



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**P2X RESEPTÖRLERİNİN AKTİVE ETTİĞİ
MEMBRAN GEÇİRGENLİĞİNDE SEÇİCİLİĞİNİN, TÜR
FARKLARININ VE GEDİK-KAVŞAK PROTEİNLERİNİN
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Şerife CANKURTARAN SAYAR

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet UĞUR**

2015- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**P2X RESEPTÖRLERİNİN AKTİVE ETTİĞİ
MEMBRAN GEÇİRGENLİĞİNDE SEÇİCİLİĞİNİN, TÜR
FARKLARININ VE GEDİK-KAVŞAK PROTEİNLERİNİN
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Şerife CANKURTARAN SAYAR

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet UĞUR**

2015- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Doktora Programı

Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

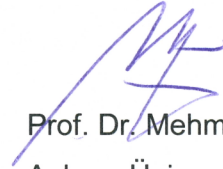
Tez Savunma Tarihi: 05/08/2015



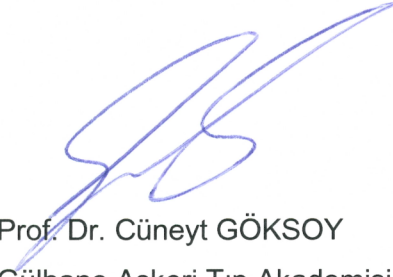
Prof. Dr. Ogun ONARAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



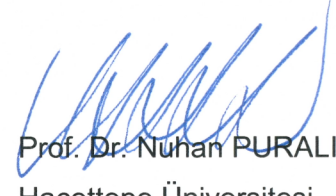
Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Cüneyt GÖKSOY
Gölhane Askeri Tıp Akademisi



Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
İÇİNDEKLER	ii
ÖNSÖZ	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER	vi
ÇİZELGELER	x
1. GİRİŞ	1
1.1 P2X Reseptör Ailesi	1
1.1.1 P2X ₁ Reseptörü	3
1.1.2 P2X ₂ Reseptörü	4
1.1.3 P2X ₃ Reseptörü	6
1.1.4 P2X ₄ Reseptörü	7
1.1.5 P2X ₅ Reseptörü	9
1.1.6 P2X ₆ Reseptörü	10
1.1.7 P2X ₇ Reseptörü	10
1.1.8 Gedik-Kavşak Proteinleri	15
1.1.9 Tez Çalışmasının Amacı	18
2. GEREÇ ve YÖNTEM	20
2.1 Hücre Kültürü	20
2.2 Transfeksiyon ve Klonlama	21
2.3 Membran Geçirgenliği Ölçümü	21
2.3.1 YOPRO-1 Geçirgenliği Ölçümü	24
2.3.2 Lucifer Yellow Geçirgenliği Ölçümü	28
3. BULGULAR	33

3.1	RAW 264.7 VE HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Membran Geçirgenliğinin Karakterizasyonu	33
3.1.1	RAW 264.7 ve HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Membran Geçirgenlikleri ve Bunların Seçiciliklerindeki Farklılık	33
3.1.2	RAW 264.7 ve HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde Agonist Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişinin Farmakolojik Profili	35
3.1.3	RAW 264.7 ve HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde Agonist Uyarısıyla Oluşan Lucifer Yellow Girişinin Farmakolojik Profili	38
3.1.4	RAW 264.7 ve HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişinin Seçici P2X ₇ Antagonist Duyarlılığı	41
3.1.5	RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Lucifer Yellow Girişinin Seçici P2X ₇ Antagonist Duyarlılığı	44
3.2	RAW 264.7 VE HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde P2X ₇ Aktivasyonunda Panneksin-1 Ve Anyon Taşıyıcısı İnhibitörlerinin Etkisi	45
3.2.1	CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 ve HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Blebilenmeye Etkisi	46
3.2.2	CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişine Etkisi	46
3.2.3	CBX, NPPB ve NFA' nın HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişine Etkisi	52
3.2.4	CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Lucifer Yellow Girişine Etkisi	58
3.2.5	CBX' in HEK-mP2X ₇ Hücrelerinde Lucifer Yellow Girişine Etkisi	62
3.2.6	CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow Girişi Arasında Ayırıştırıcılığı	64
3.2.7	RAW 264.7 Hücrelerinde ATP ile Artan Lucifer Yellow Girişinin Seçici P2X ₇ Antagonist Duyarlılığı	65
4.	TARTIŞMA	69
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	74
	ÖZET	75
	SUMMARY	76
	KAYNAKLAR	77
	ÖZGEÇMİŞ	81

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, P2X₇ reseptörünün ATP uyarısıyla oluşturduğu geçirgenliği karakterize etmek ve gedik-kavşak proteinleri ve/veya anyon taşıyıcılarının bu geçirgenlikte rollerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla endojen olarak oluşan pozitif (YOPRO-1) ve negatif (Lucifer Yellow) geçirgenliğin P2X₇ aracılı olduğu farmakolojik olarak gösterilmiştir. Bundan sonra, P2X₇ reseptör aracılı iki tip geçirgenliğin oluşumunda reseptörün yeterli olup olmadığı test edilmiştir. RAW 264.7 hücrelerinden klonlanan P2X₇ reseptör cDNA' sı HEK hücrelerine transfekte edilmiş ve bu hücrelerde (HEK-mP2X₇) ATP uyarısıyla sadece pozitif geçirgenlik gözlenmiştir. Bu bulgu, negatif geçirgenlik için reseptörün ek bir proteine ihtiyacı olduğunu düşündürmüştür. Bu ek protein olarak anyon taşıyıcıları ve panneksin-1 adlı gedik-kavşak proteini düşünülmüş ve bu proteinlerin inhibitörleri kullanılarak, RAW 264.7 hücrelerinde gözlenen ATP aracılı negatif geçirgenliğin inhibisyonu incelenmiş ancak olumlu bir sonuç alınamamıştır. Sonuç olarak RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan pozitif ve negatif geçirgenliklerin P2X₇ aracılı olduğu gösterilmiş, negatif geçirgenliğin oluşması için P2X₇ reseptörüne ek olarak başka bir protein ve/veya modifikasyonun gerekliliği ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasında katkıları ve desteklerinden dolayı Biyofizik anabilim dalı ailesinin tüm bireylerine,

Moleküler Biyoloji ve Teknoloji Araştırma Geliştirme Birimi elemanlarına,

transfeksiyon ve klonlama çalışmaları için Prof. Dr. Özlem UĞUR' a,

maddi ve manevi desteklerini asla unutamayacağım biricik anne-babam Hatice-Şakir CANKURTARAN' a,

maddi-manevi destekçim, çalışma arkadaşım ve biricik dostum Dr. Sevda LÜLE' ye, danışmanım Prof. Dr. Mehmet UĞUR' a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının tamamı, TUBITAK tarafından 112 S 615 proje numarasıyla desteklenmiştir.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP	Adenosine 5'-diphosphate
ATP	Adenosine 3'-trifosfat
BBG	Brilliant Blue G
BN-PAGE	Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate
cDNA	Circular DNA
CBX	Carbenoxolone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EC50	Effective Concentration 50
FBS	Fetal Bovine Serum
HEK	Human Embryonic Kidney
IC50	Inhibitory Concentration 50
IL-1β	Interleukin-1 β
NFA	Niflumic acid
NMDG	N-Methyl-D-glucamine
NPPB	5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid
PMT	Photo Multiplier Tube
ROI	Region Of Interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

ŞEKİLLER

Şekil-1.1.8.1: Panneksin ailesinin üç üyesi panneksin-1 (panx1), panneksin-2 (panx2) ve panneksin-3 (panx3)' ün şematik gösterimi. EL: Extracellular Loop, Hücre dışı İlmeç; IL: Intracellular Loop, Hücre içi İlmeç; NT: N-Terminal, N-Ucu; CT: C-Terminal, C-Ucu

Şekil-2.3.1.1: YO-PRO-1' in eksitasyon ve emisyon spektrumları ile çalışmada kullanılan lazer dalga boyunun eksitasyon spektrumundaki yeri. — — — — — çizgileriyle gösterilen kısım YO-PRO-1 eksitasyonunu, ————— çizgileriyle gösterilen kısım emisyon spektrumunu, dikey | çizgisi ise YO-PRO-1' i uyarmak için kullanılan lazer (488 nm) ve eksitasyon spektrumundaki yerini göstermektedir.

Şekil-2.3.1.2: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 girişine örnek. 30 dakikalık süre içinde 30 saniye aralıklarla kayıt alınmasına rağmen örnek olarak sadece 0., 10. ve 20. dakikalara ait görüntüler verilmiştir.

Şekil-2.3.1.3: YO-PRO-1 sinyali DNA' ya bağlandığı zaman oluşan bir floresans sinyal olduğu için hücre içinde dağılımı son derece heterojendir. Kesite bağlı olarak floresansın heterojenliğinin ortadan kaldırılması amacıyla kesitlerdeki floresans piksel piksel toplanarak tek bir kesit oluşturulmuştur.

Şekil-2.3.1.4: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısı sırasında alınan YO-PRO-1 görüntüleri şekil-2.3.1.3' te gösterilen yolla toplandıktan sonra hücre ya da hücre grupları ROI' ler içine alınmaktadır (üst panel). Bu görüntü sadece ROI' lerin gösterilmesi amacıyla seçilmiş, 25. dakikaya ait tek bir görüntüdür. Ölçümler tüm zaman noktaları için yapılmıştır. Bu ROI' lerden ölçülen toplam sinyal ROI'lerin toplam alanına bölünerek, hücre sayısı ile normalize floresans sinyal şiddetinin zamanla nasıl değiştiği bulunmuş olur (alt panel). ATP uygulaması 2. dakikadan hemen sonra yapılmıştır.

Şekil-2.3.2.1: Lucifer Yellow' un eksitasyon ve emisyon spektrumları ile çalışmada kullanılan lazer dalga boyunun eksitasyon spektrumundaki yeri. — — — — — çizgileriyle gösterilen kısım Lucifer Yellow eksitasyonunu, ————— çizgileriyle gösterilen kısım emisyon spektrumunu, dikey | çizgisi ise Lucifer Yellow' u uyarmak için kullanılan lazer (458 nm) ve eksitasyon spektrumundaki yerini göstermektedir.

Şekil-2.3.2.2: (A) Lucifer Yellow floresansı herhangi bir bağlanma gerektirmediği ve her koşulda görüldüğü için, bu boyanın hücre içine girişinin ölçümünde z-ekseninde kesitler almayı ve hücre içi ile dışını ayırmayı sağlayan konfokal mikroskobu kullanılmıştır (B). Kesit görüntüleme işlemi zaman içinde aralıklarla yapılarak, hücre içine Lucifer Yellow girişi görüntülenebilmektedir

Şekil-2.3.2.3: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan Lucifer Yellow girişine seçilmiş bir kesitten örnek. Görüntüleme 30 dakikalık süre içinde 30 saniye aralıklarla yapılmasına rağmen 0. (sağdaki fotoğraf) ve 20. dakika (soldaki fotoğraf) temsilen gösterilmiştir.

Şekil-2.3.2.4: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan Lucifer Yellow girişinin ölçümü. Hücreler ROI' lerle işaretlenmiştir (Üst paneldeki görüntü 30 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla alınan görüntülerden sonuncusudur). Her bir ROI içinden gelen sinyal bütün deney süresi boyunca ölçülmüştür ve grafikte hepsi gösterilmiştir. Hücrenin bulunmadığı kısma çizilen ROI, arka plan ROI' sidir ve hücrelerin içinden ölçülen sinyali normalize etmek üzere kullanılmıştır (alt panel).

Şekil-3.1.1.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uygulamasıyla oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. **(A)** RAW 264.7 hücrelerinde 300 µM ATP uygulamasıyla oluşan YO-PRO-1 girişi (üst panel), Lucifer Yellow girişi (alt panel) **(B)** HEK-mP2X₇ hücrelerinde 1 mM ATP uygulamasıyla oluşan YO-PRO-1 girişi (üst panel), Lucifer Yellow girişi (alt panel). Görüntüler, konfokal mikroskopla 30 sn aralıklarla 30 dk. boyunca yapılan xyzt kayıtlarından örnek olarak seçilen 0. ve 20. dk' ya ait tek bir z düzlemi görüntüsüdür.

Şekil-3.1.2.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin YO-PRO-1 girişi için agonist profili . **(A)** RAW 264.7 hücrelerinde çeşitli dozlarda BzATP, ATP ve ADP uygulanarak elde edilen floresans artış eğimlerinden, agonist yokluğunda ölçülen bazal eğim çıkarılarak agonist konsantrasyonun (molar) logaritmasına karşı çizilmiştir (sol panel), sol panelde elde edilen değerlerden ortalama minimum yanıt çıkarılmış ve ortalama maksimum yanıtı oranlanarak agonist konsantrasyonuna karşı çizilmiştir (sağ panel). **(B)** RAW 264.7 hücreleri için test edilen agonistler HEK-mP2X₇ hücreleri için de test edilmiş, aynı şekilde işlenmiştir. ■, BzATP; ■, ATP ve ■, ADP ile elde edilen data noktalarını, ----- BzATP' nin; - - - - - ATP' nin; - - - - - ADP' nin doz-yanıt eğrisine yapılan fitleri temsil etmektedir. Şekil içinde verilen EC50 değerleri, doz-yanıt eğrisine yapılan fit kullanılarak hesaplanan ve maksimum yanıtın yarısını oluşturan agonist konsantrasyonun logaritmasıdır. Deneyler plaka okuyuculu spektrofloremitrede yapılmıştır. Sonuçlar 8-10 ayrı gün yapılan bağımsız deneylerden elde edilmiştir. Data noktaları ortalama ± SEM olarak verilmiştir. (—) işareti BzATP ile (—) işareti ile gösterilen sonuçlar ise konfokal mikroskopta yapılan deneylerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir.

Şekil-3.1.3.1: RAW 264.7 hücrelerinin Lucifer Yellow girişi için agonist profili ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin Lucifer Yellow geçirgenliği. **(A)** RAW 264.7 hücrelerinde çeşitli dozlarda BzATP, ATP ve ADP uygulanarak elde edilen hi/hd oranlarının zamansal toplamaları (sol panel), sol panelde elde edilen değerler ortalama maksimum yanıtı normalize edilmesi (sağ panel). ■, BzATP; ■, ATP ve ■, ADP' dir. -- - - - BzATP, - - - - - ATP, - - - - - ADP doz-yanıt eğrisine yapılan fitleri temsil etmektedir. Şekil içinde verilen EC50 değerleri, doz-yanıt eğrisine yapılan fit kullanılarak hesaplanan ve maksimum yanıtın yarısını oluşturan agonist konsantrasyonun logaritmasıdır. **(B)** HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP (■, 1 mM) uygulanarak veya uygulanmayarak (■, ATP 0) yapılan deneylerden ölçülen ve 0., 10. ve 20. dk' ya ait hücre içi ve hücre dışı floresansların oranı. Her bir ölçüm noktası 62-165 arası sayıda hücreden elde edilmiş ve deneyler 5-8 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data günlerin ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

Şekil-3.1.4.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin seçici P2X₇ reseptör antagonisti duyarlılığı. **(A)** RAW 264.7 hücreleri, seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 ile 8 dakika 37 °C' de inkübe edilmiş, farklı konsantrasyonlarda A740003 varlığında ATP (■ 300 µM ve ■ 100) uygulanarak, A740003 konsantrasyonuna karşı YO-PRO-1 floresans artışı elde edilmiş ve A74003 yokluğunda elde edilen değere normalize edilmiştir. Doz-inhibisyon eğrisine yapılan fitten hesaplanan IC50 değeri, A74003' ün maksimum inhibisyonun yarısını oluşturduğu konsantrasyonunu göstermektedir ve grafik içinde, 100 µM ve 300 µM ATP için ayrı ayrı verilmiştir. **Grafik içi:** ATP 300 µM ve gösterilen derişimde A740003 kullanılarak RAW 264.7 hücrelerinde konfokal mikroskopta elde edilen değerler ■ işaretiyle gösterilmiştir. Bu noktaların üzerine büyük şekildedeki fit edilen eğri yerleştirilmiştir. **(B)** HEK-mP2X₇ hücrelerinde de 300 µM ATP yanıtlarının A740003 ile oluşan doz-inhibisyon ilişkisi RAW 264.7 hücreleriyle aynı protokolle spektrofloremitre de elde edilmiş ve doz-inhibisyon eğrisine yapılan fitten hesaplanan IC50 değeri grafik içinde verilmiştir. Deneyler 4-5 ayrı gün tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir.

Şekil-3.1.5.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin seçici P2X₇ reseptör antagonisti duyarlılığı. RAW 264.7 hücrelerinde, farklı derişimlerde seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 varlığında ATP (100 µM) uygulanmış ve A740003 doz-inhibisyon eğrisi elde edilmiştir. Bütün data noktaları, antagonist yokluğunda elde edilen maksimum yanıtın ortalamasına normalize edilmiştir (0 ve -8 deki yanıtların ortalaması). Grafik içindeki IC50 değeri, 100 µM ATP için A74003' ün maksimum inhibisyonun yarısını oluşturduğu konsantrasyonunu göstermektedir. Deneyler 6 ayrı gün tekrar edilmiştir. HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uygulamasıyla Lucifer Yellow girişi gözlenmediğinden, antagonist duyarlılığı bu yanıt için test edilmemiştir.

Şekil-3.2.2.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin CBX duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3, 7, 11, 33 ve 100 µM CBX ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 µM)

uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μ M + 0 μ M CBX koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

şekil-3.2.2.2: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin NPPB duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M NPPB ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μ M + 0 μ M NPPB koşulunda elde edilen floresans artış eğiminine göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir (ATP 0 NPPB 33 deneyi 1 gün yapılmıştır). veriler, ortalama $\pm$ SEM verilmiştir.

şekil-3.2.2.3: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin NFA duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M NFA ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μ M + 0 μ M NFA koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

şekil-3.2.2.4: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinde görülen NPPB ve NFA duyarlılığının taşıyıcı (DMSO) etkisi. RAW 264.7 hücreleri ayrıntıları "materyal ve metod" kısmında açıklanan nedenlerle 0, 1/1000 ve 1/3000 oranında sulandırılmış DMSO ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μ M + 0 DMSO koşulunda elde edilen floresans artış eğiminine göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir

şekil-3.2.3.1: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin CBX duyarlılığı. HEK-mP2X7 hücreleri 0; 3,7; 11; 33 ve 100 μ M CBX ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak spektrofloreometrede YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 μ M CBX koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.

şekil-3.2.3.2: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin NPPB duyarlılığı. **(B)** HEK-mP2X7 hücreleri 0,11, 33 ve 100 μ M NPPB ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 μ M NPPB koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.

şekil-3.2.3.3: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinde NFA duyarlılığı. HEK-mP2X7 hücreleri 0,11, 33 ve 100 μ M NFA ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak spektrofloreometrede YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 μ M NFA koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.

