediği gözlenmiştir. Bu nedenle, embriyonik kalpte HCN4'ün ana kalp atışı için, embriyonik 11. günden önce gerekli olmadığı, ancak kanalın otonom kalp hızı regülasyonu için kesinlikle çok önemli olduğu sonucuna varılabilir (112). Bu sonucu desteklemek için, CNBD'de yüksek afiniteli cAMP bağlanmasını ortadan kaldıran bir mutasyon (HCN4R669Q) taşıyan fareler ile yapılan bir çalışmada, bu farelerin kalplerinin β -adrenerjik stimülasyona yanıt vermediği gösterilmiştir (111). Daha ileri analizler, HCN4 eksikliği olan farelerin muhtemelen SA düğümünün gelişimsel bir kusurundan öldüğünü ortaya çıkarmıştır (112). Bu fareler, ilkel pacemaker potansiyelleri üreten ancak yetişkin tipi pacemaker potansiyeli üretemeyen embriyonik pacemaker hücreleri geliştirir. İlginç bir şekilde HCN4R669Q mutasyonu olan fareler pacemaker potansiyeli üretebilmiş, ancak HCN4 eksikliği olan fareler gibi embriyonik 11. gün civarında da ölmüşlerdir (111). Bu çalışmalar, HCN4 proteininin embriyonik kalp gelişimi sırasında yetişkin pacemaker hücrelerinin oluşumu için ve embriyonik kalp hızının cAMP'ye bağlı upregülasyonunu sağlamak için gerekli olduğunu göstermektedir. Her iki HCN4 aracılı işlev, erken kalp fonksiyonlarında ve erken embriyonik kalp gelişiminde vazgeçilmezdir ancak geç embriyonik kalp gelişimi aşamalarına geçiş için de gereklidir.

Ih, global HCN4 eksikliği olan farelerin embriyonik pacemaker hücrelerinde olduğu gibi, yetişkin HCN4 eksikliği olan farelerin SA düğüm hücrelerinde de yaklaşık %80 oranında azalmıştır (110). Bununla birlikte, bu mevcut bileşenin eksikliği, ne pacemaker potansiyel oluşumunda büyük bir bozulmaya ne de kalp hızının β -adrenerjik regülasyonunda interferansına yol açmamıştır. Global HCN4 yoksun farelerin aksine, yetişkin HCN4 yoksun fareler, normal bir bazal kalp hızı ve normal sempatik ve vagal kalp hızı modülasyonu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, yetişkin

HCN4 eksikliği olan fareler, tekrarlayan sinüs duraklamaları ile karakterize edilen bir kardiyak aritmi sergilemiştir. Yetişkin HCN4 yoksun farelerin pacemaker hücreleri yaklaşık 8 mV ile hiperpolarize edilmiş ve çoğu durumda bazal koşullar altında kendiliğinden ateşlenmemiştir. Ancak bu işlevsel bozulma β -adrenerjik uyarı ile telafi edilebilmiştir. Sonuç olarak, bu bulgular yetişkin SA düğümünde HCN4'ün pacemaker potansiyellerinin bir tür dengeleyicisi olarak hizmet edebileceğini düşündürmektedir. Çoğu durumda ve özellikle sempatik stimülasyon sırasında, HCN4'ün stabil pacemaker'ı desteklemek için gerekli olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, repolarize edici akımlardaki bir artıştan sonra (örneğin vagal stimülasyon veya aktif durumdan bazal kardiyak duruma geçiş), HCN4 aktive olur ve sistemi iyi dengede tutarak depolarize edici bir akım sağlar. Bu depolarizasyon rezervinin kaybı, HCN4 nakavt farelerde tekrarlayan sinüs duraklamalarının indüklenmesini açıklayabilir.

Farelerde SA düğümü Ih akımının yaklaşık %20'sini oluşturan HCN2, HCN4'e tamamlayıcı bir kanal olarak hizmet edebilir (92). HCN2 eksikliği olan fareler ayrıca elektrokardiyogramda değişen tepe-tepe aralıkları ile karakterize edilen bir sinüs aritmisini ortaya çıkarmıştır (92). Otonom kalp hızı regülasyonu dahil sinüs ritminin diğer parametrelerin bu farelerde normal olduğu gözlenmiştir. HCN4'te olduğu gibi, HCN2 eksikliği olan SA düğüm hücrelerinin maksimum diyastolik potansiyeli (MDP) hafifçe hiperpolarizedir.

Şimdiye kadar insanlarda dört farklı heterozigot HCN4 mutasyonu tanımlanmıştır (113-116). Mutasyonlar, cAMP'ye bağlı modülasyon (HCN4-573X) kaybına (113), aktivasyon eğrisinde hiperpolarize kaymaya (S672R ve G480R) (114, 116) veya hücre yüzeyi ekspresyonunda ciddi bir azalmaya (D553R) (115) yol açar. İlginç bir şekilde, bu mutasyonlardan muzdarip olan tüm hastaların ortak noktası, az ya da çok şiddetli bradikardi sergilemeleridir, bu HCN kanalı eksik fare modellerinde gözlenmeyen bir klinik fenotiptir.

2.7. Ih Akımın Hastalıklarla İlişkisi

HCN kanallarının sinir sistemi ve kalpteki yaygın ifadesi ve fizyolojik önemi göz önüne alındığında, bu kanalların bozulmuş ekspresyonunun veya malformasyonunun insan hastalıklarının oluşumu ile ilişkili olduğu varsayılabilir. Gerçekten de son birkaç

yılda lh'nin en az üç hastalık sınıfının patolojisinde rol oynadığına dair kanıtlar oldukça fazladır: epilepsiler, nöropatik ağrı bozuklukları ve kardiyak aritmiler.

2.7.1. Kalıtsal kanalopatiler

Klasik anlamda kanalopati terimi bir iyon kanalı genindeki kalıtsal genomik mutasyonların neden olduğu ve kanal proteininin kaybına, bozulmuş ekspresyon seviyelerine veya fonksiyonel kusurlarına yol açan hastalıkları ifade eder. İlginç bir şekilde, HCN kanal genlerinin keşfinden 10 yıl sonra sayısız çabaya rağmen, sadece dört kalıtsal HCN kanal mutasyonu tanımlanmıştır. Dördü de HCN4 geninde lokalizedir ve sinüs bradikardisinin indüksiyonu ile ilişkilidir (117). Şimdiye kadar tanımlanan tüm hastalar, ilgili HCN4 mutasyonu için heterozigottur. Bu bulgu için olası bir açıklama, farelerde olduğu gibi, her iki HCN4 allelinin bozulması (112) veya işlevsel bozukluğunun (111) olgun bir kardiyak iletim sistemi geliştirememesi nedeniyle embriyonik ölümle ilişkili olması olabilir. Şimdiye kadar insan HCN1-3 genlerinde hastalığa neden olan mutasyonlar bildirilmemiştir. Sıçan HCN nakavt modellerinin analizi temelinde, bu genlerdeki mutasyonların karmaşık kardiyak (HCN2) ve/veya nöronal (HCN1, HCN2) fenotipleri gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu bireysel kanalların toplam kaybının bile farelerde ölüme yol açmadığı da bilinmektedir. Dolayısıyla, HCN1-3 proteinlerindeki mutasyonların insanlarda farelere göre çok daha fazla etkiye sahip olduğu ve ölümcül oldukları için tespit edilmediği varsayılabilir. Alternatif olarak, mutasyonlar mevcuttur, ancak çok nadiren meydana geldikleri için şimdiye kadar tespit edilmekten kaçmışlardır.

2.7.2. Kazanılmış (transkripsiyonel) kanalopatiler

Transkripsiyonel veya edinilmiş kanalopatiler, normal mutasyona uğramamış bir iyon kanalının ekspresyonunun veya lokalizasyonunun patolojik değişikliklerinden kaynaklanır (118). Bu tür bozukluklar, genellikle çok nadir görülen kalıtsal monogenetik kanalopatilerden daha sık görülür. Bununla birlikte, transkripsiyonel kanalopatilerin analizi de monogenetik hastalıkların analizinden çok daha zordur ve yanlış yorumlamalara açıktır. Analizdeki en büyük engel, iyon kanallarının ekspresyonunun ve hücre kullanımı genellikle çok sayıda hücre içi ve dış faktör tarafından düzenlenen son derece dinamik bir süreç olmasıdır. Genel olarak, bu karmaşıklık, bir iyon kanalının değiştirilmiş ekspresyon profilinin bir hastalığa neden

olup olmadığına, bir hastalığa yanıt olarak telafi edici bir süreç olup olmadığına veya normal bir fizyolojik varyasyonu temsil edip etmediğine karar vermeyi zorlaştırır.

2.7.2.1. Epilepsi

Ih ve epileptik nöbetleri ilişkilendiren ilk kanıt, çocukluk çağı febril nöbetlerinin sıçan modelinde yapılan çalışmalardan (ateşli nöbetin hipertermi modeli) gelmiştir (119, 120). 10 günlükken, sıçanlar 30 dakika süren tek bir hipertermi periyoduna maruz bırakılmıştır. Bu hayvanlar, hipokampustan kaynaklanan epileptik konvülsiyonlar geliştirmiş ve yetişkin aşamasında nöbet geliştirme eğiliminin arttığı gösterilmiştir. Elektrofizyolojik kayıtlar, epileptik sıçanların hipokampal CA1 (cornu ammonis) nöronlarında gelişmiş bir Ih (-70 mV'de I_{max}'ta %40 artış) ortaya çıkarmıştır. Ek olarak Ih akımı vahşi tip sıçanlarla karşılaştırıldığında, V_{0.5}'te hafif bir pozitif kayma göstermiş (+3 ila +5 mV) ve aktivasyon kinetiğini yavaşlatmıştır. Ateşli nöbetlerden sonra gözlemlenen Ih'nin moleküler temelini daha yakından incelenmesi, hipokampal piramidal nöronlarda HCN1'in downregülasyonunu, HCN2'nin ise upregüle edildiğini ortaya çıkarmış, bu da HCN1 ile HCN2 protein oranının 8:1'den 4:1'e düşmesine neden olmuştur (121, 122). Nöbetlere yanıt olarak HCN kanal ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin altında yatan mekanizma belirsizdir. HCN1 kanal ekspresyonunun azalması, muhtemelen AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit) reseptörleri yoluyla kalmodulin (CaM) kinaz II aktivasyonu ve Ca⁺² girişini içeren transkripsiyonel olarak düzenlenen bir süreçtir. Buna karşılık, HCN2'nin upregülasyonunun CaM kinaz II'den bağımsız olduğu bulunmuştur (123).

Değişen HCN kanal ekspresyonu, başka bir nöbet sınıfında, absans epilepsilerde de bulunmuştur. Tipik absans, klinik olarak ani, kısa bir bilinç bozukluğu ve davranışsal durma ile tanımlanır. Absans nöbet esas olarak korteksten kaynaklanır; ancak talamus da hastalığın patolojisinde rol oynar (124, 125). Özellikle, absansın tanısal bir özelliği olan diken ve dalga deşarjlarının üretimi, talamokortikal devrelerde artan patlama ateşlemesi ve senkronize salınım aktivitesi prevalansı ile ilişkilidir (124). HCN kanallarının talamokortikal nöronların ateşleme davranışını kontrol etmedeki kilit rolü göz önüne alındığında, anormal HCN kanal ekspresyonu absans nöbet oluşmasına katkıda bulunabilir. Bu hipotezle uyumlu olarak, absans epilepsi oluşturulan iki sıçan modelinde (126-128), talamokortikal nöronlarda yüksek HCN1 seviyeleri

bulunmuştur. Buna karşılık, HCN2-4'ün ifadesinin değişmediği gözlenmiştir. Her iki sıçan modelinde, talamokortikal nöronların Ih'si, HCN2'ye göre HCN1 seviyelerinin artmasıyla tutarlı olarak cAMP'ye karşı azalmış bir duyarlılık sergilemiştir. Ih'nin $V_{0.5}$ 'i de daha hiperpolarize voltajlara kaymıştır. Azalmış cAMP duyarlılığı ile birlikte hiperpolarize edici kaymanın, talamokortikal nöronları patlama ateşleme modunda kilitletiği tahmin edilmiştir (126).

2.7.2.2. Periferik nöropatik ağrı

Periferik nöropatik ağrı spontan ağrı, hiperaljezi ve allodini ile karakterize karmaşık bir ağrı durumudur (129). Hastalık periferik sinirlerin yaralanmasından kaynaklanır. Sinir hasarının birçok etiyojisi olabilir. Bunlar arasında travma, Herpes Zoster gibi viral hastalıklar, diyabetes mellitus gibi metabolik hastalıklar, iskemi inme gibi damar hastalıkları, multipl skleroz gibi otoimmün hastalıklar, kanser ve radyasyona veya kemoterapiye maruz kalma bulunmaktadır. Nöropatik ağrının patomekanizması karmaşıktır ve hem periferik hem de merkezi sensitizasyonu içerir. Hastalığın ayırt edici özelliği, anormal spontan ektojik deşarjların oluşmasıdır. Bu deşarjlar güçlü ritmik bileşenlere sahiptir ve hasarlı dorsal kök ganglion (DRG) aksonlarından ve ayrıca zarar görmemiş komşu sinirlerden üretilir. Çeşitli voltaj kapılı Na^+ kanallarının değişen ekspresyon seviyelerinin, spontan deşarjların oluşumuna ve kalıcılığına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (118, 130, 131).

Bazı bulgular, HCN kanallarının da nöropatik ağrıda önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (132). İlk olarak, Ih, DRG nöronlarında, özellikle ektojik deşarjların çoğunun üretildiği büyük ve orta büyüklükteki nöronlarda tanımlanmıştır (133, 134). İkincisi, in situ hibridizasyon ve immünohistokimya, farklı fare ve sıçan DRG'lerinde HCN1-3 kanallarının varlığını ortaya çıkarmıştır (91). Üçüncüsü, deneysel olarak indüklenen yaralanmalardan sonra büyük ve/veya orta büyüklükteki DRG nöronlarında artan Ih yoğunlukları bulunmuştur (91, 135, 136). Dördüncüsü, spesifik bir Ih bloker olan ZD7288 [4- (N-etil-N-fenilamino) -1,2-dimetil-6- (metil-amino) pirimidinyum klorür]'in düşük konsantrasyonları hem ağrı davranışını hem de yaralı sinir liflerindeki spontan deşarjları tersine çevirmiştir (91, 137, 138). Bu bulgular birlikte ele alındığında, hücrenin artan uyarılabilirliğine yol açan Ih'nin upregülasyonunun, ektojik ateşleme oluşumuna neden olduğunu kuvvetle gösterir.

Ih'nin upregülasyonunun altında yatan mekanizma daha ayrıntılı olarak araştırılmaya devam etmektedir. İlginç bir şekilde, fare DRG'da yapılan bir çalışmada DRG yaralanması sonrası Ih akım yoğunlukları artmasına rağmen, yaralanmadan sonra HCN1 ve HCN2'nin downregüle olduğu tespit edilmiştir (91). Akım yoğunlukları ile protein ekspresyonu arasındaki uyumsuzluğun nasıl açıklanabileceği belirsizdir. Potansiyel mekanizmalar arasında Ih'nin kanal açılma olasılığının artmasına yol açan pozitif $V_{0.5}$ kayması, değiştirilmiş HCN kanal alt birim düzeneği ve yaralanmadan sonra HCN kanal proteinlerinin artan hücre yüzeyi ekspresyonu düşünülebilir.

2.7.2.3. Kardiak remodeling ve aritmi

Kalp kasının yapısal ve fonksiyonel olarak yeniden şekillenmesi, kardiyomiyopatiler, enfarktüs, kronik hipertansiyon ve enflamasyon (örn., miyokardit) dahil olmak üzere çeşitli kardiyovasküler hastalıkların klinik bir özelliğidir (139). Başlangıçta, bu adaptasyonlar kardiyak fonksiyonu sürdürmek için faydalıdır (örneğin, aşırı basınçta), ancak hastalıkların sonraki aşamalarında kasılma anormalliklerine ve ani ölüme sebep olabilirler. Kardiyak kontraktile ve otomatizitenin kontrolünde yer alan iyon kanallarının düzensiz ifadesi, remodeling sürecinde önemli bir rol oynar (139-143).

Ih'nin upregülasyonu, kalp hipertrofisi ve kalp yetmezliğinin çeşitli hayvan modellerinde ve ayrıca bu hastalıklardan muzdarip insanlarda tarif edilmiştir (144-146). Bu hastalıkların ortak bir özelliği, normalde bu kanalları çok düşük düzeyde eksprese eden ventriküler kardiyomiyositlerde Ih kanallarının yoğun şekilde upregüle olmasıdır. Buna karşılık, hastalıklı kardiyomiyositlerin Ih'sinin aktivasyon eşiği, normal ventriküler Ih ile karşılaştırıldığında genellikle daha pozitif değerlere kaymaz (97, 144). Artan Ih yoğunluğu ventriküler kasın ektopik pacemaker benzeri aksiyon potansiyelleri geliştirme eğilimini şiddetle yükselterek aritmiye ve ani ölüme katkıda bulunur (95-98, 100, 101).

Kemirgenlerde ve insanlarda, Ih'nin upregülasyonu, artan HCN kanallarının ekspresyonunu yansıtır. Hipertrofik atriyal ve ventriküler miyositlerdeki mRNA seviyelerinin incelenmesi, farklı hayvan modellerinde HCN2 ve HCN4'ün upregülasyonunu ortaya çıkarmıştır (95-101). Ek olarak, son dönem kalp yetmezliği olan insan hastalarda HCN4'ün upregülasyonu bulunmuştur (147). Hipertrofinin derecesi, artan Ih yoğunluğu (95) ve HCN kanallarının ekspresyon seviyeleri ile

pozitif olarak ilişkilidir (97, 148). Bu bulgular, HCN kanallarının upregülasyonu ile ventriküler disfonksiyon arasında doğrudan bir bağlantıyı güçlü bir şekilde desteklerken, Ih'nin upregülasyonunun altında yatan sinyal yolları şu ana kadar çok az anlaşılmıştır. Muhtemelen hem sinirsel uyarılar hem de hümorale faktörler sürece dahil olmaktadır. Özellikle, ventriküler remodelingi desteklediği iyi bilinen yüksek anjiyotensin II (149) ve ayrıca aldosteron (150), HCN kanal upregülasyonunda çok önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir. Bu, tip I anjiyotensin II reseptörünün (AT1-reseptörü) antagonistlerinin sadece kardiyak hipertrofiyi azaltmakla kalmayıp aynı zamanda Ih ve HCN2/HCN4 mRNA aşırı ekspresyonunu da engellediği bulgusu ile desteklenmektedir (151, 152). İlginç bir şekilde Ih'nin, spontan olarak aktif olan fetal ve neonatal ventriküler miyositlerde bol miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (63, 65, 153). Olgunlaşma sırasında, bu hücreler spontan aktivite üretme kapasitelerini kaybederler. Hem sıçanda hem de farelerde buna Ih ekspresyonunda ilerleyici bir azalma eşlik eder (63, 153). Bu nedenle, kardiyak hipertrofinin, hücrelerin fetal bir programa yeniden girişini ve HCN2 ve HCN4'ün düzenlenmesi ile ilgili gen ekspresyon paternlerinin yeniden aktifleşmesini tetiklediği varsayılabilir. Son zamanlarda, ventriküler hipertrofinin sıçan modellerinde, HCN2 ve HCN4'ün upregülasyonuna, iki mikroRNA'nın, miR-1 (MicroRNA-1) ve miR-133 (MicroRNA 133)'ün belirgin azalmasının eşlik ettiği bulunmuştur. Tersine, bu miRNA'ların ekspresyonu, hipertrofik kardiyomiyositlerde HCN2/4'ün aşırı ekspresyonunu önlemiştir (154). Bu bulgular, bu iki miRNA'nın downregülasyonunun, normal kalp gelişimi sırasında ve ayrıca hastalıklı kalbin remodelingi sırasında Ih ekspresyonunda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

2.8. Kalp Hücrelerinde HCN Kanallarının Ekspresyonu

In situ hibridizasyon, RT-PCR ve Northern blot analizi, kalpte üç HCN kanal tipini (HCN1, 2 ve 4) tanımlamıştır. Murin ve tavşan sinoatriyal nodda HCN4, açık ara en baskın HCN kanal tipidir ve bu özel izoform primer pacemaker potansiyelinin oluşumunda anahtar rol oynar. HCN4'e ek olarak, sinoatriyal nodda düşük ila orta miktarda HCN1 ve HCN2 transkriptleri tespit edilmiştir. Şimdiye kadar, insan sinoatriyal nodunda HCN kanallarının ifadesi hakkında hiçbir veri mevcut değildir. Memelilerin dinlenme kalp atış hızı vücut ağırlıkları ile ilişkilidir: küçük türlerde

büyük türlere göre çok daha hızlıdır (örneğin, fare: dakikada 600 atım; insan: dakikada 70 atım). Bununla birlikte, dikkat çekici bir şekilde, şimdiye kadar araştırılan tüm memelilerde sinoatriyal If akımlarının kinetiği büyük ölçüde aynıdır. Benzer şekilde, özel HCN kanal tiplerinin primer sekansları memelilerde yüksek oranda benzerdir (%90'ın üzerinde dizi özdeşliği). Bu nedenle, kalp atım hızındaki değişikliğin HCN kanallarının biyofiziksel özelliklerindeki farklılıklardan kaynaklanması olası değildir. Hız, evrimsel olarak pacemaker potansiyeline katkıda bulunan HCN ve/veya diğer iyon kanallarının ekspresyon seviyelerini değiştirerek düzenlenmektedir. Örneğin, sinoatriyal nod hücrelerinde HCN4'ün upregülasyonu, daha belirgin bir diyastolik depolarizasyon ile sonuçlanacak ve böylece bazal kalp hızında artışa yol açacaktır.

HCN kanalları ayrıca atriyal ve ventriküler miyositlerde de bulunur. Bu hücre tiplerinde HCN2 ana izoformdur. Küçük miktarlarda HCN4 insan ve farede bulunmuştur, ancak tavşan kardiyomiyositlerinde bulunmamıştır. Özetle, veriler HCN4 ekspresyonunun kalbin iletim dokusunda spontan aktifleşebilen hücrelerle korele olduğunu, buna rağmen HCN2 ekspresyonunun esasen spontane olmayan aktif miyositlerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, fare kalbindeki HCN kanal ekspresyonunun embriyonik gelişim sırasında değiştiğine dair son bulgular ile desteklenmektedir (153). Spontan atım gösteren erken ventriküler miyositlerde (postcoital 9.gün) baskın olarak eksprese edilen HCN izoformları HCN4 ve HCN1'dir. Spontan atım yeteneğini kaybetmiş geç embriyonik miyositlerde (postcoital 18. gün, yani doğumdan 1 gün önce) çoğunlukla HCN2 ana izoform haline gelir. HCN mRNA'sının ekspresyon paternindeki kalitatif değişiklik, toplam HCN mRNA miktarında %80'lik bir azalma ve ventriküler If'nin akım yoğunluğundaki azalma ile benzer şekilde paraleldir.

Kalp kasındaki If akımlarının fizyolojik ilişkileri net değildir. Ventriküler ve atriyal miyositlerden gelen If akımları, daha yavaş kinetik ile aktive olma eğilimindedir ve SAN'ın If'sinden çok daha düşük pik dansiteleri ortaya çıkarır (7, 155, 156). Ek olarak, ventriküler If'nin $V_{0.5}$ 'i, sinoatriyal nodun If'sine (-65 ila -90 mV aralığı) kıyasla daha fazla hiperpolarize edici voltajlara (-95 ila -135 mV aralığı) kaydırılır. Ventriküler If aktivasyon eşiği normal istirahat membran potansiyelinden uzak olduğu için, bu akım normal fizyolojik olmayan durumlarda oluşmalıdır. Bununla birlikte, hipertrofik veya

yetersiz kalpte, If'nin fizyolojik bir voltaj aralığında aktive olduğu gösterilmiştir; bu durum, bahsedilen koşullar altında oluşan aritmilere artan yakınlıkla bağlantılı olabilecek bir gözlemdir (157). Farklı kalp hücrelerinde aktivasyon eşiği aralığının geniş olmasının nedeni şu ana kadar açıklanamamıştır. Dört HCN kanal türünün $V_{0.5}$ değerleri birbirinden önemli ölçüde ayrılmadığından, kanal alt tiplerinin değişikliği farklılıkları açıklamak için yeterli değildir.

If akımlarının aktivasyon kinetiği ve orta akım potansiyelleri çeşitli deneysel parametrelerden etkilenir. Akımlar geçmişte çok farklı koşullar altında araştırıldığından, klonlanmış kanallar ile doğal If kanalları arasında kesin bir karşılaştırma yapmak çok zordur. Mevcut analiz durumunda, her iki tür kanalın genel biyofiziksel özellikleri arasında kesin bir farklılık bulunmamaktadır. Bu bulgu, doğal If akımlarının homomerik HCN kanalları tarafından üretildiği fikrini desteklemektedir. Bazı hücre tiplerinde belirli HCN kanalı alt birimlerinin neredeyse ekspresyonunun çok az olması (örneğin, ventriküler miyositler için HCN2) homomerik kanalların varlığı düşüncesini desteklemektedir. Öte yandan, heterolog ekspresyon sistemlerinde, farklı HCN kanal alt birimlerinin yeni özelliklere sahip heteromerler oluşturmak üzere birleşebileceğine dair kanıtlar vardır (15, 45). Ek olarak, yardımcı subunitler, HCN kanal alt birimleri ile ilişkilendirilebilir. Kardiyak gecikme düzenleyici kanal olan IKr'nin ekspresyonu ile ilişkisi bulunan MiRP1 proteininin, HCN1 ve HCN2 ile birlikte eksprese edildiğinde bu kanalların ekspresyonunu artırdığı ve kanallardan geçen akımın aktivasyon kinetiğini hızlandırdığı bildirilmiştir (73). Yapılan bir çalışmada HCN kanal aktivitesinin hücrenel faktörler tarafından kontrol edildiğine dair daha fazla kanıtın varlığı gösterilmiştir (64). Bu çalışmada If'nin orta nokta potansiyelinin yetişkin sıçan ventriküler miyositlerinde neonatal ventriküler miyositlere göre yaklaşık 20 mV daha negatif olduğu bildirilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, HCN2 alt biriminin adenoviral aşırı ekspresyonu, her iki hücre tipinde de If akımını güçlü bir şekilde arttırmasına rağmen ilgili orta nokta potansiyelleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Yetişkin hücrelerin $V_{0.5}$ 'i, neonatal hücrelerin $V_{0.5}$ 'inden 20 mV daha negatif kalmıştır. Bu sonuç, HCN2 kanalının voltaj bağımlılığının yenidoğan ve yetişkin kardiyak miyositlerinde farklı şekilde düzenlendiğini gösterir. Kardiyak HCN kanallarının gelişimsel düzenlenmesinin altında yatan moleküler yollar henüz bilinmemektedir.

HCN2 ve HCN4 genlerinin downregulasyonunun hipotiroidizmde bradikardi indüksiyonunun altında yatabileceği, her iki kanalın upregulasyonunun tiroid hormonunun pozitif kronotropik etkisi ile bağlantılı olduğu öne sürülmüştür (158, 159).

Kardiyak If kanalları endokrin sistemden de etkilenebilir. Son zamanlarda HCN2 ve HCN4 genlerinin transkripsiyonunun tiroit hormonu tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir.

Özetle, kardiyak If kanallarının heterojenliği, alt birim kompozisyonunun ve stokiyometrinin değişmesi, yardımcı alt birimlerin yukarı ve aşağı regülasyonu ve kanal komplekslerinin posttranslasyonel modifikasyonu gibi çeşitli mekanizmaların kombinasyonu ile oluşabilir.

2.9. HCN Kanalları ve İnflamasyon

Daha önce hem nöropatik hem de enflamatuvar ağrı modeli oluşturulmuş hayvan çalışmalarında, DRG ve trigeminal ganglion nöronlarında artan Ih yoğunluğu ve aktivasyon hızı gözlenmiştir (91, 135, 137, 160-162). Spinal sinir ligasyonu, dorsal kök ganglion nöronlarında HCN kanal ekspresyonunun azalmasına (91, 163); iltihaplanma ise trigeminal ganglionda artmış HCN kanal ekspresyonuna neden olmuştur (164, 165). Bununla birlikte çok az çalışma, yaralı veya enfekte nöronlarda HCN kanal ekspresyonunun değiştiğini göstermiştir. Özel olmayan bir HCN kanal bloker olan ZD7288'in sistemik uygulaması, spinal sinir hasarının etkilerini, in vivo ve in vitro çalışmalarda tersine çevirmiştir (91, 136-138, 166).

Nöronlar ve kardiyomiyositler dışında depolarize olmayan hücrelerde HCN kanal ekspresyonuna dair veriler oldukça kısıtlıdır. Daha önce yapılan bir çalışmada mikrogliaya benzer şekilde osteoklastlarda da HCN kanallarının hücre homeostazına katkıda bulunmak için varlığı ve işlevi olduğu bildirilmiştir (167). Bu çalışmada osteoklast membrandaki Ih akımına ağırlıklı olarak HCN4 alt birimlerinin aracılık ettiği ve çinko varlığında osteoklast farklılaşmasının düzenlediği açıklanmıştır. Osteoklastlar hematopoietik kökenlidir ve kemik iliği makrofajlarından farklı özelliklere sahiptirler (168). In vivo soy izleme çalışmalarında, yetişkin parankimal mikroglianın da embriyonik 8. günden önce ortaya çıkan ilkel miyeloid

progenitörlerden türediğini ortaya konmuştur ve mikroglia mononükleer fagosit sistemindeki ontogenetik olarak farklı bir popülasyon olarak tanımlanmıştır (169, 170). Bununla birlikte mikroglia ve makrofajlar, fagositik aktivite ile hücre homeostazını koruma yeteneği ve farklı aktivasyon fenotiplerine doğru polarizasyon kapasitesi gibi kritik fonksiyonların yanı sıra marker ekspresyon paternleri de dahil olmak üzere birçok ortak özelliğe sahiptir (171, 172).

HCN2 alt biriminin RNA ekspresyonunun, LPS uygulanan proenflamatuar mikroglialarda önemli ölçüde down regüle edildiği ve IL-4 ile tedavi edilen antienflamatuar mikroglialarda upregüle edildiği gösterilmiştir (173). HCN kanallarının bu ekspresyon modelleri, nöroenflamatuar süreçler sırasında mikroglia polarizasyonunu daha fazla karakterize etmek için işaretler olarak hizmet edebilir. Aynı çalışmada, HCN kanallarının blokajının sadece membran potansiyelini düzenlemekle kalmayıp, aynı zamanda mikroglia alt kümelerinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun yavaş ve sürekli bir artışıyla da ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu morfolojik değişiklikler, göç, proliferasyon, fagositoz, sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin sekresyonu gibi mikroglia işlevlerinde önemli bir rol oynamaktadır (174, 175).

Mikroglial hücrelerdeki bu değişiklikler bize sistemik bir enflamasyonda, makrofajlarda da benzer değişikliklerin oluşabileceğini düşündürmektedir. Özellikle çağımızın en sık ölüm nedenlerinden biri olan kardiyovasküler hastalıkların patolojisinde endotelial enflamasyon önemli bir rol almaktadır. Obezite, sigara kullanımı, sedanter yaşam, stres gibi faktörlerin endotelial enflamasyon yoluyla ateroskleroza ve dolayısıyla kardiyovasküler hasara yol açtığı bilinmektedir. Enflamasyon varlığında, HCN kanallarının gen ekspresyon düzeylerinin bu sürecin en önemli iki hücresi olan vasküler endotel ve makrofajlarda da etkilenmesinin söz konusu olması muhtemeldir.

2.10. Sitokinler

Sitokinler, hücre sinyalleşmesinde görevli olan küçük proteinlerden oluşan (~5–25 kDa) geniş bir ailedir. Peptit yapıdadırlar. Sitoplazmaya girebilmek için hücre membranındaki çift katlı lipid tabakasını geçemezler. Etkilerini hücre yüzeyi

reseptörlerine bağlanarak gösterirler (176). Sitokinlerin immünomodülatör ajanlar olarak otokrin, parakrin ve endokrin sinyalleşmeden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Sitokinler kemokinleri, interferonları, interlökinleri, lenfokinleri ve tümör nekroz faktörlerini içerirken hormonlar ve büyüme faktörleri sitokinlere dahil değildir. Belirli bir sitokin birden fazla hücre tipi tarafından üretilebilir (177). Makrofajlar, B lenfositler, T lenfositler, mast hücreleri gibi bağışıklık hücreleri yanı sıra endotel hücreleri, fibroblastlar ve çeşitli stromal hücreler dahil olmak üzere geniş bir hücre yelpazesi tarafından üretilirler. Sitokinler belirli hücre popülasyonlarının olgunlaşmasını, büyümesini ve tepki vermesini, humoral ve hücresele bağışıklık cevabı arasındaki dengeyi düzenlerler. Enfeksiyon, enflamasyon, travma, sepsis ve kansere karşı konakçı bağışıklık yanıtında görev alırlar (178). Sitokinler sinyal iletiminde önemli bir rol alan hormonlardan farklıdırlar. Hormonlar belirli hücre türleri tarafından üretilir ve dolaşımda sitokinlerden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar.

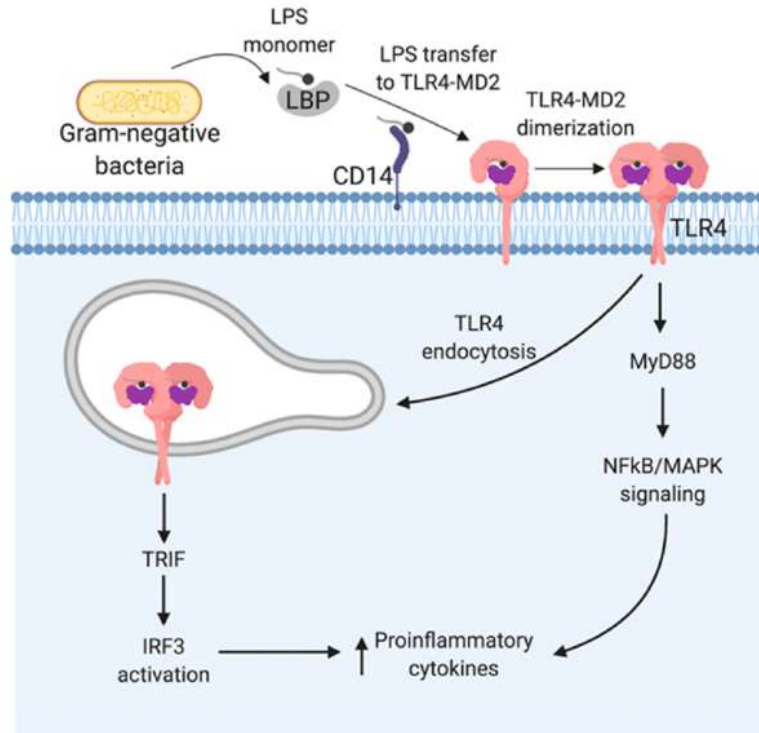
Endotoksinler ve ekzotoksinler, sitokinlerin en güçlü bakteriyel uyaranları arasındadır. Enfeksiyöz süreçler sırasında Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), interferon gama (IFN- γ) ve kemokinler gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimi enfeksiyonlara doğuştan gelen bağışıklık cevabını düzenler. Bununla birlikte sitokin fırtınasına yol açan aşırı üretim zararlı olabilir ve sepsis veya toksik şok sendromuna bağlı ölümlere sebep olabilir. Gram-negatif bakterilerin endotoksini olan LPS monositlerin/makrofajların aktivasyonundan sonra enflamasyonu başlatabilirler. LPS ve çok sayıda ekzotoksin ayrıca IL-1 β ve IL-18'in salınmasına yol açarak da enflamasyonu aktive eder. Bazı ekzotoksinler süperantijenler gibi davranır ve bu nedenle T-lenfositler tarafından sitokinlerin salınımını aktive ederler (179). Tablo 2'de bazı önemli proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler, üretildikleri hücreler ve özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2. Proinflamatuvar ve Antiinflamatuvar Sitokinler. Petricevich, 2010'dan çevrilerek alınmıştır (180)

Proinflamatuvar Sitokinler	Üretildiği hücre	Biyolojik aktivitesi
IL-1	Makrofaj ve antijen sunan hücreler (APC)	APC -T hücre etkileşimi ile akut faz reaktanlarının üretimini ve ateşi başlatır.
IL-2	Th1 ve NK hücreleri	B hücre proliferasyonunu, T hücre aktivasyonunu ve NK aktivitesini başlatır.
IL-6	Th2, APC ve diğer somatik hücreler	Akut faz reaksiyonu, trombopoez, B hücre proliferasyonunu başlatır, T hücreleri üzerinde IL-1 ve TNF- α ile sinerjistik etki gösterir.
IL-8	Makrofaj ve diğer somatik hücreler	Nötrofil ve Thücreleri için kemoatraktan etki gösterir
TNF-α	Monosit ve makrofajlar	Lipid metabolizması, pıhtılaşma ve endotel fonksiyonu üzerinde geniş kapsamlı biyolojik etkileri vardır. Enflamasyon ve ateşi indükler, akut faz reaksiyonu, kilo kaybı ve antitümöral etkileri bulunur.
IFN-γ	Aktive Th ve NK hücreleri	Tüm somatik hücrelerde MHC I'i indükler, MHC II'yi, APC'yi ve somatik hücreleri indükler, makrofajları, nötrofilleri, NK hücrelerini aktive eder, bağışıklığın hücre aracılı antiviral etkilerini destekler.
Antiinflamatuvar Sitokinler		
IL-4	Th2 ve mast hücreleri	B hücre proliferasyonunu, eozinofil ve mast hücre büyümesi ve fonksiyonunu, B hücreleri üzerinde IgE ve sınıf II MHC ekspresyonunu, monoamin üretiminin inhibisyonunu sağlar.
IL-10	Makrofaj ve lenfositler	TNF- α ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek anti-inflamatuvar aktivite gösterir.