şekil-3.2.3.4: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinde görülen NPPB ve NFA duyarlılığında taşıyıcı (DMSO) etkisi. HEK-mP2X₇ hücreleri 1/1000 DMSO ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 DMSO koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.

şekil-3.2.4.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin CBX duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M CBX ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmi ř ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oranlararak (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Alt panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μ M + CBX 0 koşulunda elde edilen alanların

ortalamasına göreceli verilmiştir. Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir (ATP 0 CBX 100 deneyi 1 gün yapılmıştır). Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Şekil-3.2.4.2: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin NPPB duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M NPPB ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oran olarak (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Alt panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μ M + NPPB 0 koşulunda elde edilen alanların ortalamasına göre kat artışı şeklinde verilmiştir. Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir (ATP 300 μ M NPPB 100 μ M deneyi 1 gün yapılmıştır). Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Şekil-3.2.4.3: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin NFA duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M NFA ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oran olarak (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Sol panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μ M NFA 0' ın kat artışı şeklinde verilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Şekil-3.2.4.4: RAW 264. hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinde görülen NPPB ve NFA duyarlılığında taşıyıcı (DMSO) etkisi. RAW 264.7 hücreleri 0, 1/1000,1/3000 sulandırılmış DMSO ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oran olarak (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Alt panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μ M + DMSO 0 koşulunda elde edilen alanların ortalamasına göreceli verilmiştir. Veriler 34-197 hücreden elde edilmiştir. Deneyler 2-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Şekil-3.2.5.1 HEK-mP2X₇ hücrelerinde CBX' in ATP ile Lucifer Yellow aktivasyonu. HEK-mP2X₇ hücreleri 33 μ M CBX ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 1mM) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansın oran olarak (hi/hd) 0., 10. ve 20. dakikalar için ölçülmüştür. Veriler her bir uygulama için 0. dakikaya normalize edilmiştir. Deneyler 1-3 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Şekil-3.2.6.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişlerinin CBX, NPPB ve NFA duyarlılığı bakımından ayrışması **(A)** Ayrıntıları kısım 3.2.2 ve kısım 3.2.4' te açıklanarak gerçekleştirilen YO-RPO-1 ve Lucifer Yellow geçirgenliklerine CBX' in, **(B)** NPPB' nin **(C)** NFA' nın konsantrasyon bağımlı etkisi aynı grafikte gösterilmiştir.

Şekil-3.2.7.1: RAW 264.7 hücrelerinde CBX ile artan ATP indüklemeli Lucifer Yellow girişinin seçici P2X₇ antagonisti A740003 duyarlılığı. **(A)** RAW 264.7 hücreleri CBX 0, CBX 33 μ M ve CBX 33 μ M+A740003 10 μ M varlığına ayrıntıları "materyal metod" kısmında açıklanan şekilde 8 dakika 37 °C' de inkübe edilmiş ve ATP (100 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında görüntülenmiştir ve ölçülmüştür. **(B)** A panelinde farklı koşullar için elde edilen hi/hd-zaman eğrilerinin altında kalan alan hesaplanmıştır. Tüm eğrilerin başlangıç değerinin altında kalan sabit alan, bütün eğrilerin altında kalan alanlardan çıkarılarak, 0 μ M CBX+ 0 μ M A740003' e oranlanmıştır. Deneyler 4-5 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir.

ÇİZELGELER

Tablo-3.1.5.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin agonist profilleri ve antagonist duyarlılığı karşılaştırması. RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücreleriyle YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow için elde edilen agonist EC₅₀ değerleri ve seçici P2X₇ antagonisti olan A740003' nin, RAW 264.7 hücreleri için 100 µM ATP, HEK-mP2X₇ hücreleri için 300 µM ile elde edilen IC₅₀ değerleri. Ø, yanıt olmadığını ifade etmektedir.

1. GİRİŞ

1.1 P2X Reseptör Ailesi

Son 40 yılda yapılan deneysel çalışmalar ATP' nin sadece temel bir enerji kaynağı ve hücre içindeki nükleik asitlerin bir bileşeni olmadığını, aynı zamanda hücrelerarası iletişimde kritik bir rolü olduğunu da ortaya koymuştur (North ve Surprenant, 2000; Alves ve ark., 2013). ATP, iyonotropik P2X reseptörleri (ligand kapılı iyon kanalı reseptörleri) ve metabotropik P2Y reseptörleri (G-proteini kenetli reseptörler) aktive ederek hücreler arasındaki hızlı ve yavaş iletişimde rol oynayan belki de en eski transmitterdir.

Pürin reseptör ailesi P1 (adenozin) reseptörleri (A1, A2_a, A2_b, A3), P2X (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) ve P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) reseptör ailelerinden oluşmaktadır (Samways ve ark., 2014, Alves ve ark., 2014; Burnstock, 2013b, Jiang, 2009; Jiang ve ark., 2013; Khakh ve Jarvis, 2009; Surprenant ve North, 2009).

1994 yılı itibariyle 7 tane memeli P2X reseptör cDNA' sı (P2X₁-P2X₇) klonlanmıştır. Sonrasında ise bütün omurgalı hayvanlarda bulunduğu farkedilmiştir. P2X reseptörleri esas olarak seçici olmayan katyon kanallarıdır ve tek veya iki değerlikli küçük katyonları geçirirler. Bu bakımdan hücre membran potansiyelini değiştirmek suretiyle hücresel birçok olayı da başlatabilirler (Samways ve ark., 2014; Alves ve ark., 2014; Burnstock, 2013b; Jiang, 2009, Jiang ve ark., 2013; Alves ve ark., 2013).

Klonlanmış insan ve sıçan P2X reseptör alt tiplerinin uzunluğu 379 (sıçan P2X₆ reseptörü) ile 595 (sıçan ve insan P2X₇ reseptörleri) aminoasit arasında değişmektedir ve %35-54 arasında benzerlik göstermektedir. Hepsi iki transmembran kısma sahiptir. Agonist bağlanan uzun bir hücre dışı ilmekleri ve hücre içi N (amino)-uçlarıyla C (karboksi)-uçları bulunmaktadır. Hücre dışı kısım iki transmembran kısmı bağlayan en uzun kısımdır. C-ucu 26 (P2X₆) ile 239 (P2X₇) aminoasit arasında değişmektedir. Sadece ilk 25 aminoasit benzerlik göstermektedir ve bu durumun alt tip spesifik özellikleri gösterdiği düşünülmektedir. P2X

reseptörlerinin aminoasit dizisi diğer ligand kapılı iyon kanalları veya ATP bağlayan proteinler ile anlamlı bir benzerlik göstermemektedir. Hücre dışı bölgesi ATP bağlama bölgesini barındırmaktadır ve bu bölge alt tipler arasında iyi korunmuştur. Hücre dışı bölge ayrıca bazı metaller ve H^+ bağlanma kısmı bulundurmaktadır ama alt tipler arasında iyi korunmamıştır. (Coddou ve ark, 2011b; Burnstock, 2013).

P2X reseptörleri temel olarak, hızlı desensitize olan ($P2X_1$, $P2X_3$) ve yavaş desensitize olan/desensitize olmayanlar ($P2X_2$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_7$) olarak iki gruba ayrılır. $P2X_2$, $P2X_4$ ve $P2X_7$ reseptörleri spesifik olmayan katyon kanalı olmalarının yanında, büyük molekülleri geçirgenlik aktive etmeleri ile diğer P2X reseptörlerinden ayrılırlar (Saul ve ark., 2013; Jiang ve ark., 2013; Khakh ve Jarvis, 2009; Coddou ve ark., 2011)

P2X reseptörlerinin aktive olması için en az 3 ATP molekülünün bağlanması gerekmektedir (Khakh ve Jarvis, 2009). P2X reseptörleri homo veya hetero olarak trimerler oluştururlar. $P2X_6$ hariç bütün P2X reseptörleri homomultimer oluşturabilmektedir. $P2X_7$ reseptörü ise sadece homomultimer oluşturmaktadır (Saul ve ark., 2013; Burnstock, 2013; Khakh ve Jarvis, 2009; Jiang ve ark., 2013).

Heterotrimerik veya homomerik P2X reseptörlerinin birincil agonisti ATP olmakla beraber, alt tip bağımlı olarak maksimum yanıtın yarısını oluşturmak için gerekli agonist konsantrasyonu (EC_{50}) mikromolarlar düzeyinden milimolarlar düzeyine kadar değişkenlik göstermektedir. UTP ve UDP $P2Y'$ leri aktive ederken P2X'lerden hiçbirini ya aktive etmez ya da çok çok zayıf şekilde eder. Her ne kadar temelde benzer yapısal özellikler gösterseler de, P2X reseptörleri arasında bazı yapısal ve fonksiyonel farklar mevcuttur (Alves ve ark., 2014).

Suramin ve PPDAS ilk ve hala sıklıkla kullanılan P2X antagonistleridir. Gerçi suramin diğer bazı pürinerjik reseptörleri ve G-proteini kenetli reseptörlerin de antagonistidir. Bundan dolayı daha spesifik antagonistler keşfedilmiştir. Yakın zamanda sentez edilen selektif P2X antagonistleri bulunmakta ve tedavi hedefi olarak deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır (Saul ve ark., 2013).

P2X reseptörleri alt tiplerine göre ER' da, hücre membranında veya endozomlarda olabilmektedir (Robinson ve Murrell-Lagnado, 2013).

Günümüzdeki en önemli konu ise P2 reseptörlerinin mekanizmasını moleküler düzeyde anlamak ve bu anlayışı reseptörlerin fizyolojik ve patofizyolojik rollerinin anlaşılması için kullanmaktır. Moleküler biyolojik yaklaşımlar P2X reseptörlerinin hücre içi fizyolojisini anlamakta son derece kullanışlıdır. Farmakolojik ve gen "knock down-out" yaklaşımları, P2X reseptörlerinin ağrı ve inflamasyon gibi geniş bir patofizyolojik süreçte rol aldığını göstermiştir. Patofizyolojide P2X reseptörlerinin rollerinin anlaşılmasında birçok avantaja rağmen, bu reseptörlerin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Burnstock, 2013).

1.1.1 P2X₁ Reseptörü

P2X₁ reseptörünün ekspresyonuna dair ilk deliller Gine domuzlarında bulunmuştur. Kasılma çalışmalarında ATP' nin nörotransmitter olarak rolü incelendiğinde keşfedilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda ATP' nin α,β -metilATP ile değiştirilebildiği gösterilmiş ve P2X₁ reseptör farmakolojisinin temelleri atılmıştır. Bu reseptör genel olarak düz kas hücrelerinde bulunmaktadır. Bundan başka periferik ve merkezi sinir sistemi hücrelerinde varlığı da gösterilmiştir (Coddou ve ark., 2011).

P2X₁ reseptörünün potent agonisti ATP ve ATP analogu 2-metiltio-ATP ve ATP γ S' tir. Reseptör α,β -meATP' ye aktivasyon bakımından çok duyarlıdır. BzATP ancak ATP' ye göre (0,1-1 μ M) yüksek konsantrasyonlarda (3-30 μ M) kullanıldığında bu reseptörü aktive etmektedir (North ve Surprenant, 2000; von Kügelgen, 2008; Coddou ve ark., 2011). P2X₁ reseptörünü, suramin gibi bilinen bütün P2X reseptör antagonistleri inhibe edebilmekle beraber (IC₅₀: 1 μ M) selektif antagonisti yine bir suramin analogu olan NF023 (IC₅₀: 200 nM), NF449 (IC₅₀: 0,3-0,7 nM) ve NF279 (IC₅₀: 20 nM)' dur (North ve Surprenant, 2000, von Kügelgen, 2008; Coddou ve ark., 2011; Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012).

P2X₁ reseptörü, agonist uygulamasını takibeden 2 sn içinde hızlı desensitizasyon göstermesiyle P2X₂, P2X₄ ve P2X₇' den ayrılan bir alt tiptir (von Kugelgen, 2008; Jiang ve ark., 2013, Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012; Coddou ve ark., 2011).

Bunlara ek olarak, GFP takılı P2X₁ reseptörü eksprese ettirilmiş hücrelerde agonist indüklemeli olarak, reseptörün plazma membranı ile hücre içi kompartmanlar arasında internalizasyonu ve yeniden dağılımının olduğu gösterilmiştir (Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012; Coddou ve ark., 2011). Homomerik P2X₁ reseptörün bir splice varyantı ATP ile değil ADP ile aktive olmaktadır (Ivar von Kugelgen, 2008).

1.1.2 P2X₂ Reseptörü

İlk defa 1994 yılında klonlanmıştır (Coddou ve ark., 2011). Homomerik P2X₂ reseptörüne seçici agonist bulunmamaktadır. ATP' nin bu reseptör için EC50 değeri, P2X₁ reseptörüyle karşılaştırıldığında 10 kat fazladır. α meATP ile aktive olmamaktadır (North ve Surprenant, 2000; von Kogelgen, 2008). BzATP P2X₂ reseptörünü parsiyel olarak aktive etmektedir, ATP kadar bir yanıt oluşturmamaktadır (Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012). Literatürde çeşitli EC50 değerlerine (2-60 μ M arasında) rastlanmakla beraber ATP sıçan P2X₂ reseptörü için en potent agonisttir. Fare P2X₂ reseptörü ATP' ye karşı sıçandan daha az duyarlıyken, insan P2X₂ reseptörü ATP' ye en duyarlı türdür (Coddou ve ark., 2011).

Uzun zaman bu reseptör için seçici bir antagonist bulunmamaktaydı. Ancak nanomolar civarı konsantrasyonlarda etki eden anthraquinone türevleri olan PSB-1011' in senteziyle bu sorun aşılmıştır. Bilinen diğer P2X antagonistleri suramin ve PPDAS birkaç mikromolar civarındaki konsantrasyonlarda etkilidirler ancak P2X₁ ve P2X₃ ile karşılaştırıldığında daha az potentirler. Suramin türevleri olan NF770, NF776 ve NF778, 20-150 nM civarında IC50 değerlerine sahip potent antagonistlerdir. Diğer antagonistler TNP-ATP ve NF279 potent ancak spesifik olmayan antagonistler arasındadır (Coddou ve ark., 2011; North ve Surprenant, 2000; von Kogelgen, 2008).

Hücre dışı solüsyonun asidifikasyonu ATP' ye yanıt artmaktadır. Bu özelliğiyle, asidifikasyondan olumsuz etkilenen diğer P2X reseptörlerinden ayrılmaktadır. Yüksek konsantrasyonda ATP ile aynı etki sağlanabilmektedir. Bu da, düşük pH' ın etkisinin, reseptörün ATP' ye olan afinitesini arttırmak şeklinde olduğunu düşündürmektedir. Düşük mikromolar konsantrasyonda hücre dışı Zn^{2+} ve Cu^{2+} iyonları da ATP ile oluşan akımları arttırmaktadır. Hücre dışı Cu^{2+} düşük duyarlılığa sahip P2X₄ reseptörlerinden bu yolla ayrılabilirler. Hücre dışı Ca^{2+} varlığı akımları hızlıca inhibe etmektedir (North ve Surprenant, 2000; Saul ve ark., 2013)

Yavaş desensitizasyon göstermektedir. TM2 bölgesi yakınlarındaki C-ucunun desensitizasyon hızında rol aldığı düşünülmektedir (Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012). P2X₇ reseptörü gibi bir por aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012). P2X₄ ile heterotrimer oluşturma da fiziksel interaksyonu olduğu düşünülmektedir (Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012). P2X₁ ile heterotrimer oluşturabilir. Agonist profili P2X₁' e benzerken hücre dışı solüsyonun asidifikasyonuna duyarlılığı her iki reseptöre de benzememektedir (Coddou ve ark., 2011). P2X₆ ile heterotrimer oluşturarak, P2X₆' nın hücre membranına gitmesini sağlamaktadır (Robinson ve Murrell-Lagnado, 2013).

İnsanlar, sıçanlar, fareler ve Gine domuzları arasında çok sayıda ve fonksiyonel "splice varyant"ı bulunması dolayısıyla P2X reseptörleri arasında farklılık gösterir. Örneğin 69 aminoasidinin eksik olduğu P2X_{2b} "splice varyant"ı tam uzunlukta P2X_{2a} formuna göre daha hızlı desensitize olan fonksiyonel bir homomer oluşturmaktadır. C-ucundaki 90 aminoasidi eksik "splice varyant"ı P2X_{2e} ise P2X₁ ve P2X₃ ile karşılaştırılabilir bir desensitizasyon hızına sahiptir (Coddou ve ark., 2011; North ve Surprenant, 2000).

Tümör gelişimi ve kanser ağrılarında rolü olduğu düşünüldüğünden, ilaç hedefi olarak düşünülmektedir (Franceschini ve Adinolfi, 2014).

1.1.3 P2X₃ Reseptörü

P2X₃ reseptörü ilk olarak 1995 yılında klonlanmıştır (Coddou ve ark., 2011). ATP ve $\alpha\beta\text{meATP}'$ ye olan duyarlılığıyla P2X₁ reseptörüne benzemektedir (North ve Surprenant, 2000). 2-metilthio-ATP, ATP' den daha potent bir agonisttir (von Kogelgen, 2008).

TNP-ATP potent antagonisttir (Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012). Suramin ve PPDAS bu reseptörü inhibe eder ancak diğer P2X reseptörleriyle karşılaştırıldığında daha düşük potense sahiptir. Reseptör türleri arasında ufak farklılıklar olmakla beraber, suramin türevleri olan NF023, NF279 ve NF449 P2X₃ akımlarını birkaç mikromolar civarındaki konsantrasyonlarda inhibe edebilmektedir. Bu antagonistlerle nanomolar düzeylerinde inhibe olan P2X₁ reseptöründen bu şekilde ayrılabilir. Daha sonra sentezlenen A-317491 adlı bileşik daha potent bir antagonisttir (IC₅₀: 20 nM). P2X₁, P2X₂, P2X₄ reseptörleri üzerinde büyük bir etki göstermeksizin P2X₃ reseptörünü inhibe edebilmektedir (Coddou ve ark., 2011; North ve Surprenant, 2000; von Kogelgen, 2008).

P2X₃ ekprese eden HEK hücrelerinde 1-10 mM kadar yüksek hücre dışı Ca²⁺, ATP ile oluşan akımlar üzerinde etkisiz bulunmuştur (North ve Surprenant, 2000).

Hızlıca aktive olan ve hızlıca desensitize olan bir akım geçirir. P2X₁' in aksine P2X₃ akımları süren bir agonist uygulaması varsa tamamen desensitize olmaz (Coddou ve ark., 2011). P2X₃ reseptörü, P2X₂ ile P2X_{2/3} heterotrimerini yapar (von Kogelgen, 2008).

Transfekte HEK hücreleri ve nöronlarla yapılan son çalışmalar, P2X₃ reseptörünün agonist uyarısı olmadığı durumda, hücre içinde sürekli olarak endositoza maruz kaldığını, bu nedenle de çoğunlukla membranda değil hücre içi kompartmanlarda bulunduğunu göstermiştir. Ancak agonist uyarısı olduğu zaman membrandaki miktarı hızla artmaktadır (Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012)

P2X₃ reseptörüne benzer olarak tümör gelişimi ve kanser ağrılarında rolü olduğu düşünüldüğünden, ilaç hedefi olarak düşünülmektedir (Franceschini ve Adinolfi, 2014).

1.1.4 P2X₄ Reseptörü

P2X₄ reseptörü için ATP potent bir agonisttir ve birkaç mikromolar EC₅₀' ye sahiptir. Sıçan, insan ve fare P2X₄ reseptörleri ATP potensi bakımından çok benzemektedirler. Sıçan P2X₄ reseptörünü ayrıca 2-meATP de ATP ile benzer potenste aktive etmektedir. $\alpha\beta$ -meATP ise sıçan, fare ve insan P2X₄ reseptörleri için parsiyel agonisttir (Saul ve ark., 2013; von Kogelgen, 2008; Coddou ve ark., 2011). Literatürde bazı çalışmalar P2X₄ reseptörünü aktive etmede 2-methylthioATP (2MeSATP)' nin ATP' den 10-30 kat daha potent olduğunu ortaya koymuştur (North ve Surprenant, 2000).

Fare ve sıçan P2X₄ reseptörü bilinen P2X reseptör antagonistlerinden suramine duyarsızdır. Fare ve insan P2X₄ reseptörü PPDAS ile inhibe olabilmekteyken, sıçan P2X₄ reseptörü PPDAS'e de duyarsızdır. TNP-ATP de bir P2X₄ reseptör antagonistidir ve 15 μ M civarında IC₅₀ değerine sahiptir. Bilinen diğer P2X antagonistlerinden NF023 insan ve sıçan P2X₄ reseptörü üzerinde 100 μ M' a kadar etkisizken, BBG zayıf bir antagonisttir. P2X₄ reseptörü antagonist duyarlılığıyla da sıradışı bir reseptördür. Diğer P2X reseptörleriyle karşılaştırıldığında suramin ve NF023'e çok daha az duyarlıdır. Suramin duyarlılığı ayrıca insan ve sıçan P2X₄ reseptörleri arasında da farklılık göstermektedir. PPDAS sıçan P2X₄ reseptörü için zayıf bir antagonist iken insan P2X₄ reseptörü için daha potent bir antagonisttir. Duyarlılık farkını açıklamaya yönelik çalışmalar, reseptör türleri arasındaki moleküler düzeydeki farklara odaklanmıştır (North ve Surprenant, 2000).

P2X₄ reseptörünün çok önemli bir özelliği agonist uygulamasıyla ortaya çıkan yanıtların ivermektin ile artmasıdır. Bu reseptörün oositlerde ekspresyonuyla yapılan çalışmalar, ivermektinin, ATP ile oluşan akımları yıkama sonucu ortadan kalkacak şekilde tersinir olarak arttırdığını ortaya koymuştur. Benzer etki P2X₂, P2X₃ veya P2X₇ üzerinde görülmemiştir. Cibacron blue da benzer arttırıcı etkiyi P2X₄

eksprese eden HEK hücrelerinde göstermiştir, P2X₂ eksprese eden hücrelerde göstermemiştir (North ve Surprenant, 2000).

P2X₄ reseptörü Zn²⁺ ya en duyarlı reseptörlerden biridir ancak duyarlılığı P2X₂ kadar değildir. Cu²⁺ ile inhibe olmaması dolayısıyla P2X₂ reseptöründen ayrılmaktadır (North ve Surprenant, 2000). P2X₁ reseptörüyle heteromer (P2X_{1/4}) oluşturabilmektedir. Heteromerin kinetik özellikleri P2X₄ reseptörüne benzerken, farmakolojik profili ise P2X₁ reseptörüne benzemektedir (Coddou ve ark., 2011).

P2X₄ reseptörü birçok sinir hücresinde bulunmaktadır (Saul ve ark., 2013; von Kogelgen, 2008). P2X₆ ile heterotrimer oluşturarak P2X₆'nın hücre membranına gitmesini sağlamaktadır (Robinson ve Murrell-Lagnado, 2013).

1.1.5 P2X₅ Reseptörü

P2X₅ reseptörü ilk defa 1996 yılında klonlanmıştır (Coddou ve ark., 2011; Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012). Transfekte edildiklerinde, kemirgen P2X₅ reseptörleri membranda iyi eksprese olmalarına rağmen küçük akımlar oluştururken, diğer tür P2X₅ reseptörlerinin hem membran ekspresyon miktarı hem de akımları büyüktür. Bunun nedeni henüz anlaşılabilmiş değildir (Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012; Coddou ve ark., 2011). ATP 0.4-8 μ M EC₅₀ değeriyle bu reseptör için en potent agonisttir. Sıçan, insan ve fare P2X₅ reseptörleri arasında ATP EC₅₀ değerleri bakımından pek fark gözlenmemiştir ancak agonist potens sıralaması reseptör türleri arasında farklılık gösterebilmektedir. Sıçan P2X₅ reseptörü için bu sıralama ATP = 2-MeSATP = ATP γ S > $\alpha\beta$ -meATP = BzATP, insan P2X₅ reseptörü için ATP > BzATP > $\alpha\beta$ -meATP'dir (Coddou ve ark., 2011). P2X₅ reseptörü eksprese eden hücrelerde ATP ile oluşan yanıtlar, yöntem ve prosedür çok benzemesine rağmen P2X₁, P2X₂, P2X₃ ve P2X₄ reseptörlerinin oluşturduğu yanıtlardan 100 kat kadar düşüktür. Buna rağmen P2X₅' in agonist ve antagonist duyarlılık profili P2X₂' ye çok benzemektedir (North ve Surprenant, 2000).

Sıçan P2X₅ reseptörü için antagonist potens sıralaması PPDAS > TNP-ATP > suramin, insan P2X₅ reseptörü için PPDAS > BBG > suramindir (Coddou ve ark., 2011; von Kügelgen, 2008). Hücre dışı iyonların etkisi bu reseptör için araştırılmamıştır (North ve Surprenant, 2000).

P2X₅ reseptörünün ER'da kalmasına neden olan bir aminoasit dizisi bulundurduğuna inanılmaktadır ki bu da reseptörün homomer olarak membrandaki ekspresyonunun düşüklüğünü açıklamaktadır (Murrell-Lagnado ve Qureshi, 2008; Robinson ve Murrell-Lagnado, 2013).

Diğer omurgalıların tersine insanda 2 tane (P2X_{5a} ve P2X_{5b}) splice varyant bulunmuştur. Bunlar ATP bağlanma bölgesi ve TM2 bölgesinden yoksun olduklarından fonksiyonel değildir (Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012; Saul ve ark., 2013). Kemirgenlerde merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunmakta, insanda ise daha çok immün ve merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır. İskeler kası gelişimi ve onarımında rolü olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak, birçok kanser dokusunda

P2X₅ reseptör ekspresyonunun yükseldiği görülmüştür (Coddou ve ark., 2011; Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012).

1.1.6 P2X₆ Reseptörü

P2X₅ reseptörüyle beraber 1996 yılında klonlanmıştır (Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012). P2X₆ reseptörü bilinen P2X agonistlerinden ATP ve 2-meSATP' ye son derece duyarlıdır ancak ATP analoglarından $\alpha\beta$ -meATP' ye duyarsızdır. Bilinen P2X antagonistlerden TNP-ATP ve PPDAS ile inhibe olmaktadır (Coddou ve ark., 2011). P2X₆ akımları desensitize olmamaktadır.

P2X₆ reseptörü kararlı homomer oluşturamayan tek P2X reseptörüdür. Bunun sonucu olarak ER' da kalmaktadır. Daha çok P2X₂ ve P2X₄ ile P2X_{2/6} ve P2X_{4/6} heteromerlerini oluşturmak suretiyle fonksiyon göstermektedir (Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012; Murrell-Lagnado ve Qureshi, 2008; Robinson ve Murrell-Lagnado, 2013; Burnstock, 2013). P2X_{2/6}' nın heteromerinin farmakolojik özellikleri P2X₂' ye, P2X_{4/6} heteromerinin farmakolojik özellikleri ise P2X₄' e benzemektedir (Coddou ve ark., 2011; Saul ve ark., 2013).

P2X₆ reseptörünün 4 tane splice varyantı rapor edilmiştir. P2X₆ reseptörü bakımından "knockout" fareler mevcut olmadığından organizmadaki rolü henüz açıklığa kavuşamamıştır (Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012). N-ucundaki ilk 14 aminoasitin kesilmesi veya bu bölgedeki serin aminoasitlerinin yüksüz/negatif yüklü aminoasitlerle değiştirilmesi bu reseptörün membrandaki ekspresyonunun artışına engel olmaktadır. P2X₆ reseptörü çoğunlukla iskelet kası ve sinir sisteminde bulunmaktadır (Kaczmarek-Hajek ve ark., 2012; Coddou ve ark., 2011).

1.1.7 P2X₇ Reseptörü

İlk olarak 1996 yılında klonlanmıştır. Topolojik olarak diğer P2X reseptörlerine benzemektedir. Hücre içinde N ve C-ucu, membranda 2 tane transmembran bölgesi (TM1 ve TM2) bulunmakta, TM1 ve TM2 bölgeleri hücre dışında birleştirilmektedir.

Diğer P2X reseptörlerinden farklı olarak C-ucu uzundur ve sistein aminoasidi bakımından zengin bölgeler içermektedir. P2X₇ reseptörü 595 aminoasitten oluşması ve 239 aminoasit uzunluğunda ve sistein aminoasidi bakımından zengin C-ucu ile diğer P2X reseptörlerinden ayrılmaktadır (Coddou ve ark., 2011; Alves ve ark., 2013; Jarvis ve Khakh, 2009; Jiang, 2009; Jiang ve ark., 2009; Burnstock, 2013).

Farmakolojik profilinden dolayı da P2X ailesinin en farklı üyelerinden biridir (Burnstock, 2013b; Alves ve ark., 2013; North ve Surprenant, 2000; Khakh ve Jarvis, 2009; Jiang, 2009). Aktivasyonu için yüksek konsantrasyonda ATP gerekmektedir. BzATP (EC50: 3 µM), ATP (EC50: 100 µM)' den daha potent bir agonisttir. BzATP, P2X₇' ye spesifik agonist değildir ama diğer P2X reseptörleri için BzATP, ATP ile ya eşit potenstedir yada daha az potenttir. Diğer P2X' ler için konuşulan agonistlerden ATPyS ve ADP, P2X₇ reseptörü üzerinde çok az etkiye sahiptir. Bunun yanında, insan P2X₇ reseptörü sıçan ve fare P2X₇ reseptörlerine göre daha düşük agonist duyarlılığına sahiptir (North ve Surprenant, 2000; Coddou ve ark., 2011).

Bilinen P2X antagonistlerinden suramine duyarsızdır. Suramin analoğu olan NF279 (IC50: 3-100 µM) ile inhibe olabilmektedir. Diğer P2X antagonistlerinden PPDAS (IC50: 1-60 µM), Brilliant Blue G (BBG, IC50: 15-250 µM) ve tersinmez antagonist OxATP (IC50: 100-300 µM) ile inhibe olmakla beraber, bu antagonistler ya birkaç saatlik inkübasyon gerektirmektedir yada sözü edilen dozlarda P2X₁ ve P2X₂ akımlarını da inhibe etmektedir. Son zamanlarda birkaç tane selektif P2X₇ antagonisti bulunmuştur. Bunlar yeni ve ilaç firmaları tarafından sentezlenmiş bileşiklerdir. Siyanoguanidin türevi bir bileşik olan A-740003 sıçan ve insan P2X₇ reseptörünü nanomolar düzeyinde P2X₇ reseptör akımlarını (≈10 nM) ve boya girişini (≈100 nM) inhibe edebilmektedir. Fare P2X₇ reseptörü için ise daha az potenttir. Benzer bir siyanoguanidin türevi A-438079 (Abbot), A-740003 (Abbot) 'den daha potent bir antagonist iken daha sonra sentezlenen A-804598 (Abbot) insan, fare ve sıçan P2X₇ reseptörü için diğer iki antagonistten potenttir. AZ11645373 (AstraZeneca) ve AZ10606120 (AstraZeneca) sıçan P2X₇ reseptöründe fare ve insan türünde olduğundan daha az etkilidir. Adamantin türevi bir bileşik olan GSK314181A (GlaxoSmithKline) ise insan ve fare türünde nanomolar düzeyinde, sıçan türünde ise mikromolar düzeyinde konsantrasyonlarda etkili bulunmuştur (North RA, Surprenant A., 2000; Coddou ve ark., 2011; Alves ve ark., 2013; Khakh

ve Jarvis, 2009, Donnelly-Roberts, 2009a; Donnelly-Roberts, 2009b; Saul ve ark., 2013; Jiang, 2009).

P2X₇ reseptörü üzerinde ATP' nin etkisi, hücre dışı divalenlerin azaltılmasıyla arttırılabilmektedir (North ve Surprenant, 2000; Jiang, 2009; Coddou ve ark., 2011a; Saul ve ark., 2013). Hücre dışı divalenlerin P2X₇ reseptörü üzerinde yanıtları azaltıcı yöndeki etkileri nedeniyle birçok grup divalsiz solüsyonda deney yapmayı tercih etmektedir. Hücre dışı solüsyonun yüksek pH' ı da P2X₇ reseptör aracılı boya girişi ve akımlarını azaltıcı yönde modüle etmektedir (North ve Surprenant, 2000; Coddou ve ark., 2011).

Klonlanmasından sonra rekombinant P2X₇ reseptörleriyle yapılan birçok çalışmaya rağmen P2X₇ reseptörünün aktivasyon özellikleri henüz aydınlatılamamıştır. Aktivasyonu hücre membranında “bleb” olarak tanımlanabilecek morfolojik değişikliklere neden olmakta, hücre membranını, 800 Da civarında büyük moleküllere geçirgen hale getirmektedir. Bleblenmenin mekanizması bilinmemekle beraber, büyük moleküllere geçirgenlik ile ayrı aktivasyon yolları olduğu, agonist uyarısı süresinin değişmesiyle bleblenmenin de tarz değiştirdiği gösterilmiştir (Verhoef ve ark., 2003; Mackenzie 2005). P2X₇ reseptörü, kısa agonist uygulamasında diğer P2X reseptörleri gibi seçici olmayan bir katyon kanalı oluşturmaktadır. Ancak uzamış agonist uygulamasında “geçirgenlik” adı verilen ve yukarda ifade edilen floresan boya olan YOPRO-1 gibi 800 Da'a kadar olan büyük molekülleri geçiren bir yolak aktive etmektedir. Bu aktivasyonu açıklamak amacıyla, önceleri bu geçirgenliğin, kanalın zamanla genişleyerek büyük bir por oluşturmasıyla gerçekleştiği düşünülmüştür ancak daha sonra ikinci bir hipotez olarak reseptörün kendisinin değil aktive ettiği ayrı bir proteinin bu geçirgenliği oluşturduğu öne sürülmüştür. Her iki hipotez için de delil oluşturacak bulgular mevcuttur. Birinci hipotezi destekler nitelikte, reseptörün zamanla genişleyerek büyük moleküllere geçirgen hale geldiğini iddia eden bir çalışmada, agonist birkaç saniyelik süre için uygulandığında sadece bir fazlı akım gözlenmekte, agonist uygulaması uzatıldığında ise akımda ikinci bir faz daha gözlemlenmektedir. Çalışmayı gerçekleştiren grup, ikinci faz akım ile büyük moleküllere geçirgenliğin zamansal olarak örtüşmesinden yola çıkarak, reseptörün önce küçük katyonlara geçirgen bir katyon kanalı olduğunu bir süre sonra kanal porunun genişlemesiyle büyük moleküllere geçirgen hale geldiğini ifade etmişlerdir (Yan ve ark., 2008). İkinci hipotezi destekler nitelikte,

reseptörün sadece seçici olmayan katyon kanalı olduğunu, boya girişinin ise ayrı bir geçirgenlik yolağı olduğunu iddia eden diğer bir çalışmada ise, sıçan P2X₇ reseptörü eksprese ettirilen HEK hücrelerinde, büyük bir katyon olan NMDG⁺ geçirgenliği ile pozitif yüklü büyük bir DNA boyası olan YOPRO-1 alımı ayrılabilmiştir. Şöyle ki; C-ucu kesilen mutant P2X₇ reseptörü eksprese ettirilen HEK hücrelerinde, NMDG⁺ geçirgenliği ortadan kalkarken YOPRO-1 girişi bu durumdan etkilenmemiştir. Bu bulgular ışığında, NMDG⁺ geçirgenliğinin reseptörün kendi özelliği olduğu, YOPRO-1 girişinin ise ayrı bir geçirgenlik yolağı olduğu düşünülmektedir (Jiang ve ark., 2005). Bu çalışmaya benzer olarak, kalmodulin inhibitörü olarak bilinen kalmidazolyum P2X₇ reseptörünün oluşturduğu akımları inhibe ederken, YOPRO-1 girişine etkisi bulunmamıştır. Bu durum kalmidazolyumun reseptörün küçük katyonları geçiren iyon kanalı durumu ile büyük molekülleri geçiren por durumu arasında seçim yapabilmesine yorumlanabilmektedir (Virginio ve ark., 1997). Bu bulgulara ek olarak, P2X₇ reseptörünün anyonik ve katyonik olmak üzere iki ayrı geçirgenlik yolağı aktive ettiği gösterilmiştir (Schachter ve ark., 2008; Marques-da-Silva, 2011; 2008; Cankurtaran-Sayar ve ark., 2009). Genişleyen reseptör hipotezi ile ayrı bir geçirgenlik yolağının gerekliliği tartışmaları sürerken, P2X₇ reseptörünün büyük geçirgenlik aktivasyonunda başka bir proteinin (pannexin-1) aracılık ettiğine dair de bulgular da yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda, hücre membranında büyük molekülleri geçiren pannexin-1 adlı proteinin, P2X₇ reseptör aktivasyonunda yer aldığı ve büyük moleküllerin pannexin-1 aracılığıyla geçtiği iddia edilmektedir. Yapılan deneylerde, pannexin-1 inhibitör peptitleri, siRNA' sı (silencer RNA) ve pannexin-1 inhibitörü olduğu söylenen ajanlar P2X₇' nin oluşturduğu YOPRO-1 girişini inhibe etmekte bu sonuçlar da P2X₇ reseptör aktivasyonu için pannexin-1 proteininin gerekliliğine atfedilmektedir (Pelegri ve Surprenat, 2006, Pelegri ve Surprenat, 2007). Pannexin-1 adlı proteininin P2X₇ reseptör aktivasyonu için gerekli olduğuna dair deneyler bazı gruplar tarafından tekrar edilememiştir (Bhaskaracharya, 2014; Alberto ve ark., 2013). Birbirine zıt bulguların varlığı P2X₇' nin por oluşturma mekanizması ve aracılık eden proteinlerin kimliği konularını hala belirsiz kılmaktadır.