LPS, Gram negatif bakterilerin hücre duvarının önemli bir bileşenidir. Üç yapısal elementten oluşur: bir çekirdek oligosakkarit, tekrarlayan polisakkarit dizilerinden oluşan bir O spesifik zincir ve proenflamatuvar yanıtta sorumlu lipid A bileşeni (181). LPS'in endotel hücrelerinin yüzeyine bağlanması, proenflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve bazen endotelyal apoptoza kadar giden endotel aktivasyonu ile sonuçlanır. LPS ayrıca endotel fonksiyonunu modüle eden proenflamatuvar mediatörlerin üretimi için monositleri ve makrofajları uyarak aktive

eder (182). Bu sepsis tablosunun klinik belirtilerine katkıda bulunan paralel olaylar dizisini başlatan mekanizmadır. Çalışmamızda kardiovasküler enflamasyon/sepsis modeli oluşturmak üzere LPS kullanmamızın sebebi bu mekanizma ile açıklanabilir.



Şekil 19. TLR4 reseptörleri aracılığıyla LPS tanınması.

LPS bağlayıcı protein (LBP) gram negatif bakterilerden LPS monomerini bağlayarak soluble veya membrana bağlı CD14 molekülüne teslim eder. CD14 LPS'i TLR4/MD2 reseptör kompleksinin ektodomainine transfer eder, böylece reseptör dimerize hale geçer. Dimerizasyona neden olan bu konformasyonel değişiklik, stoplazmik TIR (Toll-interlökin reseptör-1) domaininin MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88)'e bağlanmasını sağlar. Bu bağlanma Nuklear Factor Kappa-B (NF-κB) ve Mitogen-Aktive Protein Kinaz (MAPK)'ı aktive eder ve çeşitli proenflamatuar sitokinlerin transkripsiyonu başlar. Aynı zamanda LPS-TLR4/MD-2 kompleksinin endositozu da TRIF ile IRF3 ve tip-1 interferon uyarılmasına aracılık eden yolağı başlatır (183).



3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (PYO.TIP.1904.21.017).

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan malzemeler

- ❖ Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12 medium (DMEM/F12, Gibco, 12-634-028)
- ❖ Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 11550356)
- ❖ Penisilin/streptomisin (10003927)
- ❖ Tripsin-EDTA (Etilendiamintetraasetik asid) (Gibco, 25200072)
- ❖ Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma, D8418, CAS: 67-68-5)
- ❖ 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT, M5655, CAS: 298-93-1)
- ❖ Trizol RNA izolasyon kiti, (GENEzol™ Reagent, Geneaid, #GZR100)
- ❖ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O55:B5(Sigma, L2880)
- ❖ Sigma steril enjektör filtresi 0.22 µm, metanol (Sigma, 34860)
- ❖ Etanol (Sigma, 32205, CAS: 64-17-5)
- ❖ Dulbecco's phosphate buffered saline (dPBS, Gibco, 14190144)
- ❖ 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Scientific, 62248, CAS: 28718-90-3)
- ❖ Prolong Gold® Antifade Reagent (Thermo Scientific, P36934)
- ❖ Ibbidi® 12-well slide (ibidi, 81201)
- ❖ Alexa-flour 488 sekonder antikor (abcam, ab150077)
- ❖ GENEzol™ RNA izolasyon kiti (Geneaid, MF14303)
- ❖ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, #23225)
- ❖ HCN1 rabbit monoklonal primer antikor (#78896, Cell signaling, US),
- ❖ HCN2 rabbit monoklonal primer antikor (#30835, Cell signaling, US),
- ❖ Anti-rabbit HRP konjugat sekonder antikor (Goat anti-rabbit HRP-IgG H&L, #65-6120, Thermo scientific, US)
- ❖ cOmplete™, Mini Proteaz Inhibitor Coctail (Roche, 11836153001)
- ❖ Taqman® universal master mix with UNG (Applied biosystems, 4440044)
- ❖ iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-rad, #1708891)

- ❖ GAPDH için qRT-PCR primer probu (Thermo scientific, Mm99999915_g1, 4331182)
- ❖ HCN1 için qRT-PCR primer probu (Thermo scientific, Mm00468832_m1, 4331182)
- ❖ HCN2 için qRT-PCR primer probu (Thermo scientific, Rn01408572_mH, 4331182)
- ❖ TNF-alfa ELISA kiti (AGF Bioscience, #EK710127)
- ❖ IL-1 ELISA kiti (AGF Bioscience, #EK711081)
- ❖ IL-2 ELISA kiti (AGF Bioscience, #EK710261)
- ❖ IL-4 ELISA kiti (AGF Bioscience, #EK710264)
- ❖ IL-10 ELISA kiti (AGF Bioscience, #EK710271)

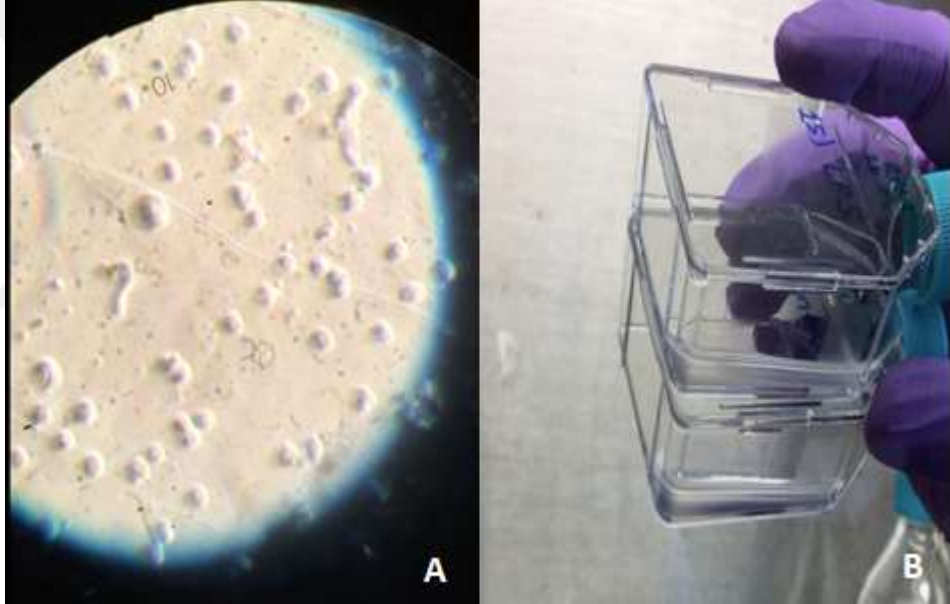
3.1.2. Kullanılan cihazlar

- ❖ Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)
- ❖ Isı bloğu (VWR, ABD)
- ❖ Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)
- ❖ Santrifüj (Nüve NF048, Türkiye)
- ❖ DNA sayacı: Nano-drop (Jenway Genova Nano, İngiltere)
- ❖ Isı döngü cihazı: Thermal Cyler GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD)
- ❖ Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- ❖ CO₂'li inkübatör (Thermo scientific, ABD)
- ❖ Laminar akımlı sınıf II kabin (Nüve, Türkiye)
- ❖ Kantitatif eş zamanlı PCR cihazı: Agilent Stratagene Mx3000P (Agilent, ABD)
- ❖ Western Blot Transfer Cihazı (Bio-Rad/Trans-Blot[®] Turbo, ABD)
- ❖ Görüntüleme sistemi (Bio-Rad/Chemidoc MP, ABD)
- ❖ Faz kontrast-floresans mikroskop (Olympus B51, Japan)
- ❖ Ultrasonutucu (NÜVE, Türkiye)
- ❖ Su banyosu (Memmert, ABD) Mikroplaka çalkalayıcı (Heidolph Titramax 1000, Almanya)
- ❖ Invert mikroskop (Zeiss Axiovert, Almanya)
- ❖ Mikroplaka okuyucu (TECAN, İsviçre)
- ❖ Mikropipet seti (Eppendorf, Almanya)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

Bu çalışmada LPS uygulamasıyla enflamasyon modeli oluşturmak üzere İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ve Fare makrofaj hücreleri (RAW 264.7) kullanılmış ve bu hücreler bağış yoluyla temin edilmiştir. RAW 264.7 hücreleri, Abelson murine leukemia virüsü ile indüklenmiş, farenin tümör dokusundan elde edilmiş tek katmanlı büyüyen yapışkan bir hücre hattıdır. HUVEC hücreleri insan göbek kordonundaki venlerin endotel hücrelerinden köken alan hücre hatlarıdır. Endotel hücre fonksiyonlarının tanımlanmasında en sık kullanılan hücre hatlarıdır. Hücre kültürü çalışmaları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan steril hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. HUVEC hücrelerinin kaldırıldıktan sonra 10X büyütmedeki mikroskopik görüntüsü (A) ve pasajlama öncesi flastaki görüntüsü (B)

3.2.2. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler çözüldükten sonra 25 ve 75 cm²'lik flastlarda çoğaltılarak uygun sayı ve konfluansa gelene kadar, %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin/Streptomisin içeren DMEM/F12 vasatında, %5 karbondioksit (CO₂) ve 37°C inkübatörde bekletildi. Hücrelerin konfluansı %80 ve üzerine ulaştığında hücreler 2 gruba bölündü. HUVEC hücre hattı tripsin/EDTA yardımıyla, RAW hücre hattı ise cell scraper ile kazınarak kaldırıldı ve pasajlanarak uygun plaka/petrilere ekildi. Gruplara ayrılan hücreler tekrar

uygun konfluansa ulaşınca enflamasyon grubuna LPS uygulandı. 6 saat sonra ilgili grupların medium sıvılarının bir kısmı alınarak ELISA (Enzim-linked immunosorbent assay) yöntemiyle sitokin tayini yapmak üzere -80°C'e kaldırıldı. Medium sıvılarının kalan kısmı kontrol ve ilaç gruplarına çapraz olarak uygulandı. 24 saat sonra hücreler RNA izolasyonu ve protein tayini yapmak üzere deney gününe kadar -80°C'e kaldırıldı.

3.2.3. Sitotoksisite testleri

Hücre canlılığının ölçülmesi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolyumbromür (MTT) testi yardımıyla yapıldı. MTT sulu özelteleri normal şartlarda sarı renkli olup, mitokondriyel redüktaz aktivitesi sonucunda suda çözünmeyen mor renkli formazan'a dönüşür. Bu sayede canlı hücrelerde görülen mitokondriyel redüktaz aktivitesi sayesinde oluşan mor renk kolorometrik prensip ile kantitatif olarak ölçülür. Bu test sonucunda elde edilen verilerde hücre canlılığının %70'in altına düştüğü durumda araştırılan ajan sitotoksik olarak kabul edilir. Çalışmamızda HUVEC ve RAW hücreleri uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin/EDTA (Etilen diamin tetraasetikasit) özeltisi yardımıyla kaldırdı. Kaldırma işlemleri ışık mikroskopu kullanılarak doğrulandıktan sonra taze hücre besiyeri eklenerek reaksiyon durduruldu. Oluşan özelti 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak pellet 1 ml besiyeri içerisinde çözüldü. 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 100 µl hacim olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra kuyucuklardan vasat uzaklaştırılarak hücrelere farklı konsantrasyon dahilinde taşıyıcı %0,1 DMSO (dimetilsülfoksit) ve LPS (10-3-1-0,3-0,1-0,03-0,01µg/ml) uygulanarak deney grupları oluşturuldu.

Belirlenen süre sonunda hücrelerden vasat uzaklaştırıldı ve MTT hücre vasatında 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilerek her bir kuyucuğa eklendi. Daha sonra plakalar karanlık ortamda 37°C'de 3 saat inkübe edildi ve süre sonunda vasat aspire edilerek uzaklaştırıldı. Plaka tabanında oluşan çözünmemiş kristallerin üzerine 100 µl DMSO eklenerek karışım homojen bir kıvama gelen kadar pipetaj yoluyla karıştırdı. Oluşan homojen karışımın 570 nm'deki absorbansları spektrofotometre cihazında ölçüldü.

3.2.4. Uygulanacak lipopolisakkaritin (LPS) hazırlanması,

MTT testinden elde edilen verilerle uygun LPS dozunun 1 µg/ml olduğuna karar verildi. 1 mg LPS 1 ml Phosphate Buffered Saline (PBS)'te çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon 100µl'lik alikotlara ayrılarak deneyler gerçekleştirilene kadar muhafaza edilmek üzere -80°C'e kaldırıldı. Deney gününde alikotlanmış numune 10 ml PBS içerisinde çözülerek deney gruplarına uygulandı.

3.2.5. Biyokimyasal Analizler

Enflamasyon ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrılan RAW ve HUVEC hücrelerinin kültür vasatı ilaç uygulamasından 6 saat sonra IL-1 (İnterlökin-1), IL-2 (İnterlökin-2), IL-4 (İnterlökin-4), IL-10 (İnterlökin-10) ve TNF-α (Tümör Nekroz Faktör- α) düzeylerini ölçmek üzere alındı. Kültür vasatı 3.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant partiküllerden arındırılarak çalışma gününe kadar saklanmak üzere -80°C'e kaldırıldı.

3.2.5.1. IL-1 seviyesinin ölçülmesi

IL-1 seviyesi, Human Interleukin 1 (IL-1) ELISA Kit (AFG Bioscience, EK711081) ile ölçüldü. Test prensibi sandwich ELISA'dır. Testin hassasiyeti 1,2 pg/mL olup, ölçüm aralığı 3-200 pg/mL'dir. Absorbans spektrofotometrede 450 nm'de okundu. Standart okumalarından elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyon değerleri ile grafik çizilip numune konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.5.2. IL-2 seviyesinin ölçülmesi

IL-2 seviyesi, Human Interleukin 2 (IL-2) ELISA Kit (AFG Bioscience, EK710261) ile ölçüldü. Test prensibi sandwich ELISA'dır. Testin hassasiyeti 10 pg/mL olup, ölçüm aralığı 50-1.000 pg/mL'dir. Absorbans spektrofotometrede 450 nm'de okundu. Standart okumalarından elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyon değerleri ile grafik çizilip numune konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.5.3. IL-4 seviyesinin ölçülmesi

IL-4 seviyesi, Human Interleukin 4 (IL-4) ELISA Kit (AFG Bioscience, EK710264) ile ölçüldü. Test prensibi sandwich ELISA'dır. Testin hassasiyeti 5,0 ng/L olup, ölçüm aralığı 20-400 ng/L'dir. Absorbans spektrofotometrede 450 nm'de okundu. Standart

okumalarından elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyon değerleri ile grafik çizilip numune konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.5.4. IL-10 seviyesinin ölçülmesi

IL-10 seviyesi, Human Interleukin 10 (IL-10) ELISA Kit (AFG Bioscience, EK710271) ile ölçüldü. Test prensibi sandwich ELISA'dır. Testin hassasiyeti 1,0 ng/L olup, ölçüm aralığı 10-300 ng/L'dir. Absorbans spektrofotometrede 450 nm'de okundu. Standart okumalarından elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyon değerleri ile grafik çizilip numune konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.5.5. TNF- α seviyesinin ölçülmesi

TNF- α seviyesi, Human Tumor necrosis factor α (TNF- α) ELISA Kit (AFG Bioscience, EK710127) ile ölçüldü. Test prensibi sandwich ELISA'dır. Testin hassasiyeti 2,0 ng/L olup, ölçüm aralığı 7-400 ng/L'dir. Absorbans spektrofotometrede 450 nm'de okundu. Standart okumalarından elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyon değerleri ile grafik çizilip numune konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.6. İmmünofloresans analizler

HCN1 ve HCN2'nin membran spesifik ekspresyonunun gözlemlenmesi için HCN1 ve HCN2'nin rekombinant antikoruyla immünofloresans yöntemle araştırılması tercih edilmiştir. HUWEC ve RAW hücreleri uygun konfluansa ulaştıktan sonra tripsin/EDTA çözeltisiyle muamele edilerek kaldırıldı. Kaldırılan hücreler, immünsitokimyasal analizler için 12-kuyucuklu mini çember lamaların (ibidi®) üzerine ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, canlılık analizlerinden elde edilen sonuçlardan hareketle, hücrelere LPS (1 μ g/ml) uygulandı. İmmünofloresans analizleri standart protokoller doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- 1- LPS uygulamasını takiben çember lamlardan vasat uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuk 3 kez 5'er dakika dPBS solüsyonuyla yıkandı.
- 2- Yıkamayı takiben kuyucuklara -20°C'de bekletilen metanol eklenerek 20 dakika boyunca -20°C'de fiksasyon için bekletildi.
- 3- Fikse edilen hücreler 3 kez 5'er dakika dPBS solüsyonuyla yıkanarak metanolün tamamen uzaklaştırılması ve hücrelerin rehidrate olmaları sağlandı.