İlk zamanlarda elde edilen koimmunopresipitasyon çalışmaları her ne kadar P2X₇ reseptörünün başka reseptörlerle heteromer oluşturmadığını gösterse de, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar P2X₇ reseptörünün P2X₄ ile heteromer oluşturduğunu öne sürmüştür. Buna rağmen bu heteromerin kararlı olmadığı ve doğal dokularda baskın işlev görmediği de öne sürülmüştür. P2X₄ ve P2X₇' nin

heteromer oluşturmaktan ziyade fiziksel etkileşim gösterdikleri daha baskın fikir olarak literatürde yer almaya başlamıştır. P2X₄ ile P2X₇ reseptörleri arasındaki ilişkiye dair bulgular, kemik iliği makrofajlarında ve bu reseptörlerin transfekte edildiği HEK hücrelerinde yapılan koimmunopresipitasyon çalışmalarından elde edilmiştir. Her iki alt tipi de bulunduran kemik iliği, lenf düğümleri gibi dokulardan P2X₇ kompleksi için yapılan BN-PAGE (Blue Native – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) analizleri, P2X₇ reseptörünün kendisiyle heterotrimer oluşturduğunu göstermiştir. Dahası bu çalışma, P2X₇ reseptörünün çoğunlukla hücre membranında P2X₄ reseptörünün ise çoğunlukla hücre içinde bulunduğunu göstermiştir. Buna rağmen P2X₄ ve P2X₇ reseptörü ko-immünoresipitasyonla beraber elde edilebilmektedir (Antonio ve ark., 2011; Guo ve ark., 2007; Coddou ve ark., 2011; Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012). Benzer olarak, E10 epitel hücre kültüründe, P2X₄ ve P2X₇ reseptörlerinin, “raft” adı verilen kolesterol bakımından oldukça zengin özel membran bölgelerinde ve yine hücre membranında caveolin-1 ile interaksiyon içinde oldukları gösterilmiştir (Saul ve ark., 2013).

P2X₇ reseptörünün membrandaki ekspresyonu sıkıca kontrol altında tutulmaktadır. Monositlerde ve lenfositlerde hücre içinde bulunurken, monositlerin makrofajlara farklılaşması esnasında membrana lokalize olmaktadır. Membrana lokalizasyonu ve stabil olarak burada kalmasında Arg578 ve Lys579 aminoasitlerinin kritik rolü olduğu düşünülmektedir. P2X₇ reseptörünün bir kısmı, kolesterol bakımından zengin hücre membran bölgeleri olan “raft”lar dışı hücre membranında, bir kısmı lipit “raft”larda bulunmaktadır ve bu “raft” lar reseptörün sinyal iletim mekanizmasında regüle edici bir rol oynamaktadır. Şöyleki; metil- β -siklodekstrin ile membrandaki kolesterolün azaltılarak “raft”ların dağıtılması P2X₇ reseptör aktivasyonunu boya girişi bakımından artırırken, membrandaki kolesterol miktarının artırılması P2X₇ reseptör aktivasyonunu azaltmaktadır. Reseptörünün membrandaki lipit “raft”lara gidebilmesinde, yağ asitlerinin proteindeki tireonin veya serin aminoasitlerine bağlanması olarak tanımlanan palmitilizasyonun gerekliliği ve palmitilizasyon ile reseptörün membrandaki ekspresyonunun ilişkili olduğu, transfekte HEK hücrelerinde ve makrofajlarda gösterilmiştir. Palmitilizasyonun olamadığı, C-ucundaki sistein aminoasitleri kesilmiş mutant P2X₇ reseptörleri ER içinde kalmakta ve membrana lokalize olamamaktadır. C-ucundaki özel bazı sistein ve tireonin aminoasitlerinin palmitilizasyonda önemli olduğuna dair çalışmalar mevcuttur.

(Kaczmarek-Hájek ve ark., 2012; Robinson ve Murrell-Lagnado, 2013, Robinson ve ark., 2014).

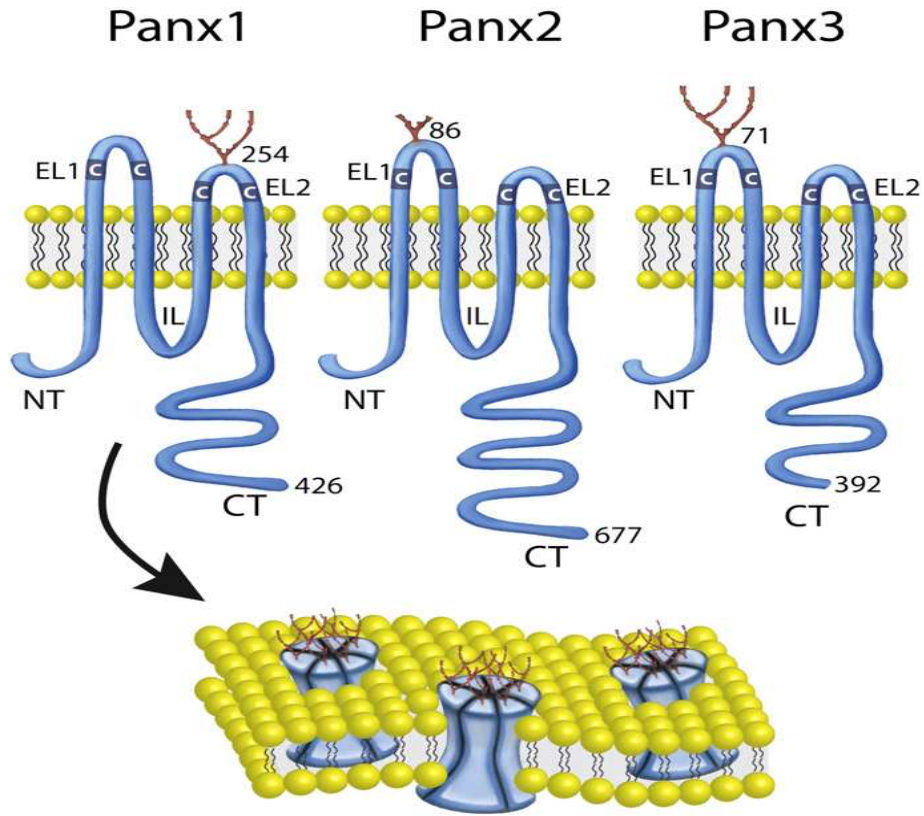
P2X₇ reseptörünün fonksiyonel birkaç splice varyantı mevcuttur. Bunlardan P2X₇k, yabanıl tip (P2X₇a) P2X₇ reseptöründen farklı bir N-ucu ve TM1 bölgesine sahiptir. P2X₇k' yı eksprese eden HEK hücreleri, P2X₇a eksprese edenlere göre BzATP' ye 8 kat daha duyarlıdır. P2X₇a' yı eksprese eden oosit hücrelerinde, NMDG+ geçirgenliği agonist uygulamasından sonra zaman içerisinde gelişirken, P2X₇k aktivasyonunda agonist uyarısıyla hemen hemen eş zamanlı oluşmuştur (Nicke, 2009). Diğer splice varyantlar P2X₇b, P2X₇e, P2X₇g ve P2X₇j C-ucu içermeyen mutantlardır ve büyük geçirgenlik aktive edememektedir (Adinolfi, 2010).

Kronik inflamasyon ve nöropatik ağrı ve IL-1 β salınımı, P2X₇ knockout farelerde engellenebilmektedir. Araştırmacılar, P2X₇ reseptörünün mature IL-1 β salınımını düzenlemesi bakımından, nöropatik ağrı ve inflamasyonun gelişmesinde rolü olduğunu öner sürmektedirler. Bu bulgular seçici P2X₇ antagonistiyle yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. P2X₇ reseptörünün IL-1 β salınımında direkt rolü olduğu ve IL-1 β ' nin inflamasyonun öncüsü olduğu düşünülürse, P2X₇ reseptörünün inflamasyondaki rolü ve antagonistlerin de etkisi iyice anlaşılmış olur. A-740003 ve A-438079 gibi birkaç seçici P2X₇ antagonisti hayvan modellerinde kullanılmaya başlamış ve bu antagonistlerin doz bağımlı olarak nöropatik ve inflamasyon ağrılarını engellediği bulunmuştur ancak bu çalışmalar devam eden aşamalarda başarısızlığa uğramıştır (Honore ve ark., 2006; Khakh ve Jarvis, 2009; Burnstock, 2013a; Burnstock, 2013b).

1.1.8 Gedik-Kavşak Proteinleri

Panneksin, kanal oluşturan glikoprotein ailesidir. Panneksin-1, panneksin-2 ve panneksin-3 olmak üzere 3 üyesi vardır. En önemli özellikleri hücre membranında kanal oluşturabilmeleridir. Omurgasızlardaki gedik-kavşak protein ailesi inneksinlerle çok az sekans benzerliği gösterirken, memelilerdeki diğer bir gedik-kavşak ailesi olan konneksinlerle sekans benzerliği göstermemektedir. Konneksinlerin aksine panneksinler yarı-kanal değildir ve kanal oluşturmaları için komşu hücrenin membranındaki bir panneksin ile karşı karşıya gelmeleri gerekmemektedir.

Panneksin proteinleri glikozile proteinler olduklarından zaten karşı karşıya gelerek tek kanal oluşturmamaktadırlar. İntegral membran proteinidirler, ilk defa 2000 yılında Panchin ve arkadaşları tarafından tanımlanmışlardır. Panneksinler ve konneksinler arasında sekans benzerliği olmamasına rağmen yapısal benzerlik hayli fazladır. Hücre zarını 4 defa geçen bölgeleri mevcuttur, N-ucu ve C-ucu hücre içindedir. Ayrıca hekzamerik yapı oluşturmaktadırlar (şekil-1.1.8.1). Panneksin-1 birçok memeli dokusunda ifade edilirken, panneksin-2 ve panneksin-3' ün ifadesi çok sınırlı düzeydedir. Panenxin-1 ATP salımı yapabilmekte, 1 kDa'a kadar olan büyük molekülleri geçirebilmektedir. Hücre içi $[Ca^{+2}]$ artışı, hücre membran depolarizasyonu ve membran gerilmesi gibi birçok yolla aktive olabilmektedir. Hücre membranındaki ifade düzeyi zaman içinde değişken değildir, yarı-ömrü hayli uzundur (Penuela ve ark., 2013).



Şekil-1.1.8.1: panneksin ailesinin üç üyesi panneksin-1 (panx1), panneksin-2 (panx2) ve panneksin-3 (panx3)'ün şematik gösterimi. EL: Extracellular Loop, Hücre dışı İlmeç; IL: Intracellular Loop, Hücre içi İlmeç; NT: N-Terminal, N-Ucu; CT: C-Terminal, C-Ucu

Panneksin-1 aktin proteini ile C-ucu aracılığıyla fiziksel ve direkt olarak etkileşimde bulunmaktadır. Hatta pannexin-1' in membrandaki kararlı duruşu aktin ile etkileşimine bağlıdır denilebilir. Ayrıca P2X7 reseptörüyle interakte ettiği de ileri sürülmektedir (Penuela ve ark., 2013). Hatta, küçük katyonlara geçirgen bir iyon

kanalı olan P2X₇' nin, sıradışı olarak büyük moleküllere olan gerçirgenliğinin panneksin-1 üzerinden olduğu da iddia edilmektedir. Panneksin-1 inhibitör ajanları ve peptitleriyle gerek farmakolojik olarak gerekse moleküler biyolojik olarak bu iddialar delillendirilmişse de, aynı yöntemlerin kullanıldığı başka çalışmalar zıt sonuçlar elde etmiştir.

1.1.9 Tez Çalışmasının Amacı

Tez çalışmasında, grubumuzun önceki çalışmalarında göstermiş olduğu RAW 264.7 hücrelerinde bulunan ve P2X₇ reseptörünün ile aktive olduğunu düşündüğümüz, pozitif ve negatif maddelere seçici geçirgenlik yollarının çeşitli yöntemlerle ayrıştırılmalarına ve karakterizasyonuna odaklanılmıştır.

Öncelikle RAW 264.7 hücrelerinde hücre dışı ATP uygulaması ile aktive olan geçirgenliğin P2X₇ reseptörü aracılı olduğu farmakolojik olarak gösterilmeye çalışılmıştır. Bunun için öncelikle HEK-293 hücrelerine, RAW 264.7 hücrelerinden klonlanan P2X₇ reseptör cDNA' sını transfekte edilmiştir. Böylelikle, RAW 264.7 hücrelerinde kendiliğinden ifade edilen ve ATP ile aktive olan ancak kesin kimliği henüz bilinmeyen P2X₇ benzeri reseptörün karakteristik özellikleriyle (agonist etkinlik sırası, antagonist duyarlılığı, geçirgenlik özellikleri vb), HEK hücrelerinde ekprese edilen P2X₇ reseptörünü karşılaştırılmış ve RAW 264.7 hücrelerinde nativ olarak ekprese olan reseptörün kimliği hakkında fikir edinilmeye çalışılmıştır.

Hipotezimiz kısaca şöyle ifade edilebilir: RAW 264.7 hücrelerinden HEK hücrelerine taşınan P2X₇ reseptörünün agonist-antagonist duyarlılıkları ve geçirgenlik özellikleri RAW 264.7 hücrelerinde gözlenen geçirgenliklerle benzer çıkarsa, bu geçirgenliklerin oluşabilmesi için P2X₇ reseptörü tek başına yeterli olduğu düşünülebilir. Ancak bu özelliklerde bazı farklar gözlenirse (geçirgenlik özellikleri, agonist profili vb.) bu geçirgenliklerin oluşabilmesi için P2X₇ reseptörünün yeterli olmadığı düşünülecektir. RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücreleri arasında ATP uyarısıyla oluşan geçirgenlik özellikleri farkını açıklamak üzere 3 alt hipotez önerilmiştir: 1) RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile aktive olan farklı bir reseptör, söz konusu geçirgenliği sağlamaktadır. Bu nedenle HEK-mP2X₇ hücrelerinde görülen geçirgenlikten farklılık arz etmektedir. 2) RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan geçirgenlikten P2X₇ sorumludur ancak aksesuar bir proteine çiftlenimi bulunmaktadır. Bu çiftlenimin olmadığı HEK-mP2X₇ hücrelerinde aynı geçirgenlikler görülmemektedir. 3) RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile geçirgenlik aktive eden reseptör P2X₇ reseptörünün bir "splice" varyantıdır. HEK-mP2X₇ hücrelerinde bu "splice" varyant değil de "tam

uzunluk" formu transfekte edildiğinden geçirgenlik özellikleri farklılık göstermektedir. 2. ve 3. hipotez birleştirilip tek bir hipotez olarak da düşünülebilir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında ise, RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile aktive olan geçirgenlikler üzerinde panneksin-1 kanalı ve çeşitli anyon taşıyıcı inhibitörlü olarak bilinen bir seri maddenin etkileri incelenmiştir. Panneksin-1; seçici olmayan ve 1 kDa' a kadar olan molekülleri geçiren bir membran proteinidir, dolayısıyla P2X₇ reseptörü ile aktive olan büyük moleküler ağırlıktaki madde geçirgenliğinde bu proteinin rolü olduğu iddia edilmiştir (Pelegriin ve Surprenant, 2006, Pelegriin ve Surprenant, 2007). Dolayısı ile RAW 264.7 hücrelerinde gözlediğimiz ATP ile aktive olan geçirgenliklerde de bu protein rol alabilir. Ayrıca, RAW 264.7 hücrelerinde görülen, farklı seçiciliğe sahip iki tip geçirgenlikden pozitif yüklü bir boya olan YO-PRO-1 girişini sağlayanın P2X₇ reseptörü, negatif yüklü bir boya olan Lucifer Yellow girişini sağlayanın ise anyon taşıyıcısı/kanalı ailesinden bir protein olabileceği de düşünülebilir. Bu noktadan hareketle panneksin-1 inhibitörü olarak bilinen CBX ve anyon taşıyıcı inhibitörleri olarak bilinen NPPB/NFA' nın P2X₇ aracılı boya girişlerine etkisi incelenmiş ve bu proteinlerin geçirgenliklerdeki rolleri hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan hücre serilerinden HEK (Human Embryonic Kidney) hücreleri böbrek kökenli insan hücre serisidir. %10 Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin ve streptomisinli DMEM içinde, 37°C sıcaklıkta, 5% CO₂ bulunduran etüvde, kültür flasklarında büyütülmektedir. HEK hücreleri %70-80 konflüense ulaştıklarında Phosphate Buffered Saline (PBS) ile 1 defa yıkanıp, 4-5 ml tripsin-EDTA ile flask tabanından kaldırılır. 50 ml serumlu medium eklenerek 200 G' de 5 dakika santrifüj edilir ve pelet üstü atılır. Peletin bir kısmı yeteri kadar medium içine alınıp, yeni bir flaska konmak suretiyle büyütülmeye devam edilir. Peletin diğer kısmı ise, deney için kullanılmak üzere steril 24 mm çapında yuvarlak cam lamellere ekilerek, veya 96 kuyuluk steril plakalara ekilerek 24-48 saatte büyütülürler.

Çalışmada kullanılan diğer bir hücre serisi olan RAW 264.7 hücreleri ise makrofaj kökenli fare hücre serisidir. %10 Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin ve streptomisinli RPMI 1640 içinde, 37°C sıcaklıkta, 5% CO₂ bulunduran etüvde, kültür flasklarında büyütülmektedir. %70-80 konflüense ulaştıklarında 5 ml RPMI ile flask tabanından steril plastik kazıyıcı yardımıyla kaldırılır. Yaklaşık 1/5' i flaskta bırakılarak, 15-20 ml RPMI eklenerek büyütülmeye devam edilir. Kazınan hücrelerin 1/5' i 15-20 ml RPMI eklenerek deney için kullanılmak üzere, steril 24 mm çapında yuvarlak cam lamellere ekilerek, yaklaşık 1 cm büyüklüğünde kırılmış steril cam parçalarına ekilerek veya 96 kuyuluk steril plakalara ekilerek 24-48 saatte büyütülürler.

2.2 Transfeksiyon ve Klonlama

HEK hücrelerinde fare P2X₇ reseptörü aşırı ekspresyonu için, RAW 264.7 hücrelerinden klonlanan P2X₇ reseptör cDNA' sı Lipofectamine 2000 adlı kimyasal ajan yardımıyla, firmanın önerileri doğrultusunda 6 kuyuluk steril kültür plakalarında transfeke edilmiştir. Hücreler %70-80 konflüense geldiklerinde 96 kuyuluk kültür plakalarına alınmış ve vektörün içerdiği antibiyotiği (genetisin) içeren DMEM içine alınmışlardır. Antibiyotiğe direnç geni cDNA içinde varolduğundan, proteini eksprese eden hücreler aynı zamanda antibiyotiğe de dirençlidirler. Yaklaşık 2 haftalık bir süre içinde proteini eksprese eden dolayısıyla da antibiyotiğe dirençli hücreler sağ kalırken, proteini eksprese etmeyen dolayısıyla da antibiyotiğe dirençsiz hücreler ölmektedirler. Sağ kalan hücreler çoğaltılarak önce 6 kuyuluk plakalara sonra 25 cm²' lik kültür flasklarına alınıp, sonradan test edilmek üzere dondurumuş ve azot tanklarında muhafaza edilmiştir. Ekspresyon düzeyi, P2X reseptörlerinin seçici olmayan katyon kanalı olma özellikleri nedeniyle hücre içi [Ca²⁺]_i artışına bakılarak test edilmiştir. En yüksek hücre içi [Ca²⁺]_i artışı gösteren klon deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılmıştır.