- 4- Hücreler bloklama tamponu (%1 BSA+ 22,52 mg glisin+%0,1 Tween-20) kullanılarak non-spesifik bağlanmanın önlenmesi için 30 dakika boyunca blokladı.
- 5- Bloklama işlemini takiben 3 kez 5'er dakika dPBS ile yıkama basamağı tekrarlandı.
- 6- Hücreler bloklama solüsyonunda dilüe edilen HCN1 ve HCN2 rekombinant primer antikor ile gece boyu +4°C'de inkübe edildi.
- 7- İnkübasyonu takiben primer antikor geri alınarak, hücreler 3 kez 5'er dakika dPBS ile yıkandı.
- 8- Ortamdan dPBS aspire edildikten sonra uygun dalga boyunda görüntüleme işleminin yapılabilmesi için Alexa-fluor-488 sekonder antikor ile 1 saat boyunca inkübe edildi.
- 9- Yıkama işleminin tekrarlanmasından sonra çekirdek işaretlemesi için her bir kuyucuğa 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boya solüsyonu uygulandı.
- 10- Tekrar yıkama yapılarak DAPI solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı ve lam yapıştırma sıvısı yardımıyla lamelle kapatılarak en fazla 30 dakika içerisinde floresans mikroskop (Olympus, Japan) altında incelendi.
- 11- Lamlardan elde edilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarılarak ImageJ programıyla incelendi. Her bir hücredeki floresans yoğunluğu kontrol grubuna göre normalize edildi.

3.2.7. Total RNA izolasyon yöntemi

qRT-PCR analizlerinde kullanılacak olan RNA'lar, hücrelere LPS uygulandıktan sonra, GENEzol™ RNA izolasyon kiti ile hücrelerden izole edildi. LPS uygulamasını takiben flasklardan kaldırılan hücreler 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek ortam serum ve tripsin gibi aktif moleküllerden arındırıldı. Hücre pelleti dPBS'te çözülerek homojenize edildi ve RNA izolasyon kitinin kullanma kılavuzu doğrultusunda aşağıdaki işlemlerden geçirildi;

Homojenizasyon;

- 1- Hücre kültür alanından medium sıvısı uzaklaştırıldı.
- 2- Kültür kabı yüzey alanının cm^2 'si başına doğrudan 100 μl GENEzolTM reaktifi eklendi.
- 3- Hücreler birkaç kez pipetlenerek doğrudan kültür kabında parçalandı.
- 4- Örnek karışımı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- 5- Örnek yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne (RNaz free) aktarıldı.

Faz Ayrımı;

- 1- Numune homojenizasyonunda kullanılan 1 ml GENEzolTM reaktifi başına numuneye 200 μl kloroform eklendi.
- 2- Mikrosantrifüj tüpü 10 saniye vorteksle karıştırıldı.
- 3- Fazları ayırmak için numuneler 12–16.000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüjlendi.
- 4- En üstteki sulu faz yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne (RNaz free) aktarıldı.

RNA Presipitasyonu;

- 1- Sulu faza eş hacimde izopropanol eklendi ve ardından tüp birkaç kez alt üst çevrilerek karıştırıldı.
- 2- Numune karışımını oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- 3- Sıkı bir RNA peleti oluşturmak için numune 12–16.000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
- 4- Süpernatant dikkatlice çıkarıldı ve atıldı.

RNA Yıkama;

- 1- RNA peletini yıkamak için 1 ml %70 etanol eklendi ve ardından kısaca vortekslendi.
- 2- Numune 4°C'de 5 dakika boyunca 12–16.000 x g'de santrifüj edildi.
- 3- RNA peletiyle temas etmemeye dikkat ederek, süpernatant bir pipetle çıkarıldı.
- 4- RNA peleti oda sıcaklığında 5-10 dakika havayla kurutuldu.

RNA Suspansiyonu;

- 1- RNA peletini yeniden süspansiyon etmek için 20-50 μl RNaz Free Su eklendi.
- 2- RNA peletini çözmek için 55-60°C'de 10-15 dakika inkübe edildi.
- 3- İzole edilen RNA miktarı nanodrop yardımıyla ölçüldü.
- 4- A260/A280 oranı 1,9-2,1 aralığında olmayan örnekler analizler için kullanılmadı.

5- RNA örneđi, sonraki işlemlere kadar -80°C 'de muhafaza edildi.

3.2.8. İzole edilen RNA'lardan cDNA elde edilmesi

cDNA sentez kiti kullanılarak izole edilen RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA'nın oluşturulması için uygulanan ters transkripsiyon PCR reaksiyon içeriği Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. cDNA sentezi için kullanılan ters transkripsiyon PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (μl)
10x RT Buffer	2 μl
MgCl ₂	1,4 μl
dNTP mix	4 μl
RNase İnhibitör	1 μl
Oligo (dT) Primer	1 μl
iScript Reverse transcriptase	1 μl
RNA numunesi	2 μl
Nükleaz içermeyen su	7,6 μl
Toplam Hacim	20 μl

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi için aşağıdaki protokol takip edildi;

- 1- İzole edilen örnekler buz üzerinde çözüldü.
- 2- Kit içeriğinde bulunan tüm kimyasallar vorteks ile karıştırıldı.
- 3- Kitin içerisinde bulunan karışım hazırlanarak RNA karışımına eklendi. Kit içeriğinden revers transkriptaz enzimi en son olarak eklendi. Tüpler ters-düz edilerek iyice karıştırılması sağlandı.
- 4- Örnekler buz üzerinde 5 dakika boyunca inkübe edildikten sonra Tablo 4'deki PCR programı ile reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında elde edilen cDNA örnekleri eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yapılana kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

Tablo 4. Ters transkripsiyon PCR programı.

Aşama	Süre	Sıcaklık
Primer Bağlanması	5 dk.	65°C
	2 dk.	4°C
DNA Polimerizasyonu	30 dk.	37°C
RT İnaktivasyonu	5 dk.	95°C
	∞	4°C

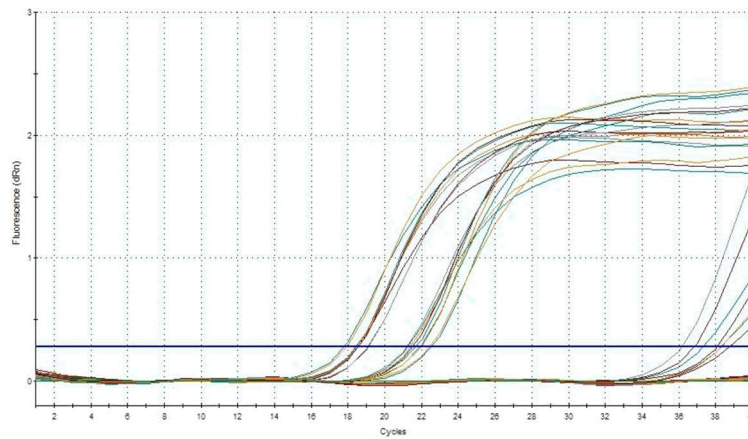
3.2.9. Eş zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi

Eş zamanlı PCR yöntemi, nükleik asitlerin çoğalmasıyla oluşan ürünlerin çeşitli problemlerle verdiği sinyalin kantitatif olarak ölçülebildiği bir yöntemdir. Alınan floresans yoğunluğu ile PCR ürünü arasında doğrudan korelasyon bulunduğu ve ayrıca oluşturulan sıcaklık döngüleri ile sinyalin oluşumu aynı anda ve aynı reaksiyonda gerçekleştiği için güvenli ve kullanışlıdır. Yapılan çalışmada spesifik dizilere bağlanan ve yüksek verimliliğe sahip prob sistemi olan iki-ışaretleli TaqMan® problemler kullanıldı. Bu yöntemde problemler bağlandıktan sonra PCR primerleri diziyeye bağlanır ve Taq polimeraz ile uzama gerçekleşir. Bu uzama işlemi esansında Taq polimerazın 5'-ekzonükleaz aktivitesi sayesinde, proba bağlı florofofor kesilerek floresans ışımaya gerçekleşir. Araştırılacak olan HCN1 ve HCN2 transkriptinin incelenmesi için transkript boyutu ve özellikleri göz önünde bulundurularak qRT-PCR yöntemi tercih edilmiştir.

3.2.10. HCN1 ve HCN2 gen ifade düzeylerinin ölçümü

HCN1 qRT-PCR'u için "TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG" ve "TaqMan® HCN1 primer prob (Mm00468832_m1, 4331182) kullanıldı. HCN2 qRT-PCR'u için "TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG" ve "TaqMan® HCN2 primer prob (Rn01408572_mH, 4331182) kullanıldı. Ekspresyon seviyelerinin normalizasyonu için endojen kontrol olarak "TaqMan® GAPDH primer prob (Mm99999915_g1, 4331182)" kullanıldı. TaqMan® problemler ve örneklerden elde edilen cDNA kullanılarak qRT-PCR analiz işlemi aşağıda gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

- 1- Örneklerden elde edilen cDNA'lar, TaqMan® HCN1, TaqMan® HCN2 ve GAPDH primer problemler buz üzerinde çözöldü.
- 2- "TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG" hafifçe vortekslendi.
- 3- Yapılacak olan her bir assay için reaksiyon sayıları üçer tekrarlı olmak üzere hesaplandı.
- 4- Örneklerden elde edilen cDNA'lar her biri için bir HCN1 assay, HCN2 assay, bir endojen kontrol GAPDH assay ve bir kalıp içermeyen kontrol olacak şekilde tasarlandı.
- 5- qRT-PCR reaksiyonu Tablo 5'de gösterildiği gibi içerik ve miktar olarak hazırlandı. Her bir assay farklı steril 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerinde toplamda 20µl hacimde olacak şekilde hazırlanarak reaksiyondan önce hafifçe karıştırıldı.
- 6- Oluşturulan qRT-PCR karışımı ve örneklerden elde edilen cDNA örnekleri, üçer tekrarlı olacak şekilde kullanılan qRT-PCR cihazına uygun 96-kuyucuklu plakalar içersine mikropipetler yardımıyla aktarıldı ve plaka eş zamanlı PCR cihazına yerleştirildi.
- 7- qRT-PCR programı Tablo 6'da gösterilen şekilde ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirildi.
- 8- qRT-PCR reaksiyonunun tamamlanmasından sonra rölatif HCN1 ve HCN2 gen ekspresyon düzeyleri HCN1 ve HCN2 CT değerlerinin, endojen kontrol olan GAPDH CT (cycle treshold) değerine normalize edildiği $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplandı (Şekil 6).



Şekil 6. PCR reaksiyonu sonrası elde edilen temsili amplifikasyon grafiği

Tablo 5. qRT-PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Bir Reaksiyon İçin Hacim
cDNA	2 µl
TaqMan® primer prob	1 µl
TaqMan® Universal Master Mix II, with	10 µl
Nükleaz İçermeyen Su	7 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 6. Gen ekspresyon düzeylerinin tayin edildiği RT-PCR programı

	Sıcaklık	Süre
UNG Aktivasyonu	50°C	2 dk
Enzim Aktivasyonu	95°C	10 dk
Denaturasyon	95°C	15 sn. (40 döngü)
Bağlanma/Uzama	60°C	5 dk. (40 döngü)

3.2.11. Total protein miktarının tayin edilmesi

Total protein miktar tayini ticari kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi, proteinlerin alkali bir çözelti içinde Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgemesi ve bikinkoninik asit tarafından mor renk oluşumuna neden olmasıdır (biüre reaksiyonu) (184). Rengin şiddeti protein yoğunluğuna bağlı olarak artmaktadır. Kitin önerdiği protokole göre stok çözelti (2 mg/mL) dilüe edilerek BCA standartları hazırlandı (2.000, 1.500, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/mL). Kit içeriğindeki solüsyon A ve B, örnek başına 200 µL olacak şekilde toplam hacim hesaplanarak sırasıyla 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlandı. BCA standartları, 1:2, 1:5 ve 1:10 oranında steril saf su ile dilüe edilen örnekler 10 µL hacimde çift tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaya yerleştirildi. Çalışma çözeltisinden 200 µL örneklerin üzerine ilave edildi. Mikropalaka kapatılarak hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C etüvde 30 dk süreyle bekletildi. Oluşan mor renkli kompleks mikropalaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda okundu. Standartların absorbansları kullanılarak konsantrasyon- absorbans eğrisi çizildi. Bu grafiğin denklemine numunelerden elde edilen absorbanslar yerleştirilerek örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı. Dilüsyon oranlarından elde edilen sonuçlara göre detection range'e uyan örnek konsantrasyonları kullanıldı.

3.2.12. Western Blot analizi

3.2.12.1. Örneklerin hazırlanması

Hücreler -80 °C'lik derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra buz üstünde çözüldü. Çözülen hücreler besiyerinde yeniden uygun konfluansa ulaştıktan sonra soğuk PBS ile kültür şişesi yıkandı. RAW hücreleri cell scraper ile kazıyarak, HUVEC hücreleri ise tripsin/EDTA çözeltisiyle muamele edilerek kaldırıldı. Steril cam tüplere alınan hücreler 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Çökelti halinde dipte kalan hücreler alınarak 1/10 oranında RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) bufferda çözüldü ve 45 dk shakerda çalkalandı. Proteaz inhibitör olarak cOmplete Mini Proteaz Inhibitor tablets-Roche kullanıldı. 30 dk buz ile inkübasyonun ardından tekrar 12.000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Bu aşamadan sonra parçalanmış hale gelen hücrelerden 100 µL alındı ve üzerine 50 µL Sample Buffer ilave edilerek karışım vortekslendi. Örnekler kuru banyo inkübatöründe 95 °C'de 5 dk süreyle ısıtılarak proteinlerin denatürasyonu sağlandı ve sonrasında numuneler buz içerisine transfer edilerek 10 dk bekletildi.

3.2.12.2. Jellerin hazırlanması

1,5 mm'lik camlar jel dökme standına yerleştirildi (Şekil 7, A) . Su ile sızdırma kontrolü yapıldıktan sonra ayırma jeli için Tablo 7'e göre belirtilen miktardaki malzemeler sırayla falkon tüpe eklendi. APS (Amonyum persülfat) ve TEMED (tetramethylethylenediamine) polimerizasyon hemen başladığı için tüpe en son ilave edildi. Ayırma jeli karışımı üstten 3 cm boşluk kalacak şekilde camlar arasına döküldü. Üzerine izopropil alkol ilave edildi. Alt jel donduktan sonra izopropil alkol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. Tablo 8'e göre hazırlanan yükleme jelindeki malzemeler APS ve TEMED en son eklenecek şekilde falkon tüpte karıştırıldı. Karışım alt jelin üzerine camların üst sınırına kadar ilave edildi. 10 kuyucuklu tarak üst jelin içine yerleştirildi. Jel kuruyuncaya kadar stantta bekletildi. Jel kurduktan sonra tarak çıkarıldı.



Şekil 7. Jel dökme standına jellerin yerleştirilmesi (A). Numune yüklemesi yapılmış jellerin elektroforez tankına yüklenip elektrik alana maruz bırakılması (B).

Tablo 7. %10'luk Ayırma Jelinin İçeriği

Bileşen	Hacim
Lower Tris (1,5 M, pH 8,8)-%20SDS	2,5 ml
Acrilamid/Bisacrilamid (%30)	3,34 ml
Amonyum persülfat (APS, %10)	50 µL
TEMED	7,5 µL

Tablo 8. %5'lik Yükleme Jelinin İçeriği

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	2.26 ml
Upper Tris(1 M, pH 8,8)-%20SDS	1 ml
Acrilamid/Bisacrilamid (%30)	670 µL
Amonyum persülfat (APS, %10)	40 µL
TEMED	4 µL

Her numunedeki protein miktarları BCA yöntemleriyle ile belirlendikten sonra %10'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid (SDS-PAGE) ayırma jeli ve %5'lik SDS-PAGE yükleme jeli hazırlandı ve tarakla ayrılmış her bir kuyucuğa eşit miktarda protein (50 µg) içerecek şekilde örnekler yüklendi.

3.2.12.3. Elektroforez

Camlar arasında bulunan jeller stanttan alınarak elektroforez tankına yerleştirildi (Şekil 7, B). Tankın içine belirtilen kısma kadar yürütme tamponu ilave edildi. Taraklar çıkarıldıktan sonra yürütme tamponu ile kuyucukların içi yıkanarak açıklığı kontrol edildi. Önceden protein miktar tayini sonucuna göre her bir kuyucukta toplam protein 50 µg olacak şekilde hesaplanan hacimdeki örnekler kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa 3 µL protein markerı diğer kuyucuklara örnekler yüklendi. Son kuyu ise boş bırakıldı. Güç kaynağı örnekler ayırma jeline geçinceye kadar 90 V daha sonra ayırma jeline geçince ise 120 volta ayarlanarak yaklaşık iki saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

3.2.12.4. Transfer

75 kDa ağırlığındaki HCN1 ve 105 kDa ağırlığındaki HCN2 proteinin tayini için %10'lik jelde yürütülen proteinlerin transfer edildiği membranlar kullanıldı. Elektroforez işleminin ardından camlar spatula ile dikkatlice ayrıldı. Jellerin kuyucukların bulunduğu üst kısımlar kesilerek uzaklaştırıldı. Jeller içinde transfer tamponu bulunan kaba alındı. Mini jellerle aynı boyutta kesilmiş olan 0,45 µm'lik poliviniliden florür (PVDF) membranlar 5 dk süreyle metanol içinde bekletilerek aktifleştirildikten sonra 1X transfer çözeltisi ile 5 dakika muamele edildi. Daha sonra distile suda yıkanan membranlar jellerin bulunduğu kaptaki jellerin altına yerleştirildi. Semidry Blotter cihazına sıra ile 2 parça ped, 2 parça blot kâğıdı ve jel konuldu. Üzerine membran dikkatlice yerleştirildi ve arada kalabilecek hava kabarcıkları dikkatlice uzaklaştırıldı. İki parça blot kâğıdı, 2 parça ped konuldu ve transfer çözeltisi ile iyice ıslatıldı. Membranın olduğu kısım altta kalacak şekilde blotlama cihazı içerisine konuldu ve cihazın kapağı kapatıldı. 3 mA/cm² akımda 1 saatte blotlama işlemi yapıldı (Bio-rad).

3.2.12.5. Bloklama

Transfer işleminden sonra non-spesifik bağlanmayı engellemek için örnekler Tris tamponlu Salin-tween (TBS-T %0,01) içinde %5 yağsız süt tozu ile bloke edildi. Membranlar içinde bloklama çözeltisi bulunan küçük kaplar içine alınarak oda ısısında 1 saat süreyle 90 rpm devir hızında orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bloklama

işlemleri birlikte proteinler dışında kalan boş alanların kapatılarak antikorların membranın spesifik olmayan bölgeleriyle etkileşimi en aza indirilmiş oldu.

3.2.12.6. Primer ve sekonder antikor uygulaması

Proteine özgü primer antikorlar ve sekonder antikorlar prospektusta yazan dilüsyon oranında (1:10.000) bloklama çözeltisi ile seyreltilerek hazırlandı. Bloklama işleminin ardından membranlar daha sonra üç kez TBS-T solüsyonuyla 5 dakika boyunca yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranlar gece boyu +4 °C'deki soğutmalı çalkalayıcı inkübatörde 90 rpm devir hızında primer antikor çözeltileriyle inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda membranlarda TBS-T yıkaması 3 kez daha tekrarlanarak membranlar anti-rabbit HRP bağlı sekonder antikorlar (Goat anti-rabbit HRP-IgG H&L, #65-6120, Thermo scientific, US) ile oda ısısında iki saat inkübe edildi.

3.2.12.7. Görüntüleme

Sekonder antikor uygulamasının ardından membranlar TBS-T ile 3 kere 5 dk süreyle çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Pierce™ ECL Western Blotting Substrate veya SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate kitleri içindeki peroksit ve luminol çözeltilerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen 1 mL'lik çözelti tüm membran üzerine pipetle uygulandı. Çözeltiyle 5 dk boyunca inkübasyonun ardından çözelti uzaklaştırıldı ve ChemiDoc MP (Biorad, US) cihazı ile kemilüminesan görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonrasında bilgisayara aktarılan fotoğraflarda beta-aktin dahili kontrol olarak kullanılarak göreceli yoğunluklar ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, US) ile hesaplandı.

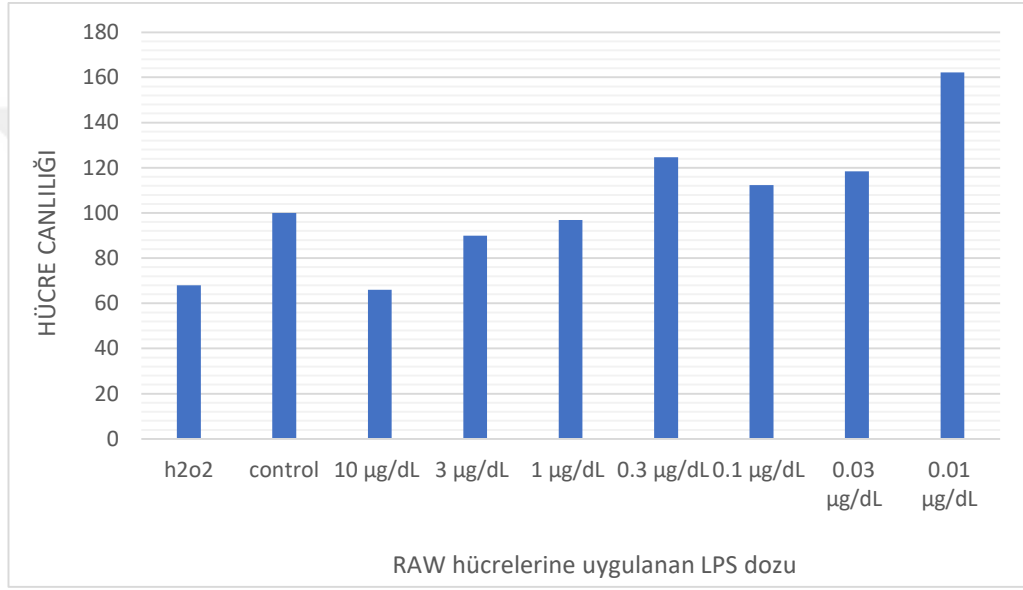
3.3. İstatistiksel Analiz

Deneyler sonucunda elde edilen tüm veriler Graphpad Prism (v9.0) ile analiz edildi. Veri dağılımının belirlenmesi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Western blot ve PCR sonuçlarında, normal dağılıma uyan veriler için One-Way Anova testi kullanılırken, normal dağılıma uymayan veriler Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Tukey ve Duncan testleri ile değerlendirildi. Sitokin değerlerinin sonuçları Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. P değeri 0,05'ten küçük olarak anlamlı olarak kabul edildi.

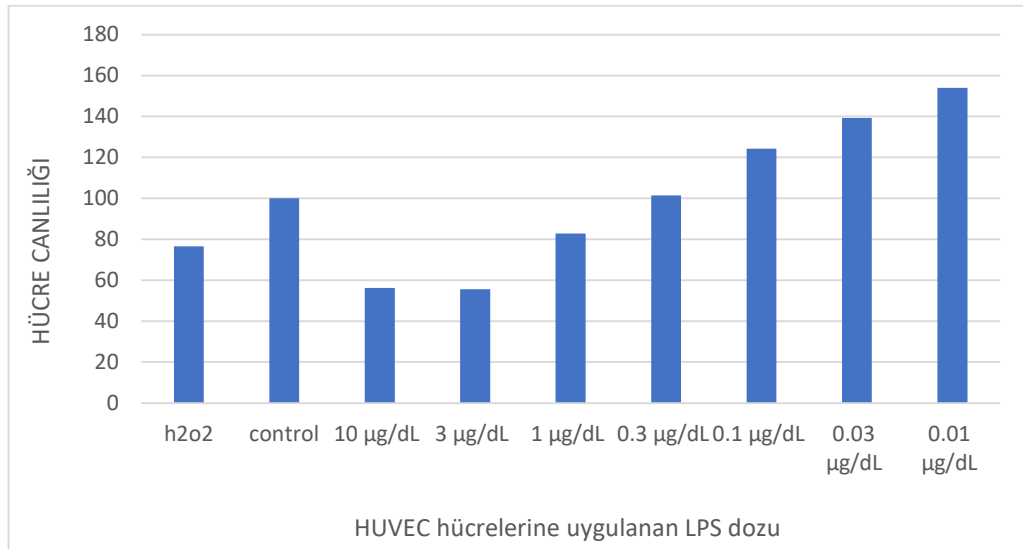
4. BULGULAR

4.1. Sitotoksikite Testlerinin Sonuçları

LPS, hücre hatlarına 6 saat süreyle artan logaritmik konsantrasyonlarda (0,01-0,03-0,1-0,3-1-3-10 $\mu\text{g}/\text{dL}$) uygulanarak MTT yöntemiyle sitotoksik olmayan konsantrasyonları belirlendi. LPS RAW hücre hattında 3 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 'lik dozdan itibaren hücre canlılığını azaltmaya başladı ve daha yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterdi (Şekil 8). LPS HUVEC hücre hattında ise 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 'lik dozdan itibaren hücre canlılığını azaltmaya başladı ve daha yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterdi (Şekil 9).



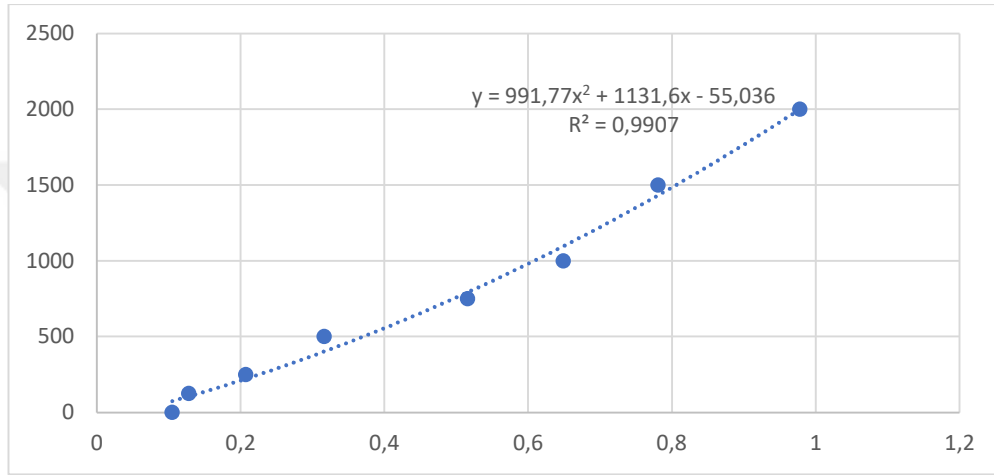
Şekil 8. LPS'in artan konsantrasyonlarının RAW hücrelerinin canlılığına olan etkisi



Şekil 9. LPS'in artan konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinin canlılığına olan etkisi

4.2. BCA Yöntemi ile Ölçülen Protein Konsantrasyonları

Numunelerin protein konsantrasyonu standart çözeltilerin absorbans konsantrasyon grafiğinden (Şekil 10) elde edilen denkleme göre hesaplandı. Üç tekrar sonucu elde edilen verilerin ortalaması alındı. HUVEC hücre hattında kontrol grubunun protein konsantrasyonu 1634,6 µg/ml iken, LPS grubunun protein konsantrasyonu 1110,6 µg/ml olarak ölçüldü. RAW hücre hattında kontrol grubunun protein konsantrasyonu 1566,3 µg/ml iken, LPS grubunun protein konsantrasyonu 2749 µg/ml olarak ölçüldü.



Şekil 10. BCA yönteminde elde edilen standart konsantrasyon/absorbans grafiği

4.3. RNA İzolasyon Sonuçları

Deney grubundaki hücrelerden GENEzol™ RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyonu yapıldı. Numunelerdeki RNA miktarı Jenway Genova Nanodrop cihazı ile ölçüldü (Şekil 11). RNA miktarı HUVEC hücre hattında kontrol grubunda 118,2 ng/ml, LPS grubunda RNA miktarı 80,5 ng/ml olarak ölçüldü. RNA miktarı RAW hücre hattında kontrol grubunda 119,8 ng/ml, LPS grubunda RNA miktarı 125 ng/ml olarak ölçüldü.



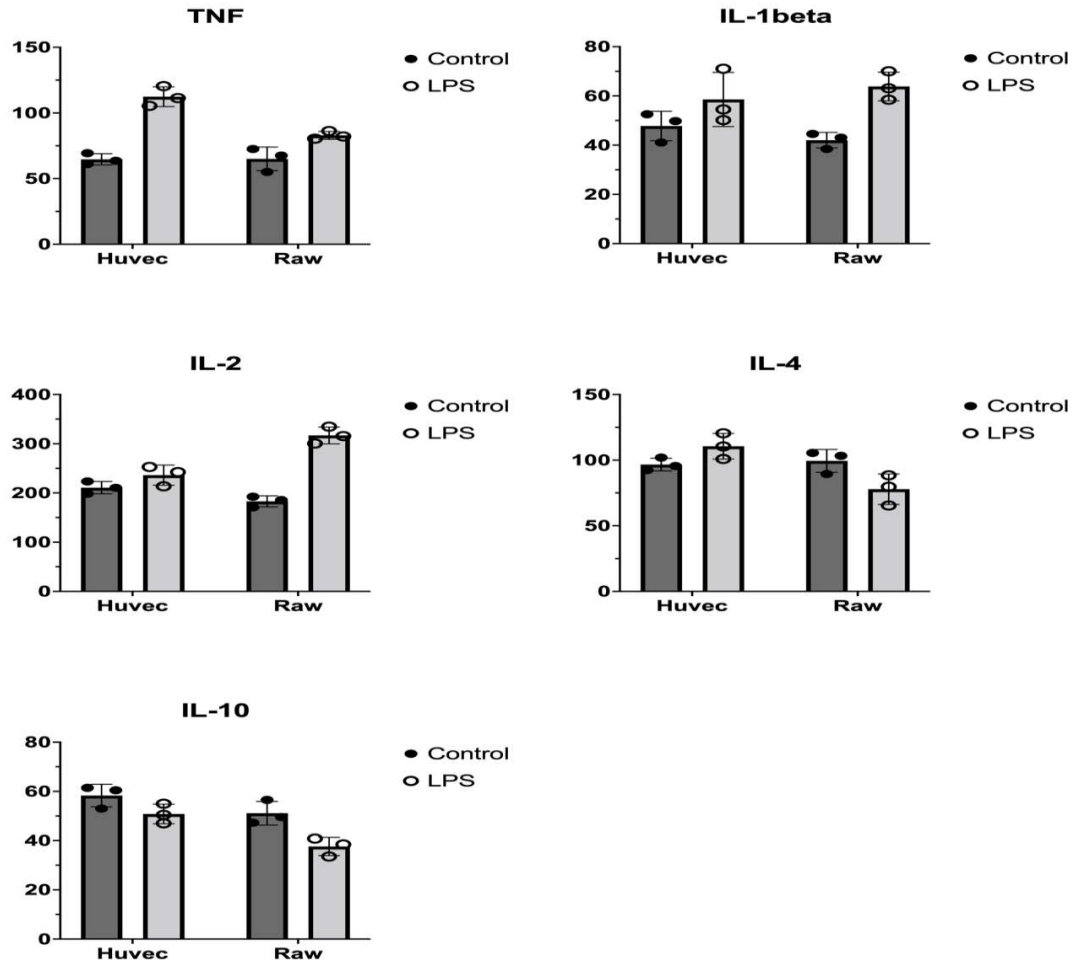
Şekil 11. İzole edilen RNA miktarlarının nanodrop cihazıyla ölçümü (A, B)

4.4. Kültür Vasatlarında ELISA Yöntemi ile Ölçülen Sitokin Seviyeleri

HUVEC ve RAW hücre hatlarında LPS ve kontrol grubunun kültür vasatlarındaki sitokin seviyelerinin miktarı ELISA yöntemi ile tespit edildi.

RAW hücrelerinde LPS grubunun kültür vasatında kontrol grubunun, kültür vasatına kıyasla TNF- α ($p=0,0156$), IL-1 ($p=0,047$) ve IL-2 ($p=0,000349$) seviyelerinde anlamlı artış olduğu, IL-10 seviyesinde ise anlamlı bir azalma ($p=0,037$) olduğu gözlemlendi. IL-4 seviyesinde anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,0917$).

HUVEC hücrelerinde LPS grubunun kültür vasatında kontrol grubunun kültür vasatına kıyasla yalnızca TNF- α düzeyinde ($p=0,000684$) anlamlı bir artış gözlenirken, IL-1 ($p=0,106$), IL-2 ($p=0,07$), IL-4 ($p=0,092$) ve IL-10 ($p=0,102$) sitokin seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 12).



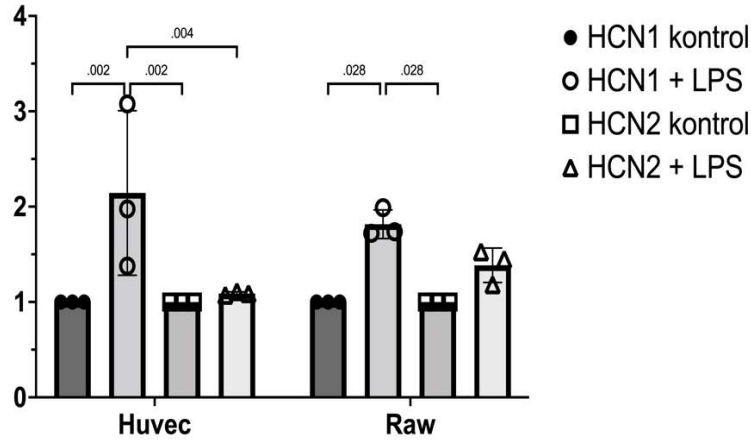
Şekil 12. RAW ve HUVEC hücre hatlarının kültür vasatında kontrol ve LPS grupları arasındaki sitokin seviyelerinin kıyaslaması.

4.5. Western Blot Analizi Bulguları

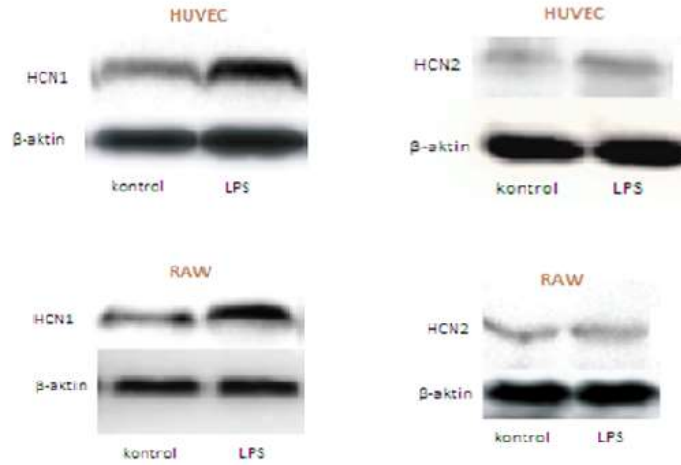
HUVEC ve RAW hücre hatlarının LPS ve kontrol gruplarında HCN1 ve HCN2 protein ekspresyonları immunblotlama ile yarı kantitatif olarak değerlendirildi.

HUVEC hücre hattında LPS grubunda kontrol grubuna oranla HCN1 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilirken ($p=0,002$), HCN2 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0,986$).

RAW hücre hattında LPS grubunda kontrol grubuna oranla HCN1 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilirken ($p=0,028$), HCN2 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0.466$) (Şekil 13).