2.3 Membran Geçirgenliği Ölçümü

P2X₇ reseptör aktivasyonu, hücre membranının floresan boyalara geçirgenliği ölçülerek değerlendirilmiştir. Floresan boya olarak negatif yüklü Lucifer Yellow ve pozitif yüklü YOPRO-1 kullanılmıştır. Söz konusu boyalar farklı büyüklükte (Lucifer Yellow 521 Da ve YOPRO-1 630 Da) ve farklı elektriksel yükte (Negatif yüklü Lucifer Yellow ve pozitif yüklü YOPRO-1) olduklarından, hem membran geçirgenliğinin takip edilmesinde hem de geçirgenliğin karakterizasyonunda yardımcı olmuşlardır. Pozitif yüklü YOPRO-1 (Invitrogen) floresan molekülü, DNA' ya bağlandığında floresans veren bir boyadır. DNA'ya bağlı olmadığı ortamda floresansı göstermez. P2X₇ reseptör aktivasyonunu takiben hücre membranının büyük moleküllere geçirgen hale gelmesiyle YO-PRO-1 hücre içine girmekte, DNA' ya bağlanarak floresans oluşturmaktadır. Hücre içindeki YO-PRO-1 floresansının artışı, P2X₇ reseptör

aktivasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir. Floresan boya olarak kullandığımız bir diğer molekül ise negatif yüklü Lucifer Yellow (SIGMA)' dur. Lucifer Yellow' un floresansı herhangi bir bağlanma gerektirmemektedir. Hücrenin hem dışında hem içinde floresandır. Bu nedenle, P2X₇ aktivasyonu ile oluşan Lucifer Yellow girişini gerçek zamanlı olarak takip edebilmenin tek yolu konfokal mikroskopta alınan optik kesitlerdir.

Hücrelerin floresan boyalara geçirgenliklerinin ölçümünde kullandığımız araçlardan bir diğeri de lazer taramalı konfokal mikroskobudur. Bu yöntemle hem YO-PRO-1 hem de Lucifer Yellow boyasının hücre içerisine girişi ölçülebilmektedir.

Konfokal mikroskop bir preparattan optik olarak bir kaç mikronluk kesitler alarak görüntü oluşturabilmektedir. Konfokal mikroskobun bu özelliği sayesinde odak dışı emisyonun ölçüme karışmasından kurtulunmuş ve çok daha net görüntüler elde edilmiş olur. Bu şekilde hücre içi ve dışından gelen floresans sinyal net bir şekilde ayrılabilir.

Tarama çözünürlüğü olarak 1024 x 1024 seçilmiştir. YOPRO-1 ölçümlerinde maksimum ışık toplayacak şekilde pinhole açıklığı maksimuma ayarlanmıştır. Lucifer Yellow için ise maksimum uzaysal çözünürlük için 1 Airy Unit pinhole açıklığı kullanılmıştır. Hücreler ATP uyarısından sonra, yapışık oldukları lamel tabanından ayrılmakta ve odaktan çıkmaktadırlar. Bu durumda hücreleri takip edebilmek için, xy düzlemindeki taramaya z-boyutu da eklenmiştir. xy düzleminde yapılan tarama, örneğin farklı yüksekliklerde (z-aksı) tekrarlanmıştır. Geçirgenlik oluşumunun ve artışının gerçek zamanlı olarak takip edilebilmesi için xyz modundaki tarama eşit zaman aralıklarında tekrarlanmıştır (xyzt modu). Geçirgenliğin oluşumu ve artışı dakikalar düzeyinde olduğundan, görüntüleme 40 saniye aralıklı olarak yaklaşık 30 dakika boyunca tekrarlanmıştır.

RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde, konfokal mikroskop ile ölçümler yapılırken, hücreler ayrıntıları kısım 2.1' de açıklanan şekilde yuvarlak cam lamellere ekilmiş ve 24-48 saat sonra deneye alınmıştır. Hücrelerin içinde bulunduğu medium çekilip, yerine 2,5 µM YO-PRO-1 ya da 3 mg/ml Lucifer Yellow içeren KCl solüsyonu (5mM NaCl, 145 mM KCl, 16 mM HEPES, pH:7.4) içinde deneye alınmıştır. Kayıt

esnasında, hücrelere BzATP, ATP veya ADP uygulanmıştır. Bazı inhibitörlerin P2X₇ reseptör aktivasyonundaki rolleri incelenirken, hücreler inhibörlü, taşıyıcılı (DMSO) veya normal 2,5 µM YO-PRO-1 içeren KCl solüsyonda 8 dakika, 37° C' de inkübe edilmiştir. Daha sonra aynı solüsyon içinde 40 saniye aralıklarla kayıt alınmaya başlanmıştır. Agonistler ya da kontrol solüsyonu 4. zaman noktasında (2. dakika) uygulanmıştır. Kantitasyon için aşağıda ayrıntıları anlatılan işlem sırası izlenmiştir. Elde edilen floresans zaman eğrilerine bir doğru fit edilmiş ve bu doğrunun eğimi hücrenin boyaya olan geçirgenliğini bir ölçüsü olarak alınmıştır. Tüm deneyler 37°C'de yapılmıştır.

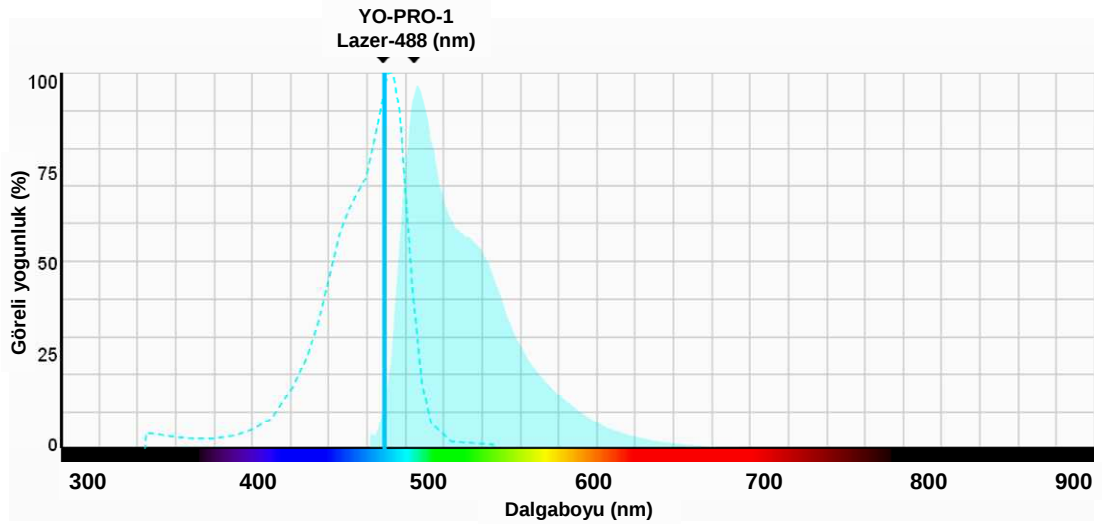
Plate okuyucusu ile YO-PRO-1 girişi ölçümleri yapılırken, hücreler kısım 2.1' de açıklanan şekilde 96 kuyuluk plakalara ekilmiş ve 24-48 saat sonra deneye alınmıştır. Deney için hücrelerin içinde bulunduğu medium çekilip, yerine 2,5 µM YO-PRO-1 içeren KCl solüsyonu konmuştur. Birkaç dakika sonra plakanın her bir kuyusuna farklı konsantrasyonlarda agonist uygulanmıştır. 30 saniye aralıklarla floresans sinyal ölçümü başlatılmıştır ve her bir kuyu için bir floresans-zaman eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen bu eğrilere birer doğru fit edilmiş ve fit edilen doğrunun eğimi hücrenin floresan boyaya geçirgenliğinin bir ölçüsü olarak alınmıştır. Bu şekilde elde edilen doz-cevap eğrisi her bir agonist için oluşturulmuştur. Doz-cevap eğrilerinden EC50 (maksimum yanıtın yarısını oluşturan agonist konsantrasyonu) değerleri hesaplanmış ve farklı agonistlerin potensleri karşılaştırılmıştır. Tüm deneyler 37° C'de yapılmıştır.

Hem konfokal hem de plate okuyucu kullanılarak seçici P2X₇ antagonisti A740003 ile yapılan deneyler için hücreler, farklı konsantrasyonlarda A740003 veya taşıyıcı (DMSO) içeren YO-PRO-1 ya da Lucifer Yellow' lu KCl solüsyonu içerisinde 6-8 dakika, 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra yukarıda bahsedilen şekilde agonist uyarısı ile boya giriş hızları ölçülmüştür. RAW 264.7 hücreleri için 100 ve 300 µM, HEK-mP2X₇ hücreleri için 300 µM ATP uygulanmıştır. Bu eğrilerden elde edilen IC50 (maksimum inhibisyonun yarısının görülmesi için gereken antagonist konsantrasyonu) değerleri, hem HEK-mP2X₇ ile RAW 264.7 hücreleri arasında karşılaştırılmış hem de literatürde rapor edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Tüm deneyler 37°C'de yapılmıştır.

Benzer şekilde, çeşitli gedik-kavşak ve anyon taşıyıcı/kanal inhibitörlerinin P2X₇ aracılı YOPRO-1 girişine etkisi incelenirken, hem konfokal hem de plate okuyucu kullanılmıştır. Hücreler YO-PRO-1 ya da Lucifer Yellow' lu KCl solüsyonunda 100, 33, 11, 3,7 veya 0 µM derişimde inhibitör ile (CBX, NFA veya NPPB) 6-8 dakika 37°C'de inkübe edilmiş daha sonra yukarıda açıklandığı gibi agonist yanıtları alınmıştır. RAW 264.7 hücreleri için 300 µM, HEK-mP2X₇ hücreleri için 1 mM ATP kullanılmıştır. NFA ve NPPB' nin taşıyıcısı DMSO olduğundan, taşıyıcı kontrolü olarak bu madde, inhibitörlerin 100 µM derişimine karşılık gelen 1/1000 sulandırma, 33 µM'a karşılık gelen 1/3000 sulandırma ile kullanılmış ve floresans ölçülmüştür. Tüm deneyler 37° C'de yapılmıştır.

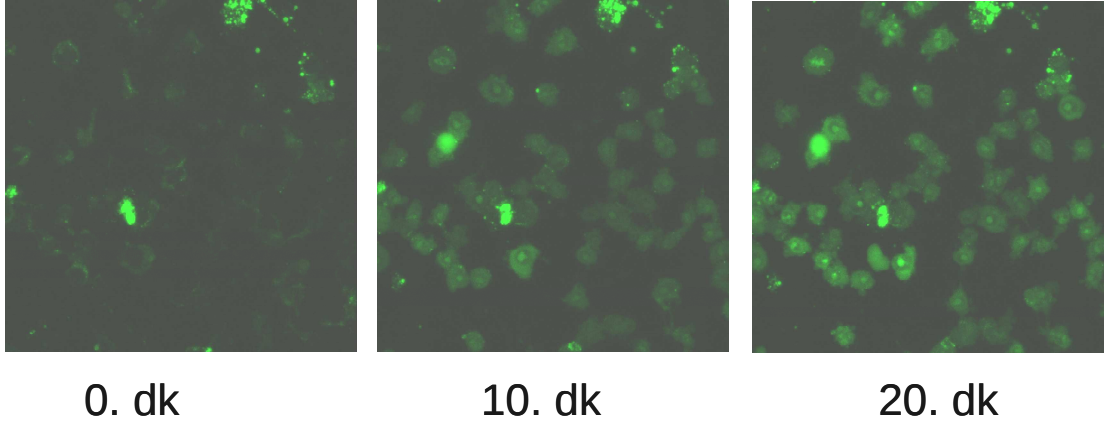
2.3.1 YO-PRO-1 Geçirgenliği Ölçümü

YO-PRO-1' nun maksimum absorpsiyon gösterdiği dalgaboyu değerine çok yakın olan 488 nm lazer eksitasyon için kullanılmış 500 nm üstü emisyon ölçüm için toplanmıştır. YOPRO-1 absorpsiyon ve emisyon spektrumları şekil-2.3.1.1'de görülebilmektedir.



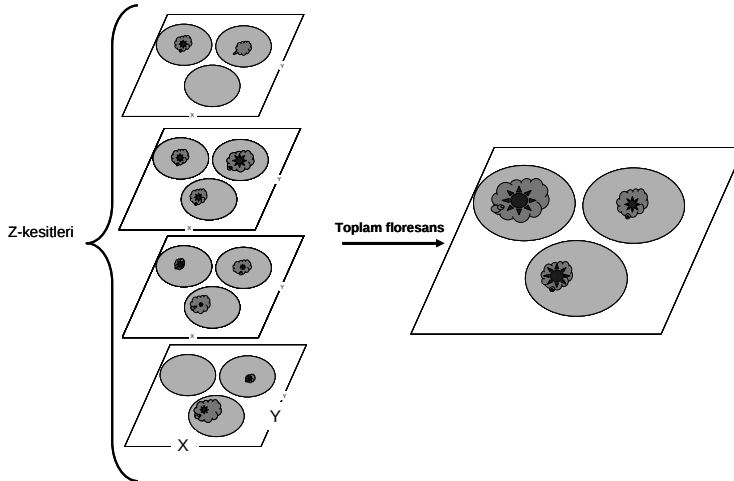
Şekil-2.3.1.1: YO-PRO-1' in eksitasyon ve emisyon spektrumları ile çalışmada kullanılan lazer dalga boyunun eksitasyon spektrumundaki yeri. --- çizgileriyle gösterilen kısım YO-PRO-1 eksitasyonunu, — çizgileriyle gösterilen kısım emisyon spektrumunu, dikey | çizgisi ise YO-PRO-1' i uyarmak için kullanılan lazer (488 nm) ve eksitasyon spektrumundaki yerini göstermektedir.

Hücreler deneye başlandıktan sonra 4. görüntü destesinin alınmasını takiben agonistlere maruz bırakılmışlardır. Deney boyunca 0., 10. ve 20. dakikalarda kaydedilmiş görüntüler şekil-2.3.1.2' de görülebilmektedir.



Şekil-2.3.1.2: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 girişine örnek. 30 dakikalık süre içinde 30 saniye aralıklarla kayıt alınmasına rağmen örnek olarak sadece 0., 10. ve 20. dakikalara ait görüntüler verilmiştir.

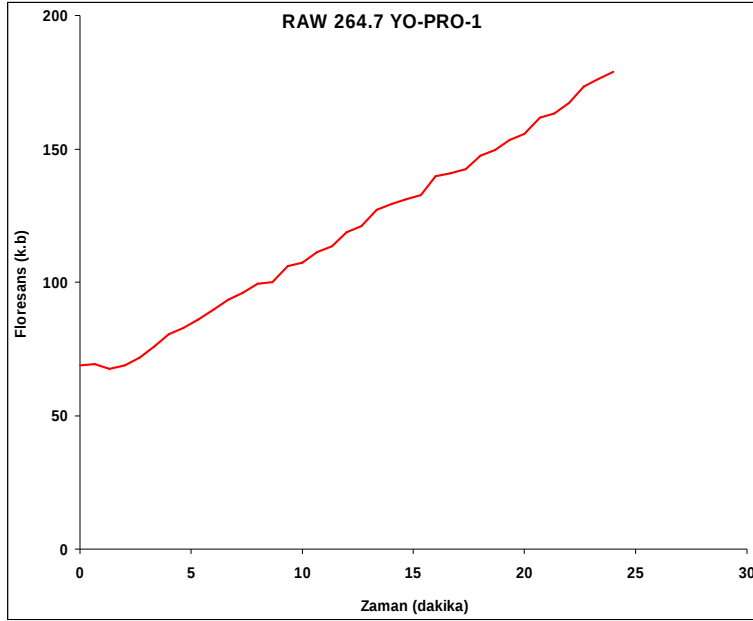
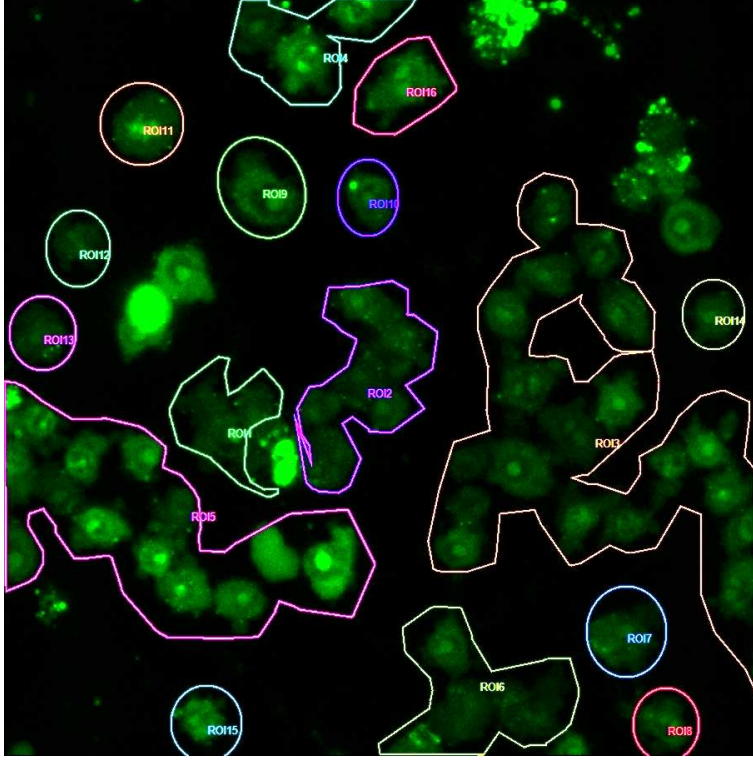
Ancak görüntülerden de anlaşılacağı üzere, hücreye YOPRO-1 girişi ile oluşan floresans hücre içinde hayli heterojendir. Bu heterojenite yüzünden, z-kesitine bağlı olarak ölçülen floresans değeri de değişkenlik gösterecektir. Z-kesiti bağımlı ölçüm farklılıklarını ve ölçüm varyasyonunu ortadan kaldırmak için, aynı zaman noktasına ait z-kesitleri toplanarak, elde bulunan çok sayıdaki z-kesiti tek bir resme çevrilmiştir. Bu toplama işlemi her zaman noktası için tekrarlanarak bir seri zamana bağlı görüntü elde edilmiştir (zaman serisi). Ayrıntıları anlatılan bu işlemin temsili bir şeması şekil-2.3.1.3' te görülmektedir. Bu işlem hem HEK hem RAW hücreleri için uygulanmıştır.



Şekil-2.3.1.3: YO-PRO-1 sinyali DNA' ya bağlandığı zaman oluşan bir floresans sinyal olduğu için hücre içinde dağılımı son derece heterojendir. Kesite bağlı olarak floresansın heterojenliğinin ortadan kaldırılması amacıyla kesitlerdeki floresans piksel piksel toplanarak tek bir kesit oluşturulmuştur.

Bu elde edilen zaman serilerinde hücrelerin teker teker takibi mümkün olmadığından, hücre grupları ROI (Region Of Interest)' ler içine alınmıştır. Her bir ROI' den gelen floresans şiddetinin zaman içinde değişimi elde edilmiştir. ROI lerden bulunan toplam

floresans hücre sayısının bir ölçüsü olan toplam ROI alanına bölünerek normalize edilmiştir. Söz konusu kantitasyona ait bir örnek Şekil-2.3.1.4' te görülmektedir.

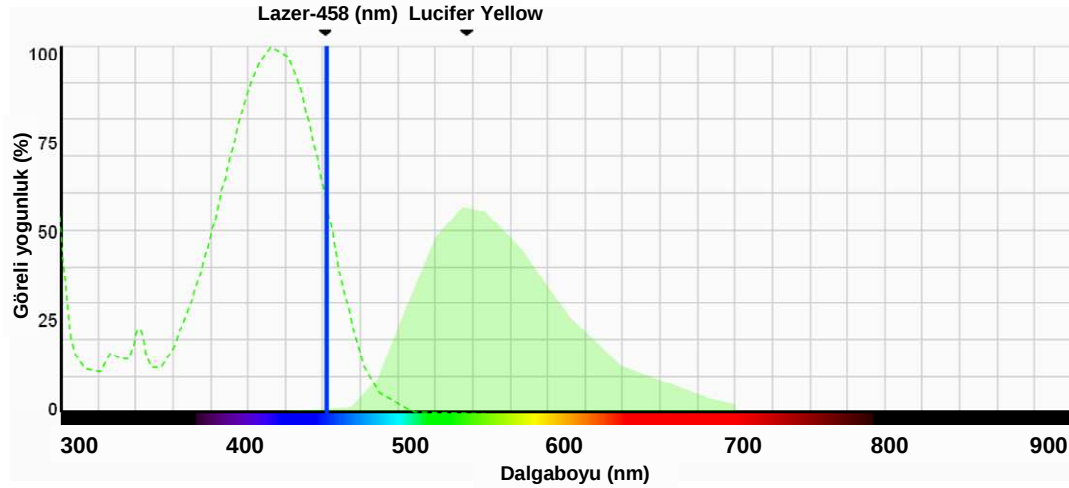


Şekil-2.3.1.4: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısı sırasında alınan YO-PRO-1 görüntüleri şekil-2.3.1.3' te gösterilen yolla toplandıktan sonra hücre ya da hücre grupları ROI' ler içine alınmaktadır (üst panel). Bu görüntü sadece ROI' lerin gösterilmesi amacıyla seçilmiş, 25. dakikaya ait tek bir görüntüdür. Ölçümler tüm zaman noktaları için yapılmıştır. Bu ROI' lerden ölçülen toplam sinyal ROI'lerin toplam alanına bölünerek, hücre sayısı ile normalize floresans sinyal şiddetinin zamanla nasıl değiştiği bulunmuş olur (alt panel). ATP uygulaması 2. dakikadan hemen sonra yapılmıştır.

2.3.2 Lucifer Yellow Geçirgenliği Ölçümü

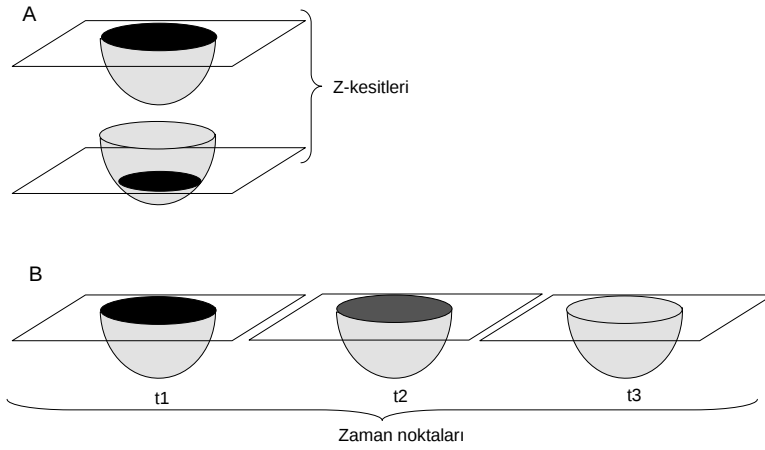
Daha önceden belirtildiği gibi negatif yüklü bir floresan boya olan Lucifer Yellow'un floresansı herhangi bir bağlanma gerektirmemektedir. Hücrenin hem dışında hem içinde floresandır. Bu nedenle, P2X₇ aktivasyonu ile oluşan Lucifer Yellow girişi gerçek zamanlı olarak sadece konfokal mikroskopu ile ölçülebilmektedir.

Lucifer Yellow eksitasyon ve emisyon spektrumları şekil-2.3.2.1' de görülebilmektedir. 458 nm lazer her ne kadar eksitasyon spektrumundaki yeri eksitasyon tepesi ile tam çakışmasa da, bu lazer imkanlarımız içinde Lucifer Yellow' u uyarmak için kullanılabilecek en uygun lazerdir. Preparatlar bu lazerle aydınlatılarak 500 nm üzerindeki emisyon ışığı ölçülmüştür.

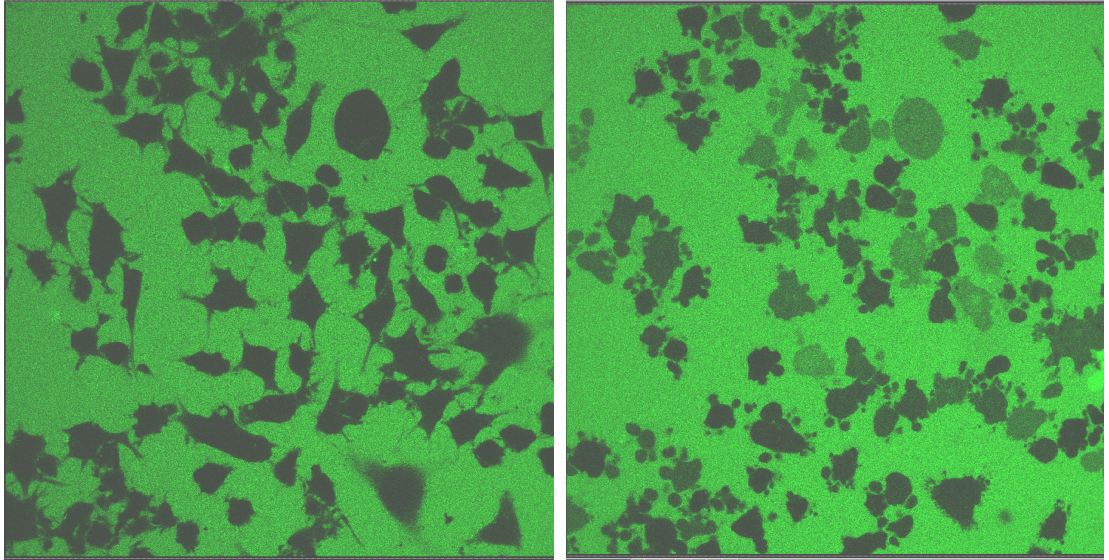


Şekil-2.3.2.1: Lucifer Yellow' un eksitasyon ve emisyon spektrumları ile çalışmada kullanılan lazer dalga boyunun eksitasyon spektrumundaki yeri. — — — — çizgileriyle gösterilen kısım Lucifer Yellow eksitasyonunu, — — — — çizgileriyle gösterilen kısım emisyon spektrumunu, dikey | çizgisi ise Lucifer Yellow' u uyarmak için kullanılan lazer (458 nm) ve eksitasyon spektrumundaki yerini göstermektedir.

Ayrıntıları yukarda açıklandığı üzere, konfokal mikroskopu örnekte optik kesitleri görüntülemeyi mümkün kıldığından, hücre içi ve dışı ortam birbirinden ayrı olarak gözlemlenebilmekte ve hücre dışındaki floresan boyanın hücre içine girişi açıkça görülebilmektedir (şekil-2.3.2.2 ve şekil-2.3.2.3).



Şekil-2.3.2.2: (A) Lucifer Yellow floresansı herhangi bir bağlanma gerektirmediği ve her koşulda görüldüğü için, bu boyanın hücre içine girişinin ölçümünde z-ekseninde kesitler almayı ve hücre içi ile dışını ayırmayı sağlayan konfokal mikroskobu kullanılmıştır (B). Kesit görüntüleme işlemi zaman içinde aralıklarla yapılarak, hücre içine Lucifer Yellow girişi görüntülenebilmektedir

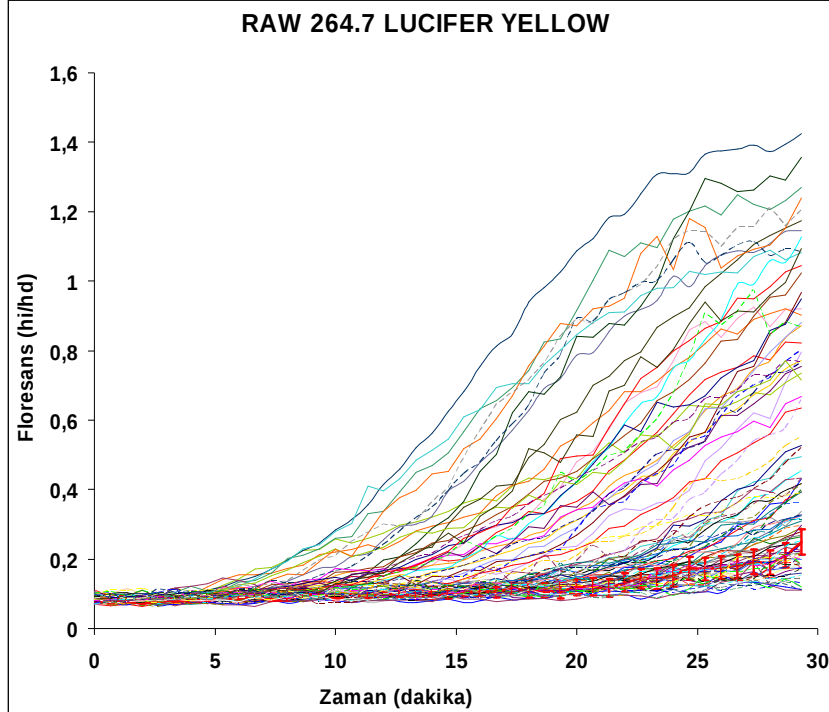
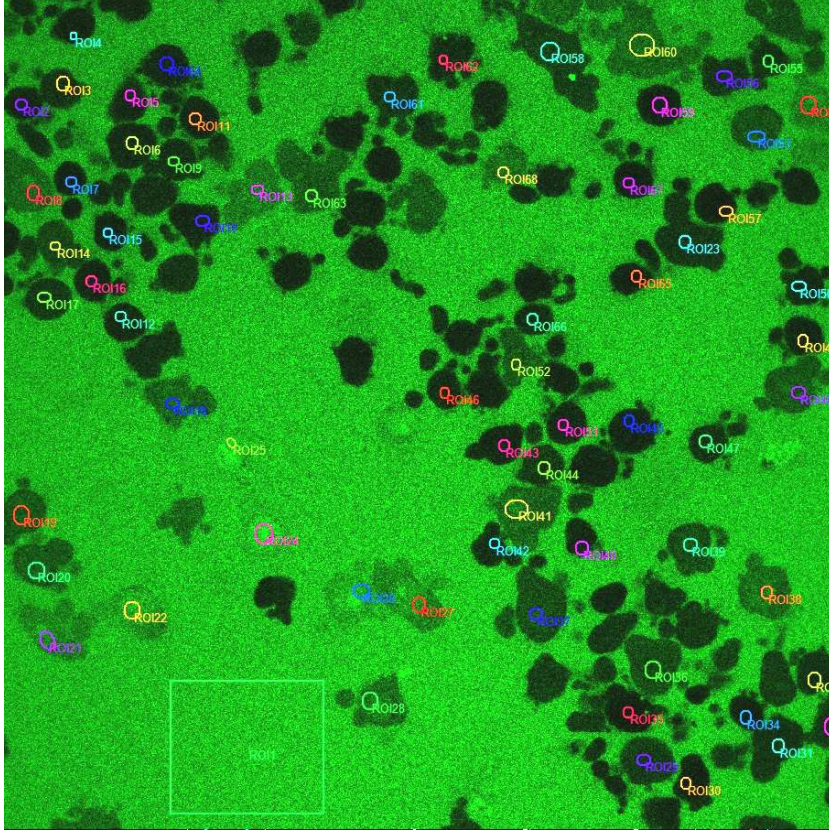


Şekil-2.3.2.3: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan Lucifer Yellow girişine seçilmiş bir kesitten örnek. Görüntüleme 30 dakikalık süre içinde 30 saniye aralıklarla yapılmasına rağmen 0. (sağdaki fotoğraf) ve 20. dakika (soldaki fotoğraf) temsilen gösterilmiştir.

Deneylerde, xy doğrultusunda yapılan tarama farklı derinlikteki kesitlerde tekrar edilmiş (xyz tarama) ve bu işlem 40 saniye aralıklarla yinelenmiştir (xyzt tarama). YO-PRO-1' in aksine Lucifer Yellow hücre içine girdiğinde homojen bir dağılım gösterdiğinden, ölçüm tek kesitten yapılabilir ve ölçüm için ortalama floresans kullanılmıştır.

RAW 264.7 hücrelerinin kantitasyonu için hücre içi ve dışı ortamların net olarak ayrılabilmesi, hücrelerin orta bölgelerine yakın bir kesit seçilmiş ve hücrelerin içine ROI' ler çizilmiştir (şekil-2.3.2.4). Bu ROI' ler içinden gelen sinyal hücre dışı ortama

Çizilen ROI' den gelen sinyale oranlanmıştır (hücreiçi/hücredışı, hi/hd). Herbir zaman noktası için bu işlem tekrar edilmiş ve bir hücrenin, Lucifer Yellow girişi için (hi/hd) - zaman eğrisi ortaya çıkarılmıştır. Farklı hücrelerden elde edilen bu eğriler ortalanarak, o deneyin ortalama (hi/hd) - zaman eğrisi elde edilmiştir. Ancak, Lucifer Yellow basit (lineer) bir giriş kinetiği göstermemektedir. Her ne kadar aynı ortalama maksimum değere ulaşsalar da (i ve dış derişimin eşit olduğu nokta), boya girişinin başlama süresi birbirinden çok farklı olabilmektedir ve kinetik son derecede non-lineerdir . Bu nedenle, her bir deneyden elde edilen ortalama eğrinin altında kalan alan belli zaman aralığı (yaklaşık 30 dakika) için integre edilmiştir. Bu integrasyon aslında Lucifer Yellow giriş kinetiğinin de bir ölçüsüdür. Kinetiği hızlı hücrelerin, alan integrasyon değeri büyük, kinetiği yavaş hücrelerin alan integrasyon değeri küçük olacaktır. Bu nedenle, Lucifer Yellow girişi bulguları hücre dışı/hücre içi (hi/hd) olarak ifade edildiği gibi hi/hd oranının zaman boyunca toplanması olarak da ifade edilmiştir (zamansal toplam). Bazı durumlarda zamansal toplamlarının birbirlerine göre kat artışı da kullanılmıştır.



Şekil-2.3.2.4: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan Lucifer Yellow girişinin ölçümü. Hücreler ROI' lerle işaretlenmiştir (Üst paneldeki görüntü 30 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla alınan görüntülerden sonuncusudur). Her bir ROI içinden gelen sinyal bütün deney süresi boyunca ölçülmüştür ve grafikte hepsi gösterilmiştir. Hücrenin bulunmadığı kısma çizilen ROI, arka plan ROI' sidir ve hücrelerin içinden ölçülen sinyali normalize etmek üzere kullanılmıştır (alt panel).

Ancak HEK-mP2X₇ hücreleri ATP uyarısı ile sürekli ve aşırı hareket ettikleri için, hücrelerin sürekli takibi ve teker teker her hücre için tüm zaman noktalarında hi/hd oranının hesaplanması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, sadece 0., 10. ve 20. dakikalarda tüm görüntü içindeki hücrelerde hi/hd oranı hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ Hücrelerinde ATP İle Oluşan Membran Geçirgenliğinin Karakterizasyonu

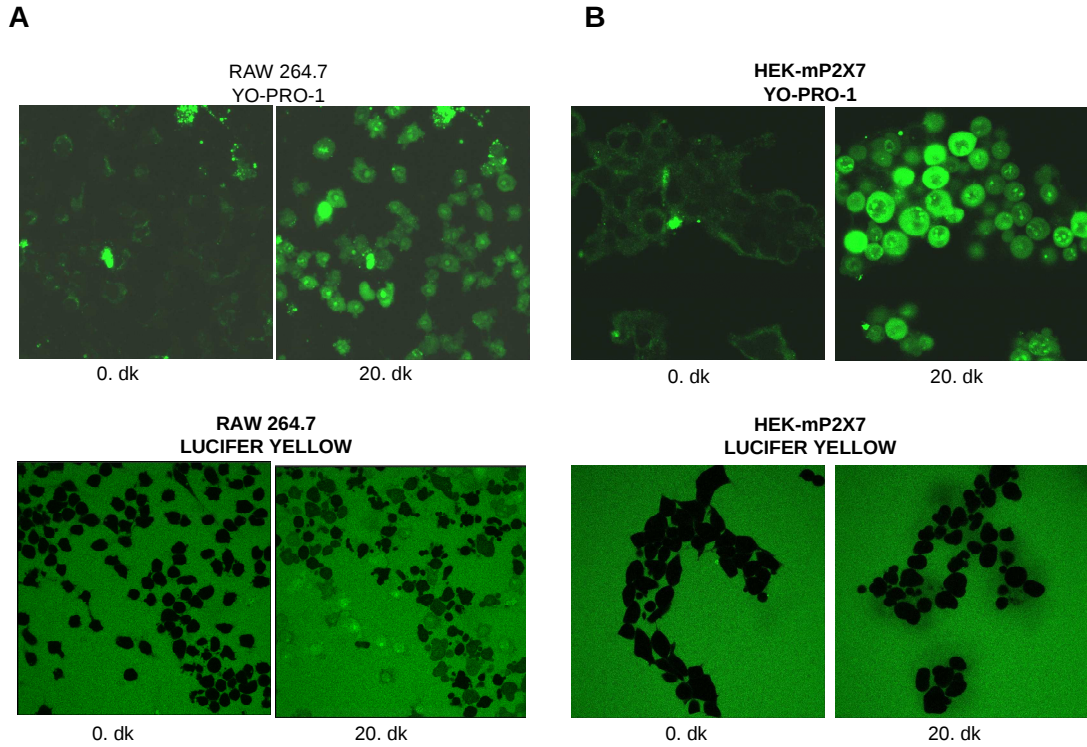
Fare makrofajı kökenli bir hücre serisi olan RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan membran geçirgenliğinin karakterizasyonu için zıt yüklere sahip floresan boyalar olan Lucifer Yellow (anyonik) ve YO-PRO-1 (katyonik) kullanılmıştır. Benzer ölçümler RAW 264.7 hücrelerinden klonlanan fare P2X₇ reseptörü transfekte edilmiş HEK-mP2X₇ hücrelerinde yapılmış ve her iki hücre tipinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

3.1.1 RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Membran Geçirgenlikleri ve Bunların Seçiciliklerindeki Farklılık.

RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla floresan boyalara geçirgenlik yanında bazı morfolojik değişiklikler de görülmektedir. Bu değişiklikler, ATP uyarısından sonra hücrelerin yapışık bulundukları cam lamelden kalkmaları ve membranlarında “bleb” olarak tanımlanabilecek içi sıvı dolu ufak tomurcukların oluşması gibi morfolojik değişikliklerdir. Bu bleblenme dinamiktir ve membranın çeşitli yerlerinden oluşup geri çekilme şeklinde bir hareketlilik arz etmektedir. HEK-mP2X₇ hücreleri ise ATP uyarısından sonra lamelden kalkmaları bakımından çok daha hareketli hücrelerdir, bleblenme özellikleri RAW 264.7 hücrelerinden hayli farklıdır. Ufak blebler pek görülmemekte, bu hücrelerde bleblenme çok daha belirgin ve şiddetli olmaktadır (Şekil-3.1.1.1). Bu, daha önceki gözlemlerimizle tutarlı bir sonuçtur (Cankurtaran-Sayar, 2008; Cankurtaran-Sayar ve ark., 2009).

Daha önceki çalışmamızda gösterildiği gibi ATP uyarısından sonra oluşan floresan boya giriş karakteristikleri bu iki hücre arasında farklıdır (Cankurtaran-Sayar ve ark., 2009). RAW 264.7 hücreleri ATP (300 μ M) uyarısıyla hem YO-PRO-1' e (Şekil-

3.1.1.1A üst panel), hem de Lucifer Yellow' a (Şekil-3.1.1.1A alt panel) geçirgen hale gelmektedir (Şekil-3.1.1A üst panel). YO-PRO-1 DNA' ya bağlı olmadığı durumda floresans vermediğinden 0. dakikada hücre içinden floresans gelmemektedir. ATP uyarısından 20 dakika sonra hücrelerin içlerinde belirgin bir floresans gözlenmektedir (Şekil-3.1.1.1A üst sıra). Lucifer Yellow için ise ATP uyarısı olmadığında hücre içine boya girişi olmadığından, floresans sadece hücre dışından gelmekte ATP uyarısından 20 dakika sonra hücre içine bir miktar Lucifer Yellow girdiği için hücre içinde de floresans görülebilmektedir. Öyleki bazı hücrelerde, hücre içi ile dışı floresans bu süre sonunda eşitlenebilmektedir (Şekil-3.1.1.1A alt sıra). HEK-mP2X₇ hücreleri ise ATP (1 mM) uyarısıyla sadece YO-PRO-1'e geçirgen olmakta, Lucifer Yellow girişi görülmemektedir. İki hücre arasındaki en karakteristik fark, geçirgenlikteki bu seçicilik farkıdır (Şekil-3.1.1.1B alt sıra). Konfokal mikroskopuyla belli aralıklarla (40 saniyede bir) görüntüleme yapılmasına rağmen, şekilde örnek olarak sadece 0. ve 20. dakikalara ait görüntüler verilmiştir.



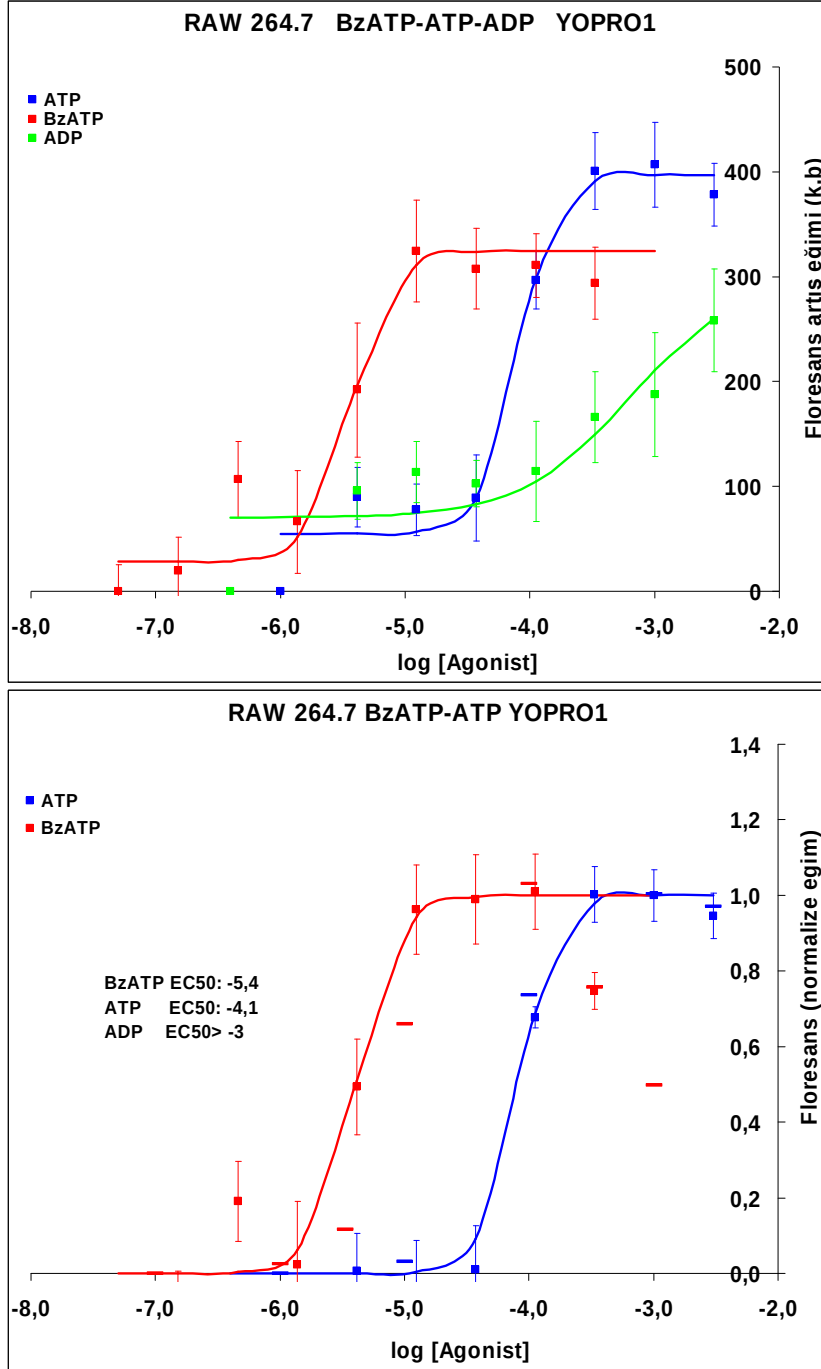
Şekil-3.1.1.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uygulamasıyla oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. **(A)** RAW 264.7 hücrelerinde **(B)** HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uygulamasıyla oluşan YO-PRO-1 girişi (üst panel), Lucifer Yellow girişi (alt panel). Görüntüler, konfokal mikroskopla 30 sn aralıklarla 30 dk. boyunca yapılan xyzit kayıtlarından örnek olarak seçilen 0. ve 20. dk' ya ait tek bir z düzlemi görüntüsüdür.

3.1.2 RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ Hücrelerinde Agonist Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişinin Farmakolojik Profili

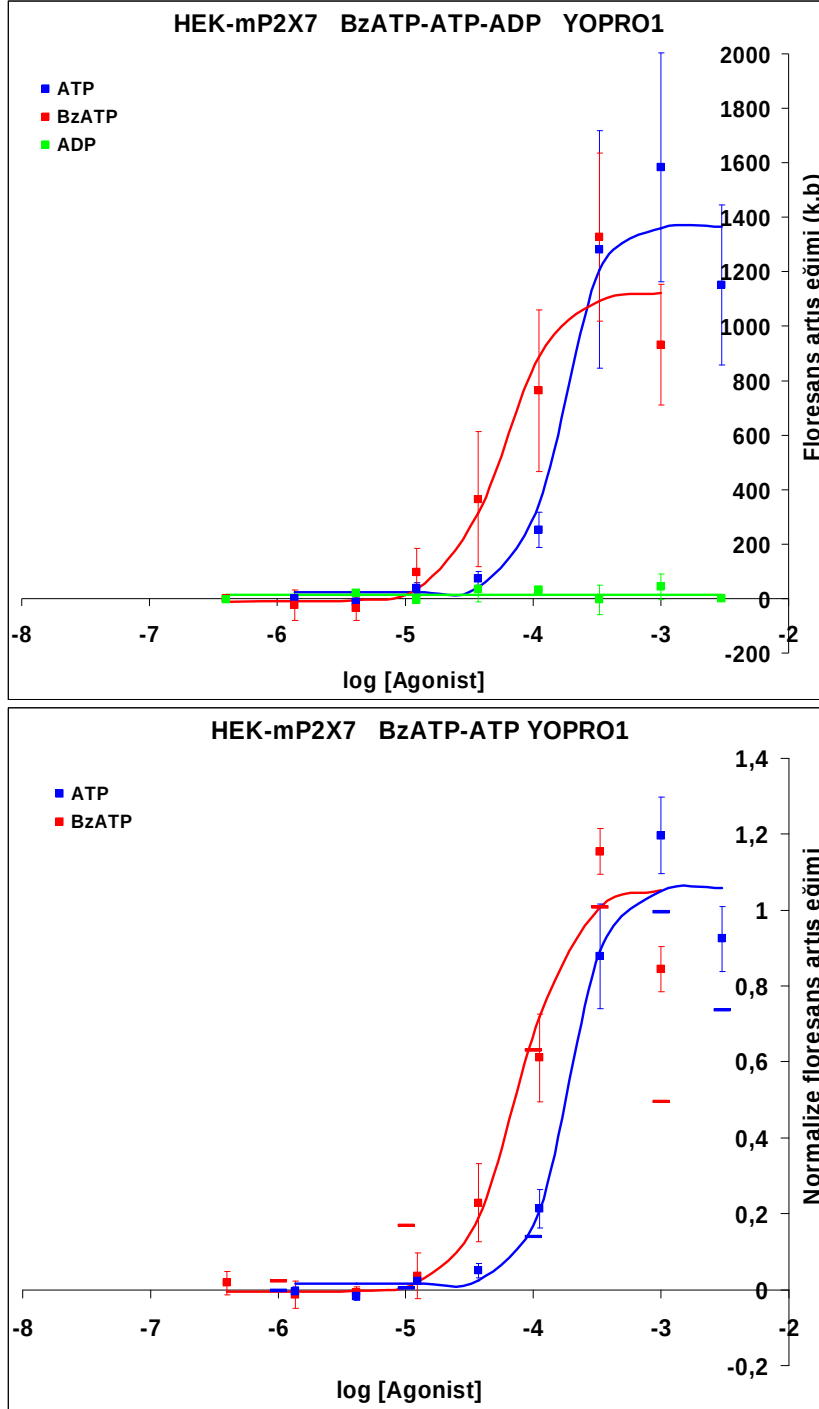
RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan membran geçirgenliğinin P2X₇ reseptörü aracılı olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için bilinen P2X reseptör agonistlerinden BzATP, ATP ve ADP farklı konsantrasyonlarda uygulanmış, YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişi incelenmiştir. Agonist konsantrasyonuna karşı floresans artışı ilişkisi çizilmiştir (doz-cevap eğrisi). Doz-cevap ilişkisinden, her bir agonist için maksimum yanıtın yarısını oluşturan agonist konsantrasyonu (EC50) hesaplanmıştır. Bu değerler, HEK-mP2X₇ hücrelerinden hesaplanan değerlerle karşılaştırılmıştır.

Şekil-3.1.2.1' de RAW 264.7 hücrelerinde BzATP, ATP ve ADP' nin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla plaka okuyuculu spektrofotometrede elde edilen YO-PRO-1 floresans artış eğimleri görülmektedir (A, sol panel). Bu değerlerin ortalama maksimum değere oranı ve hesaplanan EC50 değerleri ise sağ panelde görülmektedir. EC50 değerleri, BzATP için $10^{-5.4}$ M ($\sim 3 \mu\text{M}$), ATP için $10^{-4.1}$ M ($\sim 100 \mu\text{M}$) bulunmuştur. Bu değerler bu iki agonist için yaklaşık 30 katlık bir potens farkına işaret etmektedir. ADP için ise 10^{-3} M (1 mM)' dan büyüktür. ADP 3 mM' dan yüksek kullanılmadığı için maksimum yanıt, muhtemelen ölçülenden daha yüksek olacaktır, dolayısıyla EC50 değeri bu agonist için kesin olarak ifade edilememektedir. Buna karşın HEK-mP2X₇ hücrelerinin YOPRO-1 için, BzATP ve ATP için elde edilen EC50 değerleri RAW 264.7 hücrelerinde gözlemlendiği kadar birbirinden uzak değerler değildir, sırasıyla BzATP için $10^{-4.1}$ M ($\sim 100 \mu\text{M}$) ve ATP için $10^{-3.7}$ M ($\sim 300 \mu\text{M}$)' dır ve yaklaşık 3 katlık bir fark gösteren, birbirlerine yakın değerlerdir (Şekil-3.1.2.1B sol panel). Bu hücrelerde ADP ile ölçülebilir bir yanıt görülmemiştir.

A



Şekil-3.1.2.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin YO-PRO-1 girişi için agonist profili. **(A)** RAW 264.7 hücrelerinde çeşitli dozlarda BzATP, ATP ve ADP uygulanarak elde edilen floresans artış eğimlerinden, agonist yokluğunda ölçülen bazal eğim çıkarılarak agonist konsantrasyonun (molar) logaritmasına karşı çizilmiştir (sol panel), sol panelde elde edilen değerlerden ortalama minimum yanıt çıkarılmış ve ortalama maksimum yanıtla oranlanarak agonist konsantrasyonuna karşı çizilmiştir (sağ panel).

B

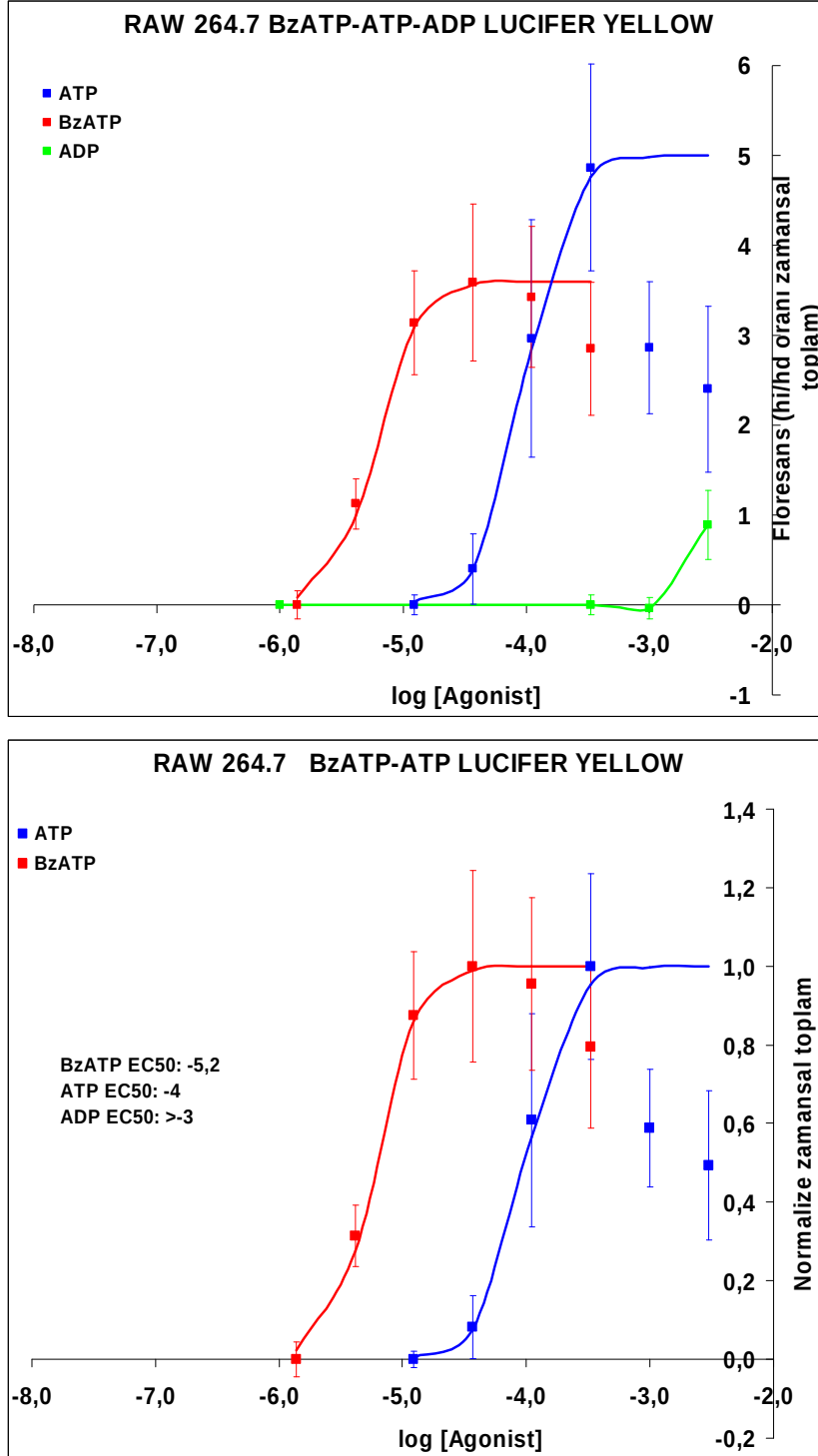
Şekil-3.1.2.1 devam: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin YO-PRO-1 girişi için agonist profili. **(B)** RAW 264.7 hücreleri için test edilen agonistler HEK-mP2X₇ hücreleri için de test edilmiş, aynı şekilde işlenmiştir. ■, BzATP; ■, ATP ve ■, ADP ile elde edilen data noktalarını, --- BzATP' nin; --- ATP' nin; --- ADP' nin doz-yanıt eğrisine yapılan fitleri temsil etmektedir. Şekil içinde verilen EC50 değerleri, doz-yanıt eğrisine yapılan fit kullanılarak hesaplanan ve maksimum yanıtın yarısını oluşturan agonist konsantrasyonunun logaritmasıdır. Deneyler plaka okuyuculu spektrofotometrede yapılmıştır. Sonuçlar 8-10 ayrı gün yapılan bağımsız deneylerden elde edilmiştir. Data noktaları ortalama ± SEM olarak verilmiştir. (—) işareti BzATP ile (—) işareti ile gösterilen sonuçlar ise konfokal mikroskopta yapılan deneylerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir.