Şekil 13. HUVEC (solda) ve RAW (sağda) hücrelerinde HCN1 ve HCN2 protein ekspresyonlarının kontrol ve LPS grupları arasındaki kıyaslaması.



Şekil 14. HUVEC ve RAW hücrelerinin kontrol ve LPS gruplarında HCN1 ve HCN2 protein ekspresyonlarının Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.

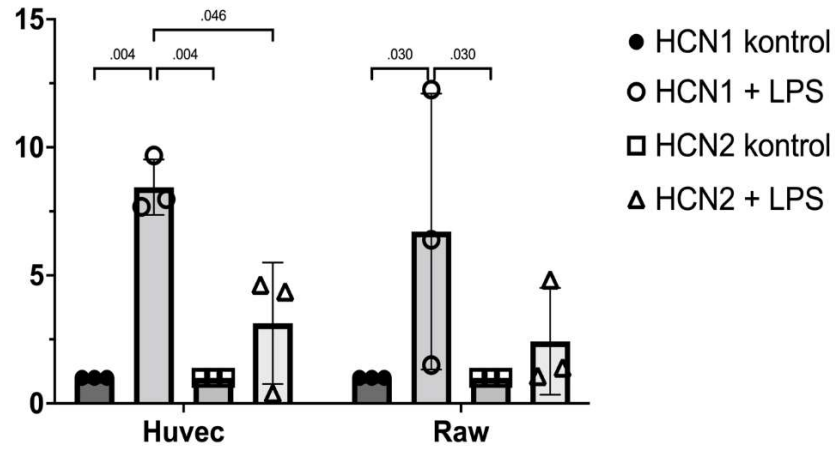
Numuneler poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) sonrası jelden membrana aktarıldı. Görüntüleme sonrasında bilgisayara aktarılan fotoğraflarda beta-aktin dahili kontrol olarak kullanılarak görelî yoğunluklar ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, US) ile hesaplandı.

4.6. PCR Analizi Bulguları

HUVEC ve RAW hücre hatlarının LPS ve kontrol gruplarında HCN1 ve HCN2 gen ekspresyonları eş zamanlı-PCR reaksiyonuyla değerlendirildi.

HUVEC hücrelerinde HCN1 gen ekspresyonu LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla 8,44 kat artmış olup bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,004$). HUVEC hücrelerinde HCN2 gen ekspresyonu LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla 3,13 kat artmış olup bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p=0,658$).

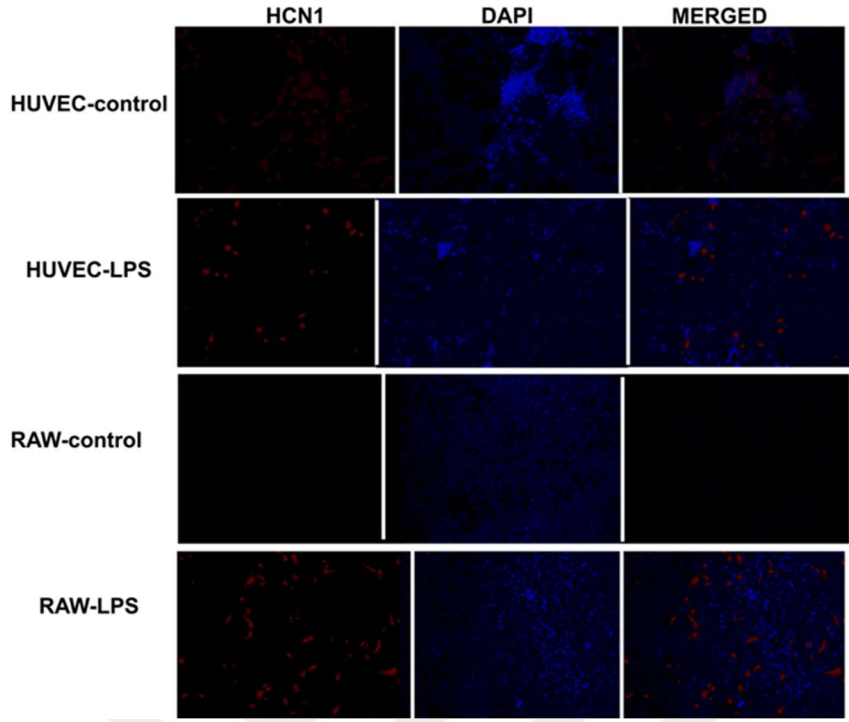
RAW hücrelerinde HCN1 gen ekspresyonu LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla 6,71 kat artmış olup bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,03$). RAW hücrelerinde HCN2 gen ekspresyonu LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla 2,42 kat artmış olup bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p=0,863$) (Şekil 15).



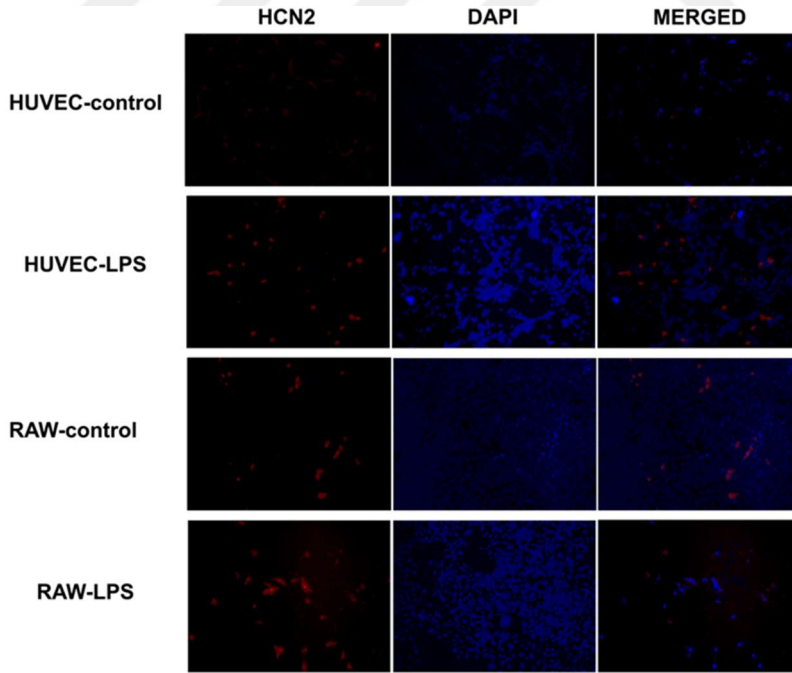
Şekil 15. HUVEC (solda) ve RAW (sağda) hücrelerinde HCN1 ve HCN2 gen ekspresyonlarının kontrol ve LPS grupları arasındaki kıyaslaması.

4.7. HCN1 ve HCN2 Ekspresyonunun İmmünofloresans Yöntem İle Gösterilmesi

RAW ve HUVEC hücre hatlarına 24 saat boyunca LPS sonrası hücre vasatı uygulandı. RAW hücrelerinde HCN1 ve HCN2 ekspresyonunda enflamasyon grubunda kontrole göre artış olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde HUVEC hücrelerinde HCN1 ve HCN2 ekspresyonunda enflamasyon grubunda kontrole göre artış olduğu gözlemlendi (Şekil 16, Şekil 17).



Şekil 16. HUVEC ve RAW hücrelerinde LPS ve kontrol grubunun HCN1 antikoruna karşı floresans yoğunluğunun gösterilmesi.



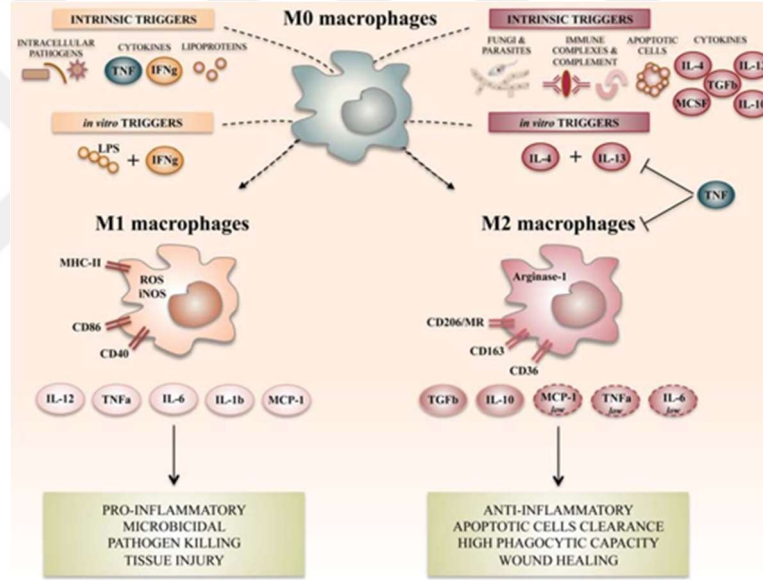
Şekil 17. HUVEC ve RAW hücrelerinde LPS ve kontrol grubunun HCN2 antikoruna karşı floresans yoğunluğunun gösterilmesi.

5. TARTIŞMA

HCN kanalları, kalp ve beyin hücrelerinin plazma zarlarında seçici olmayan voltaj kapılı katyon kanalları olarak görev yapan integral membran proteinleridir. Beyin ve kalp dokusundaki ritmik aktiviteden yani pacemaker akımdan sorumludurlar. HCN kanalları farklı voltaj özellikleri, kinetikleri ve dağılımı gösteren, farklı dokularda farklı seviyelerde ekspresyonu olan 4 izoforma sahiptir. Farklı izoformlar benzer özelliklere sahip olmakla beraber voltaj bağımlılığı, aktivasyon / deaktivasyon kinetiği ve cAMP'e duyarlılıkta kantitatif farklılıklar içerirler. Daha önce yapılan pek çok çalışmada HCN kanallarının özellikle nöronal sinir hasarında ve enflamasyonda farklı ekspresyon düzeylerine sahip oldukları gösterilmiştir. Literatürde kardiyovasküler hasarın olduğu durumda kalbin ritmik aktivitesinden sorumlu olan HCN kanallarının ekspresyon düzeyleri ile ilgili veriler oldukça kısıtlıdır. Çalışmamızda kardiyovasküler enflamasyonun patolojisinde anahtar rol oynayan endotel ve makrofaj hücre hatlarında enflamatuar bir mikroçevre oluşturup, oluşturduğumuz bu enflamatuar ortamda HCN1 ve HCN2 kanal proteinlerinin cevabını moleküler düzeyde inceledik. Hedeflediğimiz enflamatuar mikroçevreyi oluşturmak için her iki hücre grubuna 6 saat boyunca LPS verdikten sonra, her bir hücre grubunun kültür vasatını diğer hücre grubuna çapraz olarak uyguladık ve 24 saat sonra moleküler araştırmalara başladık.

Çalışmamızda makrofaj hücrelerinde enflamasyon grubunda kontrol grubuna göre proenflamatuar sitokinler olan IL-1, IL-2 ve TNF- α düzeyinde anlamlı artış, antienflamatuar sitokinlerden olan IL-10 seviyesinde ise anlamlı bir azalma olduğunu tespit ettik. Endotel hücrelerinde enflamasyon grubunda proenflamatuar sitokin olan TNF- α düzeyinde anlamlı artış tespit ettik. Elde ettiğimiz bu veriler bize enflamasyon modelimizin etkinliğini göstermiştir. Makrofajlar, enflamasyon yanıtının primer hücreleridir ve toksin veya yabancı ajanlarla karşılaşıldığında ilk enflamasyon yanıtı ve sitokin üretimi makrofaj hücrelerinde gerçekleşmektedir. Makrofaj hücreleri patojenlere karşı ilk savunma hatlarından biri olarak kabul edilirler ve bu nedenle birçok bağışıklık sürecine müdahale ederler. Antijen sunumunun yanı sıra enfeksiyon veya yaralanmayı takiben enflamasyonun, yara iyileşmesinin ve doku homeostazının çözülmesinde rol oynarlar (185, 186). Son yıllarda, makrofaj polarizasyonu ve enflamasyondaki rolü giderek daha fazla önem kazanmaya başlamıştır. Genel olarak iki ana makrofaj polarizasyonu mevcuttur; klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar

(M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar (M2). İnterferon gama (IFN- γ), makrofajları enflamasyonu destekleyen M1 makrofajlarına farklılaştırabilir. IFN- γ 'dan farklı olarak, Th2 hücreleri tarafından üretilen IL-4, makrofajları enflamasyonu önleyen M2 tipi makrofajlara dönüştürebilir (187). M1 makrofajlarının rolü, proenflamatuar sitokinleri ve kemokinleri salgılamak, antijenleri sunmak ve böylece pozitif bağışıklık tepkisine katılmak ve bir bağışıklık monitörü olarak işlev görmektedir. Ürettiği başlıca proenflamatuar sitokinler IL-6, IL-12 ve TNF- α ' dır. M2 makrofajları başlıca Arginaz-1, IL-10 ve TGF- β olmak üzere enflamasyonu azaltma ve immüno-supresif fonksiyona katkıda bulunma işlevine sahip diğer anti-enflamatuar sitokinleri salgılar (188, 189). Yara iyileşmesinde ve doku onarımında önemli rol oynar.



Şekil 18. Makrofaj polarizasyonu.

M1 makrofajlarında inflamasyon yanıtı IFN- γ , LPS ve TNF- α gibi faktörlerin bağlanmasıyla uyarılan Tool Like Reseptörler (TLR) tarafından başlatılır. M1 makrofajlarının proenflamatuar mekanizmasına gelince, M1 makrofajları öncelikle IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 ve TNF- α dahil olmak üzere bir dizi sitokin salgılar. Daha sonra, M1 makrofajları, patojenleri öldürmek ve iltihaplanmayı başlatmak üzere çeşitli bağışıklık tepkilerini tetikler. Böylece enflamatuar yanıt patlak verir (190).

LPS aracılığıyla oluşturduğumuz enflamasyon modeline dayalı çalışmamızda RAW hücrelerinde enflamasyon grubunda kontrol grubuna göre HCN1 kanal proteininin gen ekspresyonu, protein düzeyi ve hücre yüzeyindeki ifadesinde artış olduğunu tespit ettik. RAW hücrelerinde enflamasyon grubunda kontrol grubuna kıyasla HCN2 kanal proteininin gen ekspresyonu ve protein ifadesinde anlamlı bir artış yokken, immunfloresan boyama ile hücre yüzeyindeki ifadesinde artış olduğunu gözlemledik. Benzer şekilde HUVEC hücrelerinde enflamasyon grubunda kontrol grubuna göre HCN1 kanal proteininin gen ekspresyonu, protein düzeyi ve hücre yüzeyindeki ifadesinde artış olduğunu tespit ettik. HUVEC hücrelerinde enflamasyon grubunda kontrol grubuna kıyasla HCN2 kanal proteininin gen ekspresyonu ve protein ifadesinde anlamlı bir artış yokken, immunfloresan boyama ile hücre yüzeyindeki ifadesinde artış olduğunu gözlemledik.

Daha önce belirtildiği üzere HCN kanallarının her dokuda hâkim olan bir alt tipi bulunmaktadır. Santral sinir sisteminde hâkim olan alt tip HCN1 ve HCN2 ağırlıklı iken, kardiyak ritimden sorumlu olan alt tipler HCN3 ve HCN4 alt tipidir (6,17,87,88,89). Çalışmamızda literatürde HCN kanal ekspresyon paterni aydınlatılmamış iki hücre tipinde HCN1 ve HCN2 ekspresyonunu çalıştık. Elimizdeki verilerle bu iki hücre tipinde HCN1 alt tipinin hakim olan alt tip olabileceği sonucuna varabiliriz. Oluşturduğumuz enflamasyon modelinde 6 saatlik LPS uygulamasının ardından 24 saatlik bir kültür vasatı maruziyetinden sonra endotel ve makrofaj hücre gruplarımızda HCN1 ekspresyon artışını 3 yöntemle de gösterdik. Enflamasyon grubundaki HCN2 ekspresyon artışını ise immunfloresan yöntemle göstermemize rağmen, PCR ve Western Blot yöntemlerindeki HCN2 artışını istatistiksel olarak anlamlı bulamadık. Daha önce Cho ve ark yaptıkları hayvan deneyinde Freund's Complete Adjuvant (CFA) ile oluşturulan dura iltihabının, trigeminal gangliondaki protein seviyelerinde ve HCN1 ve HCN2 eksprese eden nöronların sayısında bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir (165). Bu artışlar, sistemik bir antienflamatuvar olan buprenorfin tedavisini takiben görülmemiştir. Bu çalışma bir hayvan deneyi olup CFA ile 3 günlük bir maruziyetten sonraki HCN kanal değişiklikleri incelenmiştir. Biz çalışmamızda hücre kültürü kullandık ve 24 saatlik bir LPS maruziyeti sonrasında HCN kanallarındaki değişimi gözlemledik. 24 saatten daha uzun süreli bir LPS maruziyeti önceki çalışmalarda elde edilen bulgularla daha doğru kıyas yapmamızı

sağlayacaktır. HCN1 kanal proteinindeki artış enflamatuar gruptaki makrofaj ve endotel hücrelerinde gen, protein ve yüzey ifadesinde korelasyona sahipti, bu da bize bu hücrelerde HCN1 alt tipinin hâkim olabileceğini ve enflamasyona cevaben arttığını düşündürmektedir. Her iki hücrede de enflamasyon grubunda HCN2 proteininin immunfloresan mikroskopla görülen hücre membran ifadesindeki artışına rağmen, PCR ve Western Blot yöntemleriyle gen ve protein düzeyinde beklenen artışı gözlemleyemedik. Bu durum birkaç şekilde açıklanabilir; HCN2 kanal proteininin membran üzerindeki yarı ömrü HCN1 kanal proteinine göre daha uzun olabilir. Bu durumda 24 saatlik bekleme sürecinde, genetik materyal parçalanmış ve transkripsiyon materyali veziküllerden membrana taşınmasına rağmen hala membran proteinindeki yıkım gerçekleşmemiş olabilir. Hatta membran proteinindeki aşırı artış bir negatif feed back mekanizmasıyla HCN2 gen ifadesinin azalmasına sebep olmuş olabilir. Literatürde HCN kanal proteinleri için yarılanma ömrü bilgisi bulunmamaktadır. Bir başka olası ihtimal, enflamasyona HCN2 kanal yanıtının ani bir gen/protein ekspresyon artış/azalışından ziyade dalgalı bir patern göstermesi ve dolayısıyla aradan geçen zamanda 3 yöntemle elde edilen sonuçların paralel olmaması ile açıklanabilir. HCN2 kanal ekspresyon paterni monofazik değil, bifazik veya trifazik paternde olabilir. Her iki durum için daha net bir veri elde edebilmek adına çalışmamızın bir sonraki adımında, LPS uygulamasını takiben 0., 6., 12., 18. ve 24. saatlerde ardışık olarak deneylerimizi tekrarlamak çok daha faydalı olacaktır.

Nosisepsiyonda HCN kanallarının tipik akımı olan I_h 'nin rolü konusunda literatürde önemli bir fikir birliği vardır. Sinir hasarı oluşturulan hayvan modellerinde hem dorsal kök hem de trigeminal ganglion nöronlarında I_h yoğunluğunda artışlar bildirilmiştir. Ek olarak, artan nöronal uyarılabilirlik ve mekanik allodininin, HCN kanal blokeri olan ZD7288 tarafından bloke edildiği gösterilmiştir (91, 160). Oluşturulan sinir hasarının enflamasyona sebep olarak ağrı reseptörlerini etkilediğini varsayarsak, bu çalışmalarda elde edilen bulguların bizimle paralel olduğu sonucunu çıkarabiliriz. Mevcut çalışmamızda HCN kanal proteinlerinin gen ve protein düzeyinde araştırdık, fakat enflamasyon ile ekspresyonu değişen ve membrandaki ifadesi artan bu kanal proteinlerindeki akım yoğunluğunu ölçmediğimiz için bizim oluşturduğumuz enflamatuar mikroçevrenin I_h akımında ne gibi bir değişikliğe yol açtığı konusunda bir veri elde edemedik. Çalışmamızın bir sonraki adımında deney düzeneğimize

hücrelerimizin membranındaki Ih akımında oluşacak değişiklikleri dahil etmek, HCN kanal aktivasyonunun enflamasyona cevabını öngörmek açısından yol gösterici olacaktır.

Daha önce belirttiğimiz üzere, HCN kanalları beyin yanı sıra kalpte de aktif şekilde görev görmekte, kardiyak ritmisitenin oluşumundan sorumlu kardiyak pacemaker akım/ If oluşturan kanallar olarak görev yapmaktadır. Kalpte özellikle HCN4 alt tipinin hâkim olduğu bilinmektedir. Kardiyak ritmisitenin ve hızın sepsis, Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu (SIRS) ve Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu (MODS)'lu hastalarda bozulduğu ve mortaliteye varan tablolara sebep olduğu bilinmektedir (191). Bahsedilen bu klinik antitelere enflamasyonun başladığı hücre olan endotellerin ve devamında sitokin yanıtına neden olan makrofajların en önemli iki hücre olduğu aşıkardır. Zorn-Pauly ve ark. sağ atriyal uzantılardan izole edilmiş insan miyositleri ile yaptığı patch-clump deneylerinde, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonunda LPS uygulamasının, hücre zarındaki akımı baskılayarak HCN kanallarındaki If'i önemli ölçüde ve spesifik olarak bozduğunu, hem de If'nin β1-adrenerjik katekolaminlere karşı daha duyarlı hale geldiğini göstermişlerdir (192). Karl Werdan ve ark., LPS gibi endotoksinlerin aracılığıyla oluşabilecek sepsis, SIRS ve MODS'lu hastalarda görülen otonomik kardiyak disfonksiyonun, HCN kanalları gibi iyon kanallarındaki aktivitenin bozulmasının sonucu olabileceğini bildirmişlerdir (191). Literatürde bu süreçte çok önemli rolleri olan endotel ve makrofaj hücrelerinin membranındaki HCN kanal proteinlerinin ekspresyonu, kanal aktivasyonu ve zar akımı ile ilgili veri bulunmamaktadır. Sepsis modeli oluşturarak yaptığımız deneylerde endotel ve makrofaj hücre hatlarında LPS aracılı enflamasyonun HCN1 kanal proteinini gen/protein ekspresyonu ve membran ifadesi düzeyinde artırdığını HCN2 kanal proteini için ise sadece membran ifadesinde artış olduğunu gözlemledik. Bu kanal proteinlerinin membran akım potansiyellerini ölçmek, hücre aktivasyonu/protein ilişkisini kavramak açısından oldukça faydalı olacaktır.

Literatürde hematolojik hücrelerde HCN kanal protein ekspresyonunu inceleyen çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Vay ve ark santral sinir sisteminin makrofajı olarak tanımlanan mikrogliya hücrelerinde HCN kanal proteinlerinin ifade edildiğini göstermişlerdir (171). Rat mikroglialarında HCN kanallarının canlılık, proliferasyon,

fagositoz ve mikroglia aktivasyonu üzerinde önemli bir düzenleyici etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. HCN kanallarının spesifik bir HCN kanal blokörü olan ZD7288 tarafından farmakolojik blokajı, hücre içi kalsiyum seviyelerinin yavaşça yükselmesiyle hücre depolarizasyonu ile sonuçlanmış, bu da yaşam süresinin artmasına ve dinlenme halindeki mikroglialarının proliferasyon oranlarının azalmasına yol açmıştır. Ayrıca, ZD7288 tedavisinin yanı sıra HCN2 kanallarının small interfering RNA tarafından susturulması, daha sonraki mikroglia aktivasyonunun hem anti hem de proenflamatuar fenotipe zayıflamasına neden olmuştur (173). Notomi ve ark yaptıkları hücre kültürü çalışmasında kemik dokunun makrofajı olarak bilinen osteoklastlardaki HCN aktivitesini göstermişlerdir (167). RAW 'dan türetilen osteoklastlarla yapılan elektrofizyolojik deneylerde, HCN kanallarının işlevsel olduğu ve nöronlar ve kardiyomyositler gibi uyarılabilir hücrelerde kaydedilen Ih'ye benzer özelliklere sahip hiperpolarizasyonla aktive edilmiş içe akımlar (Ih) ürettiği tespit edilmiştir. RAW hücrelerinde kantitatif PCR ile HCN alt birimlerinin tamamının mRNA seviyelerinin varlığını ve HCN4 ekspresyonunun baskın olduğunu, HCN4 yıkımının osteoklastik Ih'yi azalttığını belirtmişlerdir. Biz çalışmamızda RAW hücrelerinde HCN1 ve HCN2 mRNA'larının varlığını Real Time PCR ile, HCN1 ve HCN2 protein ekspresyonunu Western Blot yöntemi ile, HCN1 ve HCN2 kanal proteinlerinin membran üzerindeki varlığını immunfloresan boyama yöntemi ile gösterdik. Oluşturduğumuz enflamasyon modelinde HCN1 alt tipinin gen/protein/membran ekspresyonu düzeyinde ifadesinin kontrol grubuna arttığını gözlemledik.

Çalışmamızda LPS tedavisinin ardından oluşturduğumuz enflamasyon modelinde HCN kanal proteinlerindeki artışın hangi moleküler mekanizmalarla oluşmuş olabileceği henüz bilinmemektedir. Literatürde HCN kanal aktivasyonunu ve If akımını etkileyen faktörlerle ilgili çalışmalar mevcuttur. Fakat HCN kanallarının DNA/gen transkripsiyonu, protein oluşumu ve hücre yüzeyine giden süreçte geçtiği yollar ve moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Bizim LPS aracılığıyla oluşturduğumuz enflamatuar ortamda HCN1 kanal proteininin gen/protein düzeyinde ekspresyonunu artıran moleküler olaylar, aydınlatılması gereken eksik noktalar olarak düşünülebilir. LPS TLR4 reseptörleri aracılığıyla hücre yüzeyine bağlanarak hücre içinde çeşitli sinyal yollarını başlatır. Bu yolak sırasıyla MyD88, MAPK aracılığıyla

NF- κ B aktivasyonuna neden olarak çeşitli proenflamatuar sitokinlerin transkripsiyonunu başlatır. Daha önce Britt ve ark. Alveolar Clara hücreleri ile yaptıkları hücre kültürü çalışmasında, LPS uygulanan grupta MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK) gibi ara haberci moleküllerin seviyelerinin yanısıra siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesinin de arttığını göstermişlerdir (193). COX-2, hücre membran fosfolipitlerinin 2. Karbonuna bağlı araşidonik asitten siklik endoperoksitleri (PGG₂, PGH₂) sentezler ve sonrasında PGE izomeraz enzimi ile prostaglandin E₂ (PGE₂) sentezlenir (194). Daha önce bradikinin ve prostaglandin E₂ gibi enflamatuar araçların akut olarak uygulandığında, hücre içi cAMP'nin artması ve cAMP'nin HCN kanallarına doğrudan bağlanması yoluyla I_h'yi arttırdığı gösterilmiştir (195). Bizim çalışmamızda da LPS aracılığıyla enflamatuar süreç başlamış, COX-2 aktivitesi artmış ve bunun sonucunda PGE₂ seviyesi artarak hücre içi cAMP aracılığıyla HCN1 ve HCN2 kanal aktivitesi yani I_f akımı artmış olabilir. Biz deneylerimizde akım potansiyelini ölçmedik, HCN ekspresyonu ve protein düzeylerinin enflamasyona cevabını gösterdik. HCN1 gen mRNA seviyesindeki ve protein seviyesindeki artış, cAMP'nin ortak aracı olduğu farklı mesajcı proteinler aracılığıyla gerçekleşmiş olabilir. HCN1'in cAMP aracılı aktivasyon kinetiğinin diğer HCN proteinleri arasında en hızlı olduğu bilinmektedir. (HCN1 cAMP için Ka=0.5 μ M, HCN2 cAMP için Ka=6 μ M) (110). Bu durumda kanalın daha hızlı aktivasyon cevabı vermesine neden olan mekanizmalar gen ekspresyonu seviyesinde de HCN1 için elde ettiğimiz artmış ekspresyon paternini açıklayabilir. HCN2 kanalının cAMP aracılı aktivasyon cevabının daha yavaş olması HCN2 için gen ekspresyonu seviyesinde değişmeyen bir yanıt almamızı açıklayabilir. Bu bilinmezlik farklı zaman aralıklarında ve art arda ölçüm yapacak şekilde deneylerimizin genişletilmesi ile aydınlatılabilir. Yine LPS'in oluşturduğu hücre içi sinyallerin bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'i artırdığı bilinmektedir. Bu transkripsiyon faktörü aracılığıyla HCN gen ekspresyonu, dolayısıyla protein miktarı da artmış olabilir.

Oluşturduğumuz enflamasyon modelinde HCN1 alt tipinin makrofaj ve endotel hücrelerinde gen/protein ekspresyonu ve membran düzeyindeki ifadesinin kontrol grubuna göre arttığını gözlemledik. Hücrelerimizde HCN2 alt tipinde enflamasyon grubunda kontrole göre anlamlı bir fark tespit edemedik. Bu durum bize endotel ve

makrofaj hücrelerinde hakim olan alt tipin HCN1 olduğunu düşündürse de, hakim olan alt tipe dair kesin bir çıkarım için HCN3 ve HCN4 ekspresyon seviyelerini de araştırmak çalışmamızın bir sonraki basamağındaki hedeflerimizden biri olacaktır. Çalışmamızda HCN2 kanal proteininde hücre yüzey ifadesinde gözlemlediğimiz artışı açıklayacak bir gen/protein ekspresyon artışı gözlemleyemedik. İlerideki çalışmalarımızda bu durumu açıklayacak daha net bir veri elde edebilmek ve endotel/makrofaj hücrelerinin LPS aracılı enflamasyon yanıtını daha detaylı değerlendirebilmek için deneylerimizin örnek toplama sıklığını arttırmak ve kanal aktivasyon paternini belli zaman dilimlerine göre tanımlamak aydınlatıcı olacaktır. Enflamasyon sürecinde HCN gen/protein ekspresyonu ve membran ifadesindeki değişimlerin hangi mekanizmalarla gerçekleştiğini, ara yollardaki molekülleri, ikincil habercileri ve sinyal iletim sürecini aydınlatmak şimdiye kadar elde ettiğimiz bulguları açıklamak için faydalı olacaktır. İlerideki çalışmalarımızın diğer bir amacı da enflamasyona yanıtta HCN kanallarının gen/protein ekspresyonu ve membran ifadesindeki değişimlerinin yanı sıra, kanal ekspresyonu ve aktivitesi arasındaki bağlantıyı çözebilmek adına kanal akımındaki ve hücre membran potansiyelindeki değişimleri incelemek olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda LPS aracılığıyla oluşturduğumuz enflamasyon modelinde, endotel ve makrofaj hücre hatlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir HCN1 gen ve protein ekspresyon artışı gözlemledik. Endotel ve makrofaj hücre hatlarında HCN2 gen ve protein ekspresyonunda enflamasyon grubunda kontrole göre anlamlı bir fark olmadığını tespit ettik. İmmunfloresan mikroskopik incelemede endotel ve makrofaj hücrelerinde enflame grupta kontrole göre HCN1 ve HCN2 kanal proteininin membran ifadesinde artış olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile enflamasyonda makrofaj ve endotel hücrelerinin HCN kanal ekspresyonunun değiştiğini ve bu değişimi düzenleyecek farmakolojik ajanların sistemik enflamasyonun tedavisinde yeni bir ışık olabileceği çıkarımını yapabiliriz. Çağımızın en sık morbidite ve mortalite nedenlerinden olan kardiovasküler hastalıkların tedavisinde HCN kanal aktivitesini değiştiren bir tedavi yaklaşımı güncel tedavilere destek olabilecek bir potansiyel barındırıyor olabilir. Endotel ve makrofaj hücre grubunda HCN kanal alt tip hakimiyetini belirlemek sistemik bir HCN blokajı yapmaktansa, spesifik alt tip blokajı ile oluşabilecek yan etkileri en aza indirmek açısından yararlı olacaktır. Enflamasyon grubundaki protein ifadesinde ve gen ekspresyonunda gözlemlediğimiz artışın, hücre membranındaki If akımında ne gibi değişikliklere yol açacağı, çalışmamızın bundan sonraki adımında araştırma hedeflerimizden biri olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Santoro B, Liu DT, Yao H, et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*. 1998;93(5):717-29.
2. Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(26):14815-20.
3. Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:235-57.
4. Much B, Wahl-Schott C, Zong X, et al. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(44):43781-6.
5. Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, Shigemoto R, Accili EA. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(31):22900-9.
6. Postea O, Biel M. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(12):903-14.
7. Shi W, Wymore R, Yu H, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circulation research*. 1999;85(1):e1-e6.
8. Noma A, Irisawa H. Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflügers Archiv*. 1976;364(1):45-52.
9. Brown H, DiFrancesco D, Noble S. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*. 1979;280(5719):235-6.

10. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological reviews*. 2009;89(3):847-85.
11. Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. α 2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell*. 2007;129(2):397-410.
12. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *nature*. 1998;393(6685):587-91.
13. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*. 1991;351(6322):145-7.
14. Ishii TM, Takano M, Xie L-H, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(18):12835-9.
15. Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *The Journal of general physiology*. 2001;117(5):491-504.
16. Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*. 1998;393(6685):583-7.
17. Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *European journal of biochemistry*. 2001;268(6):1646-52.
18. Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(8):3438-42.

19. Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Volume 135. 1999:151-71.
20. Pfeifer A, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Ruth P, Hofmann F. cGMPdependent protein kinases: Structure and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;135:105-50.
21. De Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998;396(6710):474-7.
22. Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends in cardiovascular medicine*. 2002;12(5):206-13.
23. Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC. Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(46):36465-71.
24. Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M. Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS letters*. 2000;479(1-2):35-40.
25. Frank HY, Catterall WA. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science Signaling*. 2004;2004(253):re15.
26. Männikkö R, Elinder F, Larsson HP. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature*. 2002;419(6909):837-41.
27. Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Voltage sensor of Kv1. 2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. 2005;309(5736):903-8.
28. Decher N, Chen J, Sanguinetti MC. Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular

- coupling between the S4–S5 and C-linkers. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(14):13859-65.
29. Pape H-C. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annual review of physiology*. 1996;58(1):299-327.
 30. Yu X, Chen X-W, Zhou P, et al. Calcium influx through I_f channels in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007;292(3):C1147-C55.
 31. Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2003;425(6954):200-5.
 32. Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2001;411(6839):805-10.
 33. Wang J, Chen S, Siegelbaum SA. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *Journal of General Physiology*. 2001;118(3):237-50.
 34. Zhou L, Siegelbaum SA. Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy. *Structure*. 2007;15(6):655-70.
 35. Flynn GE, Black KD, Islas LD, Sankaran B, Zagotta WN. Structure and rearrangements in the carboxy-terminal region of SpIH channels. *Structure*. 2007;15(6):671-82.
 36. Zhou L, Siegelbaum SA. Pathway and endpoint free energy calculations for cyclic nucleotide binding to HCN channels. *Biophysical journal*. 2008;94(12):L90-L2.
 37. Craven KB, Zagotta WN. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:375-401.

38. Taraska JW, Zagotta WN. Structural dynamics in the gating ring of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(9):854-60.
39. Santoro B, Liu DT, Yao H, et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*. 1998;93(5):717-29.
40. Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(16):9391-6.
41. Altomare C, Terragni B, Brioschi C, et al. Heteromeric HCN1–HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *The Journal of physiology*. 2003;549(2):347-59.
42. Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. Functional expression of the human HCN3 channel. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(41):34635-43.
43. Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacology & therapeutics*. 2005;107(1):59-79.
44. Hofmann F, Biel M, Kaupp UB. International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels. *Pharmacological reviews*. 2005;57(4):455-62.
45. Ulens C, Tytgat J. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(9):6069-72.
46. Santoro B, Chen S, Lüthi A, et al. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(14):5264-75.

47. Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *The EMBO journal*. 1999;18(9):2323-9.
48. Mistrík P, Mader R, Michalakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(29):27056-61.
49. Chang F, Cohen I, DiFrancesco D, Rosen M, Tromba C. Effects of protein kinase inhibitors on canine Purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current i_f . *The Journal of Physiology*. 1991;440(1):367-84.
50. Abi-Gerges N, Ji G, Lu Z, Fischmeister R, Hescheler J, Fleischmann B. Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *The Journal of physiology*. 2000;523(2):377-89.
51. Moroni A, Gorza L, Beltrame M, et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f . *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(31):29233-41.
52. Moroni A, Barbuti A, Altomare C, et al. Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflügers Archiv*. 2000;439(5):618-26.
53. Altomare C, Bucchi A, Camatini E, et al. Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *The Journal of general physiology*. 2001;117(6):519-32.
54. DiFrancesco D. Dual allosteric modulation of pacemaker i_f channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *The Journal of physiology*. 1999;515(2):367-76.
55. Wang J, Chen S, Nolan MF, Siegelbaum SA. Activity-dependent regulation of HCN pacemaker channels by cyclic AMP: signaling through dynamic allosteric coupling. *Neuron*. 2002;36(3):451-61.

56. Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, et al. C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(32):29930-4.
57. Ishii TM, Takano M, Ohmori H. Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *The Journal of physiology*. 2001;537(1):93-100.
58. Rothberg BS, Shin KS, Phale PS, Yellen G. Voltage-controlled gating at the intracellular entrance to a hyperpolarization-activated cation channel. *Journal of General Physiology*. 2002;119(1):83-91.
59. Shin KS, Rothberg BS, Yellen G. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *The Journal of general physiology*. 2001;117(2):91-102.
60. Suh B-C, Hille B. PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys*. 2008;37:175-95.
61. Zolles G, Klöcker N, Wenzel D, et al. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron*. 2006;52(6):1027-36.
62. Pian P, Bucchi A, Robinson RB, Siegelbaum SA. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *The Journal of general physiology*. 2006;128(5):593-604.
63. Cerbai E, Pino R, Sartiani L, Mugelli A. Influence of postnatal-development on I_f occurrence and properties in neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovascular research*. 1999;42(2):416-23.
64. Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson RB. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circulation research*. 2001;89(1):e8-e14.

65. Robinson R, Yu H, Chang F, Cohen IS. Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, I_f , in rat ventricle cells. *Pflügers Archiv*. 1997;433(4):533-5.
66. Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(9):6313-9.
67. Munsch T, Pape HC. Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *The Journal of Physiology*. 1999;519(2):493-504.
68. Stevens DR, Seifert R, Bufe B, et al. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*. 2001;413(6856):631-5.
69. Munsch T, Pape HC. Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic relay neurones by acetazolamide. *The Journal of physiology*. 1999;519(2):505-14.
70. Wahl-Schott C, Baumann L, Zong X, Biel M. An arginine residue in the pore region is a key determinant of chloride dependence in cardiac pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(14):13694-700.
71. Poolos NP, Bullis JB, Roth MK. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(30):7995-8003.
72. Decher N, Bundis F, Vajna R, Steinmeyer K. KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. *Pflügers Archiv*. 2003;446(6):633-40.
73. Yu H, Wu J, Potapova I, et al. MinK-related peptide 1: a β subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circulation research*. 2001;88(12):e84-e7.

74. Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, et al. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(42):43497-502.
75. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999;97(2):175-87.
76. Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *The EMBO journal*. 2000;19(23):6326-30.
77. Zhang M, Jiang M, Tseng G-N. minK-related peptide 1 associates with Kv4. 2 and modulates its gating function: potential role as β subunit of cardiac transient outward channel? *Circulation research*. 2001;88(10):1012-9.
78. Michels G, Er F, Khan IF, et al. K⁺ channel regulator KCR1 suppresses heart rhythm by modulating the pacemaker current I_f. *PLoS One*. 2008;3(1):e1511.
79. Kupersmidt S, Yang IC-H, Hayashi K, et al. IKr drug response is modulated by KCR1 in transfected cardiac and noncardiac cell lines. *The FASEB journal*. 2003;17(15):2263-5.
80. Hoshi N, Takahashi H, Shahidullah M, Yokoyama S, Higashida H. KCR1, a membrane protein that facilitates functional expression of non-inactivating K⁺ currents associates with rat EAG voltage-dependent K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(36):23080-5.
81. Santoro B, Wainger BJ, Siegelbaum SA. Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(47):10750-62.
82. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(2):107-17.

83. Gravante B, Barbuti A, Milanesi R, Zappi I, Viscomi C, DiFrancesco D. Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(42):43847-53.
84. Petrecca K, Miller DM, Shrier A. Localization and enhanced current density of the Kv4. 2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(23):8736-44.
85. Sampson LJ, Leyland ML, Dart C. Direct interaction between the actin-binding protein filamin-A and the inwardly rectifying potassium channel, Kir2. 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(43):41988-97.
86. Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, Milanesi R, Terragni B, DiFrancesco D. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circulation research*. 2004;94(10):1325-31.
87. Barbuti A, Terragni B, Brioschi C, DiFrancesco D. Localization of f-channels to caveolae mediates specific β 2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;42(1):71-8.
88. Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. 1999.
89. Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*. 2004;471(3):241-76.
90. Milligan CJ, Edwards IJ, Deuchars J. HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata. *Brain research*. 2006;1081(1):79-91.
91. Chaplan SR, Guo H-Q, Lee DH, et al. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(4):1169-78.

92. Ludwig A, Budde T, Stieber J, et al. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *The EMBO journal*. 2003;22(2):216-24.
93. Dobrzynski H, Nikolski VP, Sambelashvili AT, et al. Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circulation research*. 2003;93(11):1102-10.
94. Shi W, Yu H, Wu J, et al., editors. The distribution and prevalence of HCN isoforms in the canine heart and their relation to the voltage dependence of I_f . *Biophysical Journal*; 2000: BIOPHYSICAL SOCIETY 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA.
95. Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. Occurrence and properties of the hyperpolarization-activated current I_f in ventricular myocytes from normotensive and hypertensive rats during aging. *Circulation*. 1996;94(7):1674-81.
96. Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. Characterization of the hyperpolarization-activated current, $I(f)$, in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats. *The Journal of physiology*. 1994;481(3):585-91.
97. Fernández-Velasco M, Goren N, Benito G, Blanco-Rivero J, Boscá L, Delgado C. Regional distribution of hyperpolarization-activated current (I_f) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts. *The Journal of physiology*. 2003;553(2):395-405.
98. Stilli D, Sgoifo A, Macchi E, et al. Myocardial remodeling and arrhythmogenesis in moderate cardiac hypertrophy in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(1):H142-H50.
99. Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, et al. Molecular basis of funny current (I_f) in normal and failing human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2008;45(2):289-99.

100. Zorn-Pauly K, Schaffer P, Pelzmann B, et al. I f in left human atrium: a potential contributor to atrial ectopy. *Cardiovascular research*. 2004;64(2):250-9.
101. Hoppe UC, Jansen E, Südkamp M, Beuckelmann DJ. Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. *Circulation*. 1998;97(1):55-65.
102. Yavuz M, Onat F. The Role of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in the Pathophysiology of Absence Epilepsy. *Epilepsi: Journal of the Turkish Epilepsi Society*. 2018;24(2).
103. Cao Y, Pang J, Zhou P. HCN channel as therapeutic targets for heart failure and pain. *Current topics in medicinal chemistry*. 2016;16(16):1855-61.
104. Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends in cardiovascular medicine*. 2004;14(1):23-8.
105. Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circulation research*. 2000;87(2):88-91.
106. Lakatta EG, Maltsev VA, Bogdanov KY, Stern MD, Vinogradova TM. Cyclic variation of intracellular calcium: a critical factor for cardiac pacemaker cell dominance. *Circulation research*. 2003;92(3):e45-e50.
107. Lakatta EG, Vinogradova TM, Bogdanov KY. Beta-adrenergic stimulation modulation of heart rate via synchronization of ryanodine receptor Ca²⁺ release. *Journal of cardiac surgery*. 2002;17(5):451-61.
108. Vinogradova TM, Lyashkov AE, Zhu W, et al. High basal protein kinase A–dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca²⁺ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circulation research*. 2006;98(4):505-14.

109. Méry A, Aimond F, Ménard C, Mikoshiba K, Michalak M, Pucéat M. Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1, 4, 5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(5):2414-23.
110. Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and molecular life sciences*. 2009;66(3):470-94.
111. Harzheim D, Pfeiffer KH, Fabritz L, et al. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *The EMBO journal*. 2008;27(4):692-703.
112. Stieber J, Herrmann S, Feil S, et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(25):15235-40.
113. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(10):1537-45.
114. NofE, Luria D, Brass D, et al. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation*. 2007;116(5):463-70.
115. Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, et al. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(26):27194-8.
116. Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(2):151-7.
117. Herrmann S, Stieber J, Stöckl G, Hofmann F, Ludwig A. HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *The EMBO journal*. 2007;26(21):4423-32.

118. Waxman SG. Transcriptional channelopathies: an emerging class of disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001;2(9):652-9.
119. Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nature medicine*. 2001;7(3):331-7.
120. Chen K, Baram TZ, Soltesz I. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nature medicine*. 1999;5(8):888-94.
121. Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform-and cell-specific manner. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(11):4591-9.
122. Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, Baram TZ. Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiology of disease*. 2005;19(1-2):200-7.
123. Richichi C, Brewster AL, Bender RA, et al. Mechanisms of seizure-induced 'transcriptional channelopathy' of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels. *Neurobiology of disease*. 2008;29(2):297-305.
124. McCormick DA, Contreras D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annual review of physiology*. 2001;63(1):815-46.
125. Steriade M, Contreras D. Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity. *Journal of Neuroscience*. 1995;15(1):623-42.
126. Budde T, Caputi L, Kanyshkova T, et al. Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(43):9871-82.

127. Strauss U, Kole MH, BraËuer AU, et al. An impaired neocortical I_h is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *European Journal of Neuroscience*. 2004;19(11):3048-58.
128. Kuisle M, Wanaverbecq N, Brewster AL, et al. Functional stabilization of weakened thalamic pacemaker channel regulation in rat absence epilepsy. *The Journal of physiology*. 2006;575(1):83-100.
129. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 2006;52(1):77-92.
130. Matzner O, Devor M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *Journal of neurophysiology*. 1994;72(1):349-59.
131. Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins T, Black J. Sodium channels and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(14):7635-9.
132. Jiang Y-Q, Sun Q, Tu H-Y, Wan Y. Characteristics of HCN channels and their participation in neuropathic pain. *Neurochemical research*. 2008;33(10):1979-89.
133. Mayer M, Westbrook G. A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *The Journal of physiology*. 1983;340(1):19-45.
134. Scroggs RS, Todorovic SM, Anderson EG, Fox AP. Variation in I_H, I_{IR}, and I_{LEAK} between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *Journal of Neurophysiology*. 1994;71(1):271-9.
135. Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, et al. Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *European Journal of Neuroscience*. 2006;24(7):1976-86.
136. Yao H, Donnelly DF, Ma C, LaMotte RH. Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current after chronic compression of the dorsal root ganglion. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(6):2069-74.

137. Lee DH, Chang L, Sorkin LS, Chaplan SR. Hyperpolarization-activated, cation-nonspecific, cyclic nucleotide-modulated channel blockade alleviates mechanical allodynia and suppresses ectopic discharge in spinal nerve ligated rats. *The Journal of Pain*. 2005;6(7):417-24.
138. Sun Q, Xing G-G, Tu H-Y, Han J-S, Wan Y. Inhibition of hyperpolarization-activated current by ZD7288 suppresses ectopic discharges of injured dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Brain research*. 2005;1032(1-2):63-9.
139. Armoundas AA, Wu R, Juang G, Marbán E, Tomaselli GF. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacology & therapeutics*. 2001;92(2-3):213-30.
140. Nass RD, Aiba T, Tomaselli GF, Akar FG. Mechanisms of disease: ion channel remodeling in the failing ventricle. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2008;5(4):196-207.
141. Nattel S, Khairy P, Schram G. Arrhythmogenic ionic remodeling: adaptive responses with maladaptive consequences. *Trends in cardiovascular medicine*. 2001;11(7):295-301.
142. Rivera DM, Lowes BD. Molecular remodeling in the failing human heart. *Current heart failure reports*. 2005;2(1):5-9.
143. Tomaselli GF, Marbán E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular research*. 1999;42(2):270-83.
144. Cerbai E, Mugelli A. If in non-pacemaker cells: role and pharmacological implications. *Pharmacological research*. 2006;53(5):416-23.
145. Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2007;454(4):517-22.
146. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological reviews*. 2008;88(3):919-82.

147. Borlak J, Thum T. Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *The FASEB journal*. 2003;17(12):1592-608.
148. Sartiani L, De Paoli P, Stillitano F, et al. Functional remodeling in post-myocardial infarcted rats: focus on beta-adrenoceptor subtypes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;40(2):258-66.
149. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews*. 1999;79(1):215-62.
150. Muto T, Ueda N, Opthof T, et al. Aldosterone modulates I_f current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(5):H2710-H8.
151. Cerbai E, Crucitti A, Sartiani L, et al. Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and electrophysiological remodeling of cardiac myocytes. *Cardiovascular research*. 2000;45(2):388-96.
152. Cerbai E, De Paoli P, Sartiani L, Lonardo G, Mugelli A. Treatment with irbesartan counteracts the functional remodeling of ventricular myocytes from hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2003;41(5):804-12.
153. Yasui K, Liu W, Opthof T, et al. I_f current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circulation research*. 2001;88(5):536-42.
154. Luo X, Lin H, Pan Z, et al. Down-regulation of miR-1/miR-133 Contributes to Re-expression of Pacemaker Channel Genes HCN2 and HCN4 in Hypertrophic Heart*♦. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(29):20045-52.
155. Thuringer D, Lauribe P, Escande D. A hyperpolarization-activated inward current in human myocardial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1992;24(5):451-5.
156. Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current i_f in adult canine cardiac ventricular myocytes. *The Journal of physiology*. 1995;485(2):469-83.

157. Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, et al. The properties of the pacemaker current I_{fin} in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33(3):441-8.
158. Gloss B, Trost SU, Bluhm WF, et al. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor α or β . *Endocrinology*. 2001;142(2):544-50.
159. Pachucki J, Burmeister LA, Larsen PR. Thyroid hormone regulates hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN2) mRNA in the rat heart. *Circulation research*. 1999;85(6):498-503.
160. Tsuboi Y, Takeda M, Tanimoto T, et al. Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Pain*. 2004;111(3):323-34.
161. Cho H-j, Furness JB, Jennings EA. Postnatal maturation of the hyperpolarization-activated cation current, I_h , in trigeminal sensory neurons. *Journal of neurophysiology*. 2011;106(4):2045-56.
162. Emery EC, Young GT, Berrocoso EM, Chen L, McNaughton PA. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science*. 2011;333(6048):1462-6.
163. Jiang Y-Q, Xing G-G, Wang S-L, et al. Axonal accumulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels contributes to mechanical allodynia after peripheral nerve injury in rat. *PAIN®*. 2008;137(3):495-506.
164. Wells J, Rowland K, Proctor E. Hyperpolarization-activated channels in trigeminal ganglia innervating healthy and pulp-exposed teeth. *International endodontic journal*. 2007;40(9):715-21.
165. Cho H-J, Staikopoulos V, Furness J, Jennings E. Inflammation-induced increase in hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel protein in

trigeminal ganglion neurons and the effect of buprenorphine. *Neuroscience*. 2009;162(2):453-61.

166. Luo L, Chang L, Brown S, et al. Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience*. 2007;144(4):1477-85.

167. Notomi T, Kuno M, Hiyama A, Ohura K, Noda M, Skerry TM. Zinc-induced effects on osteoclastogenesis involves activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide modulated channels via changes in membrane potential. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(9):1618-26.

168. Ross F, editor *Molecular events regulating differentiation and function of osteoclasts*. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH; 2004: AMER SOC BONE & MINERAL RES 2025 M ST, NW, STE 800, WASHINGTON, DC 20036

169. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-5.

170. Matthews MA. Microglia and reactive "M" cells of degenerating central nervous system: Does similar morphology and function imply a common origin? *Cell and tissue research*. 1974;148(4):477-91.

171. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*. 1996;19(8):312-8.

172. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*. 2008;8(12):958-69.

173. Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, et al. The impact of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) and voltage-gated potassium KCNQ/Kv7 channels on primary microglia function. *Journal of neuroinflammation*. 2020;17(1):1-17.

174. Eder C. Regulation of microglial behavior by ion channel activity. *Journal of neuroscience research*. 2005;81(3):314-21.

175. Färber K, Kettenmann H. Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia*. 2006;54(7):656-65.
176. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology*: Garland science; 2016.
177. Lackie J. *A dictionary of biomedicine*: Oxford University Press; 2010.
178. Younger P. *Stedman's Medical Dictionary*. Reference Reviews. 2007.
179. Cavaillon J-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon*. 2018;149:45-53.
180. Petricevich VL. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.
181. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity (2001) *J. Endotoxin Res*. 2012;7:167-20.
182. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Critical care medicine*. 2001;29(7):S21-S7.
183. Mazgaen L, Gurung P. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(2):379.
184. Smith Pe, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
185. Murray PJ. Macrophage polarization. *Annual review of physiology*. 2017;79:541-66.
186. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009;27(1):451-83.
187. Abramson S, Gallin J. IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *The Journal of immunology*. 1990;144(2):625-30.

188. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*. 2010;11(10):889-96.
189. Grohmann U, Belladonna ML, Vacca C, et al. Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN- γ . *The Journal of Immunology*. 2001;167(1):221-7.
190. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(6):1801.
191. Werdan K, Schmidt H, Ebel H, et al. Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2009;87(4):266-74.
192. Zorn-Pauly K, Pelzmann B, Lang P, et al. Endotoxin impairs the human pacemaker current *I_f*. *Shock*. 2007;28(6):655-61.
193. Britt Jr RD, Locy ML, Tipple TE, Nelin LD, Rogers LK. Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse transformed Clara cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2012;29(1-2):213-22.
194. Gökşen US, Kelekçi NG. Antiinflamatuvar tedavide yeni bir yaklaşım: siklooksijenaz ve 5-lipooksijenazın dual inhibitörleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2010(1):81-117.
195. Ingram SL, Williams JT. Modulation of the hyperpolarization-activated current (*I_h*) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *The Journal of physiology*. 1996;492(1):97-106.