Bu bölümdeki bulgular özetlenecek olursa RAW 264.7 hücreleri ile HEK-mP2X₇ hücrelerinde görülen YO-PRO-1 giriş yanıtlarında ATP ve BzATP potensleri HEK-mP2X₇ hücrelerinde birbirine çok yakinken, RAW 264.7 hücrelerinde BzATP, ATP'ye göre belirgin olarak daha potent bir agonisttir. Bu durum daha çok BzATP' nin EC50' sindeki farkdan doğmaktadır. ADP ise zayıf bir agonist olmakla beraber RAW 264.7 hücrelerinde ölçülebilir bir yanıt oluşturmakta ancak HEK-mP2X₇ hücrelerinde herhangi bir yanıt oluşturmamaktadır. Her iki hücrede de agonist potens sıralaması aynıdır.

3.1.3 RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ Hücrelerinde Agonist Uyarısıyla Oluşan Lucifer Yellow Girişinin Farmakolojik Profili

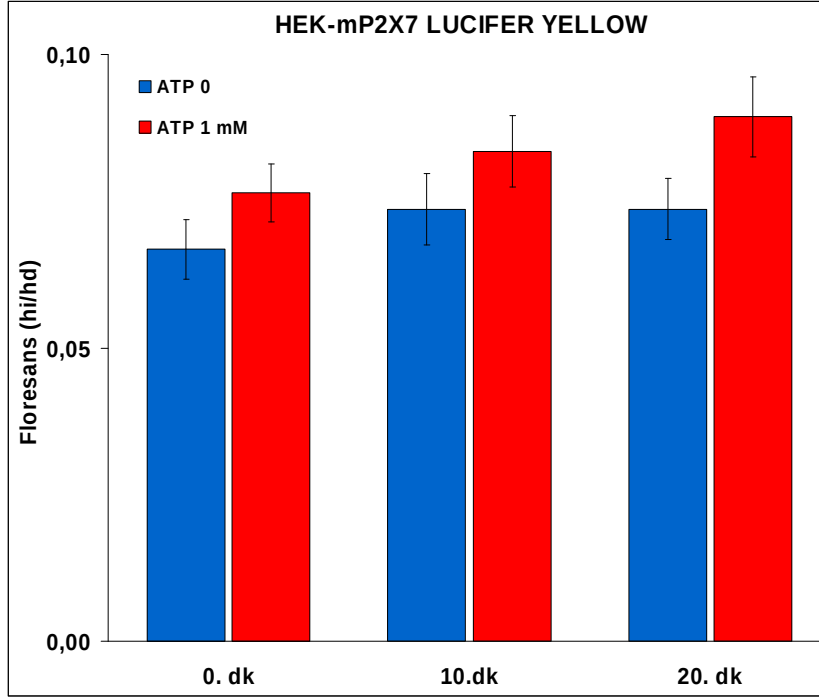
RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde uyarı ile oluşan membran geçirgenliğinin agonist profili bakımından karşılaştırılmasına katyonik bir boya olan YO-PRO-1' den sonra anyonik Lucifer Yellow ile devam edilmiştir (Şekil-3.1.3.1). BzATP, ATP ve ADP için hücre içi Lucifer Yellow floresans artış yanıtı şekil-3.1.3.1A sol panelde ve maksimum yanıtı normalize edilerek elde edilen EC50 değerleri şekil-3.1.3.1A sağ panelde görülmektedir. RAW 264.7 hücrelerinin Lucifer Yellow girişi için agonist etkinlik sıralaması BzATP > ATP > ADP şeklindedir. EC50 değerleri ise sırasıyla 10^{-5.2} M (~ 6 µM), 10⁻⁴ M (~ 100 µM), 10⁻³ M (> 1mM)' dir. ATP de 1 mM ve sonrasında yanıtlarda belirgin bir aşağı bükülüş görülmektedir.

A



Şekil-3.1.3.1: RAW 264.7 hücrelerinin Lucifer Yellow girişi için agonist profili ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin Lucifer Yellow geçirgenliği. **(A)** RAW 264.7 hücrelerinde çeşitli dozlarda BzATP, ATP ve ADP uygulanarak elde edilen hi/hd oranlarının zamansal toplamaları (sol panel), sol panelde elde edilen değerler ortalama maksimum yanıtla normalize edilmesi (sağ panel). ■, BzATP; ■, ATP ve ■, ADP' dir. -- BzATP, ---- ATP, - - - - ADP doz-yanıt eğrisine yapılan fitleri temsil etmektedir. Şekil içinde verilen EC50 değerleri, doz-yanıt eğrisine yapılan fit kullanılarak hesaplanan ve maksimum yanıtın yarısını oluşturan agonist konsantrasyonunun logaritmasıdır.

B



Şekil-3.1.3.1 devam: RAW 264.7 hücrelerinin Lucifer Yellow girişi için agonist profili ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin Lucifer Yellow geçirgenliği. **(B)** HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP (■, 1 mM) uygulanarak veya uygulanmayarak (■, ATP 0) yapılan deneylerden ölçülen ve 0., 10. ve 20. dk' ya ait hücre içi ve hücre dışı floresansların oranı. Her bir ölçüm noktası 62-165 arası sayıda hücreden elde edilmiş ve deneyler 5-8 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data günlerin ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Yukarıda da belirtildiği gibi HEK-mP2X₇ hücreleri agonist uyarısı sonucunda sürekli hareket etmeleri yüzünden, teker teker takip edilememekte, dolayısıyla tek tek hücrelerde zamana bağlı floresans artışı ölçülememektedir. Bu nedenle, sadece belli zaman noktalarında (0., 10. ve 20. dakika) ve tüm hücrelerin ortalaması alınarak ölçüm yapılabilmektedir. RAW 264.7 hücrelerinin aksine HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uyarısı ile herhangi bir Lucifer Yellow girişi gözlenmemektedir (Şekil-3.1.3.1B). ATP uyarısı olmadığı durumda (ATP 0) 0., 10. ve 20. dakikalarda elde edilen hücre içi hücre dışı floresans oranı (hi/hd) oranları sırasıyla $0,067 \pm 0,005$; $0,074 \pm 0,006$ ve $0,074 \pm 0,005$ iken ATP uyarısı olduğu durumda (ATP 1 mM) 0., 10. ve 20. dakikalarda elde edilen hi/hd oranları sırasıyla $0,076 \pm 0,005$; $0,083 \pm 0,006$ ve $0,089 \pm 0,007$ dir.

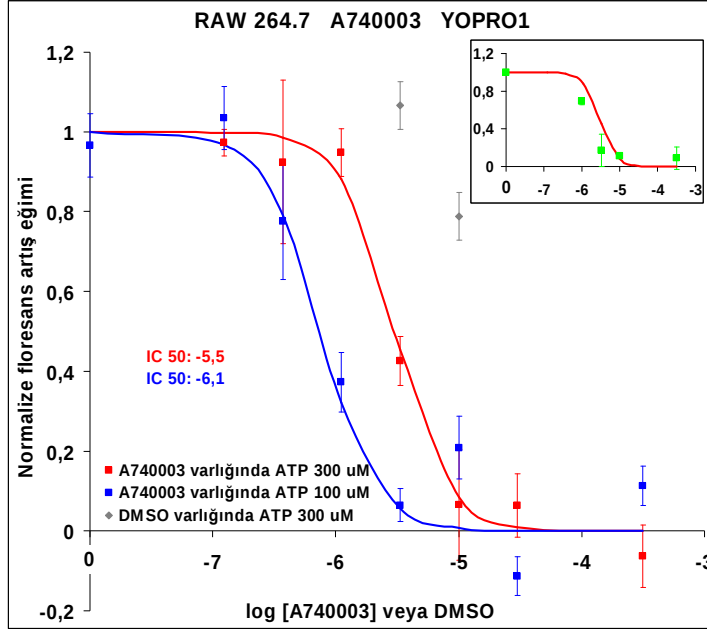
Bu bölümdeki bulgular özetlenecek olursa HEK-mP2X₇ Hücrelerinde ATP ile bir Lucifer Yellow girişi gözlenmemektedir. RAW 264.7 hücrelerinde ise Lucifer Yellow girişi için BzATP, ATP ye göre yaklaşık 10-15 kat daha potent bir agonisttir. ADP ise düşük bir potense sahip olmakla birlikte bu hücrelerde ölçülebilir bir yanıt oluşturmaktadır.

3.1.4 RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişinin Seçici P2X₇ Antagonistine Olan Duyarlılığı

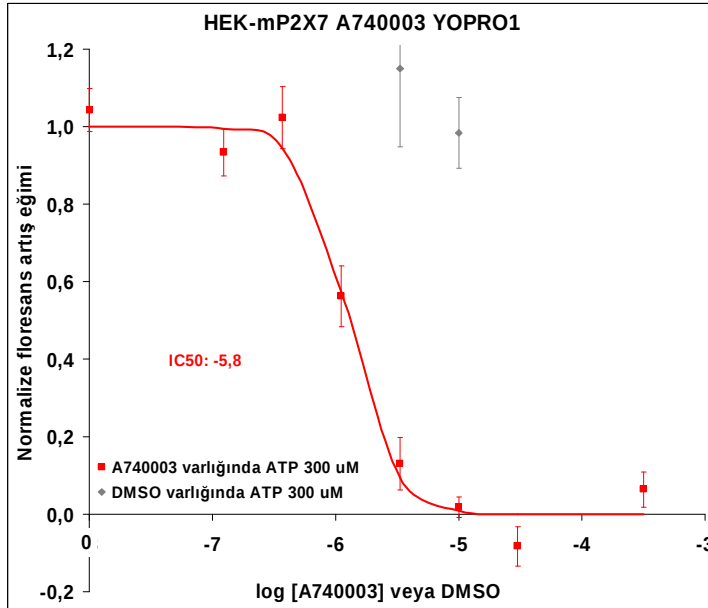
RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısı ile oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişinin P2X₇ reseptörü aracılı olup olmadığının bir diğer test yolu ise sözkonusu floresan boya geçirgenliğinin seçici P2X₇ reseptör antagonistine olan duyarlılığını incelemek ve HEK-mP2X₇ hücreleriyle karşılaştırmaktır. A740003 son yıllarda sentezlenen yarışmalı ve seçici bir P2X₇ antagonisttir (Donnelly-Roberts ve ark., 2009). Bunun için, önce RAW 264.7 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda A740003 varlığında, ATP submaksimal ve maksimal birer konsantrasyon olan 100 veya 300 μ M da uygulanmış ve YOPRO-1 girişi ölçülmüştür (şekil-3.1.4.1A). 300 μ M ATP ile elde edilen A740003 IC₅₀ değeri $10^{-5,5}$ M ($\sim 3 \mu$ M), 100 μ M ATP ile elde edilen A740003 IC₅₀ değeri ise $10^{-6,1}$ ($\sim 1 \mu$ M)' dir (şekil-3.1.4.1A için değerler). Yarışmalı bir antagonistten beklendiği gibi, A74003' ün de düşük agonist ile IC₅₀ değeri yüksek konsantrasyon agonist ile elde edilen IC₅₀ değerinden daha düşüktür ve bu değerler literatürde rapor edilen IC₅₀ değerlerine son derece yakındır (Donnelly-Roberts,

2009). A740003' ün inhibisyon etkisinin çözücü (DMSO) etkisi olmadığı, A74003' den gelen ile aynı derişimde yapılan DMSO ile test edilmiş ve bir inhibisyon görölmemiştir. Diğer yandan plaka okuyuculu spektrofiorimetrede elde edilen A740003 inhibisyon verileri konfokal mikroskopta yapılan ancak göreceli olarak daha az sayıda nokta ile kontrol edilmiş ve yaklaşık aynı sonuç görölmüştür (şekil-3.1.4.1A grafik içindeki küçük grafik).

A



B

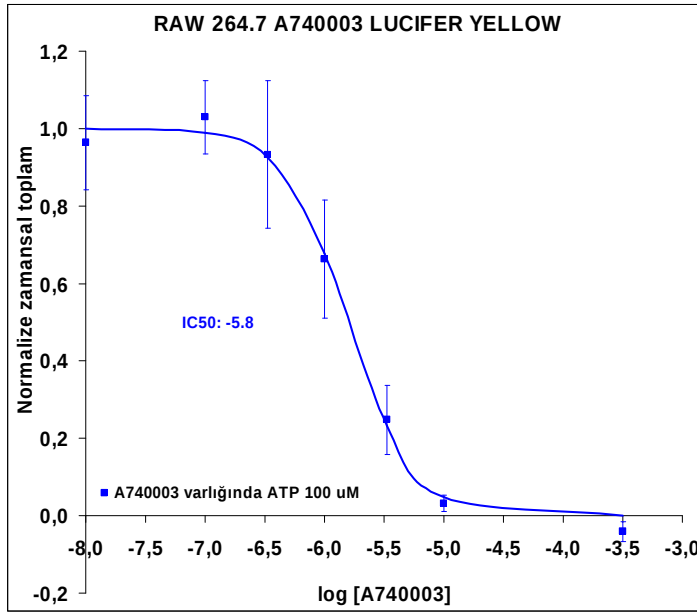


Şekil-3.1.4.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin seçici P2X₇ reseptör antagonisti duyarlılığı. **(A)** RAW 264.7 hücreleri, seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 ile 8 dakika 37 °C' de inkübe edilmiş, farklı konsantrasyonlarda A740003 varlığında ATP (■ 300 µM ve ■ 100) uygulanarak, A740003 konsantrasyonuna karşı YO-PRO-1 floresans artışı elde edilmiş ve A74003 yokluğunda elde edilen değere normalize edilmiştir. Doz-inhibisyon eğrisine yapılan fitten hesaplanan IC₅₀ değeri, A74003' ün maksimum inhibisyonun yarısını oluşturduğu konsantrasyonunu göstermektedir ve grafik içinde, 100 µM ve 300 µM ATP için ayrı ayrı verilmiştir. **Grafik içi:** ATP 300 µM ve gösterilen derişimde A740003 kullanılarak RAW 264.7 hücrelerinde konfokal mikroskopla elde edilen değerler ■ işaretiyle gösterilmiştir. Bu noktaların üzerine büyük şekildeki fit edilen eğri yerleştirilmiştir. **(B)** HEK-mP2X₇ hücrelerinde de 300 µM ATP yanıtlarının A740003 ile oluşan doz-inhibisyon ilişkisi RAW 264.7 hücreleriyle aynı protokolle spektrofotometre de elde edilmiş ve doz-inhibisyon eğrisine yapılan fitten hesaplanan IC₅₀ değeri grafik içinde verilmiştir. Deneyler 4-5 ayrı gün tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir.

HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP için submaksimal konsantrasyon olan 300 µM ATP kullanılarak YO-PRO-1 girişi için yapılan deneylerde, A740003 için IC₅₀ değeri 10^{-5,8} M (~ 1,5 µM) olarak tespit edilmiştir (şekil-3.1.4.1B).

3.1.5 RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Lucifer Yellow Girişinin Seçici P2X₇ Antagonist Duyarlılığı

YO-PRO-1 girişine benzer olarak RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla görülen Lucifer Yellow girişinin seçici P2X₇ antagonistine duyarlılığı incelenmiştir (şekil-3.1.5.1). Bu hücrelerde submaksimal doz olan 100 µM ATP ile A740003' ün Lucifer Yellow girişi için IC₅₀ değeri 10^{-5,8} M (~ 1.5 µM) bulunmuştur ve YO-PRO-1 için aynı doz ATP ile bulunan değere son derece yakındır (şekil-3.1.5.1).



Şekil-3.1.5.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin seçici P2X₇ reseptör antagonistine duyarlılığı. RAW 264.7 hücrelerinde, farklı derişimlerde seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 varlığında ATP (100 µM) uygulanmış ve A740003 doz-inhibisyon eğrisi elde edilmiştir. Bütün data noktaları, antagonist yokluğunda elde edilen maksimum yanıtın ortalamasına normalize edilmiştir (0 ve -8 deki yanıtların ortalaması). Grafik içindeki IC₅₀ değeri, 100 µM ATP için A74003' ün maksimum inhibisyonun yarısını oluşturduğu konsantrasyonunu göstermektedir. Deneyler 6 ayrı gün tekrar edilmiştir. HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uygulamasıyla Lucifer Yellow girişi gözlenmediğinden, antagonist duyarlılığı bu yanıt için test edilmemiştir.

HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uyarısı ile Lucifer Yellow girişi gözlenmediğinden, antagonistik etki bu koşullar için incelenememiştir. RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücreleriyle elde edilen agonist EC₅₀ değerleri ve antagonist IC₅₀ değerleri tablo-3.1.5.1' de görülmektedir.

Tablo-3.1.5.1: RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinin agonist profilleri ve antagonist duyarlılığı karşılaştırması. RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücreleriyle YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow için elde edilen agonist EC₅₀ değerleri ve seçici P2X₇ antagonisti olan A740003' nin, RAW 264.7 hücreleri için 100 µM ATP, HEK-mP2X₇ hücreleri için 300 µM ile elde edilen IC₅₀ değerleri. Ø, yanıt olmadığını ifade etmektedir.

		YO-PRO-1		LUCIFER YELLOW	
		RAW 264.7	HEK-mP2X ₇	RAW 264.7	HEK-mP2X ₇
Agonist	BzATP	-5,4	-4,1	-5,2	Ø
	ATP	-4,1	-3,7	-4	Ø
	ADP	>-3	Ø	>-3	Ø
Antagonist	A740003	-6,1	-5,8	-5,8	Ø

3.2 RAW 264.7 ve HEK-MP2X₇ Hücrelerinde ATP ile Oluşan Yanıtlara Panneksin-1 ve Anyon Taşıyıcısı İnhibitörlerinin Etkisi

P2X₇ reseptör aktivasyonunda panneksin-1' in rolü olduğuna ilişkin literatürde çeşitli bulgular mevcuttur. Ancak bu konudaki sonuçlar oldukça çelişkilidir. Kimi çalışmalarda panneksin-1 inhibitörü olduğu öne sürülen CBX' in ve panneksin-1 susturucu RNA uygulamasının (siRNA) P2X₇ aktivasyonu ile oluşan YO-PRO-1 girişini inhibe ettiği gösterilirken (Pelegrin ve Surprenant, 2006), kimi çalışmalarda aynı inhibitör ve susturucu RNA' nın herhangi bir inhibisyon etkisi gösterilememiştir (Bhaskaracharya ve ark., 2014). Anyon taşıyıcı inhibitörü NPPB' nin panneksin-1 ile oluşan membran akımlarını inhibe ettiği de literatürdeki diğer bir bulgudur. Literatürdeki bu bulgulardan hareketle, RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişinde sözü edilen inhibitörlerin inhibisyon etkisi incelenerek, panneksin-1 ve anyon taşıyıcılarının ATP' nin aktive ettiği bu iki geçirgenlik yolağında olası rolleri ortaya konmaya çalışılmıştır.

3.2.1 CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 ve HEK-mP2X7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Blebilenmeye Etkisi

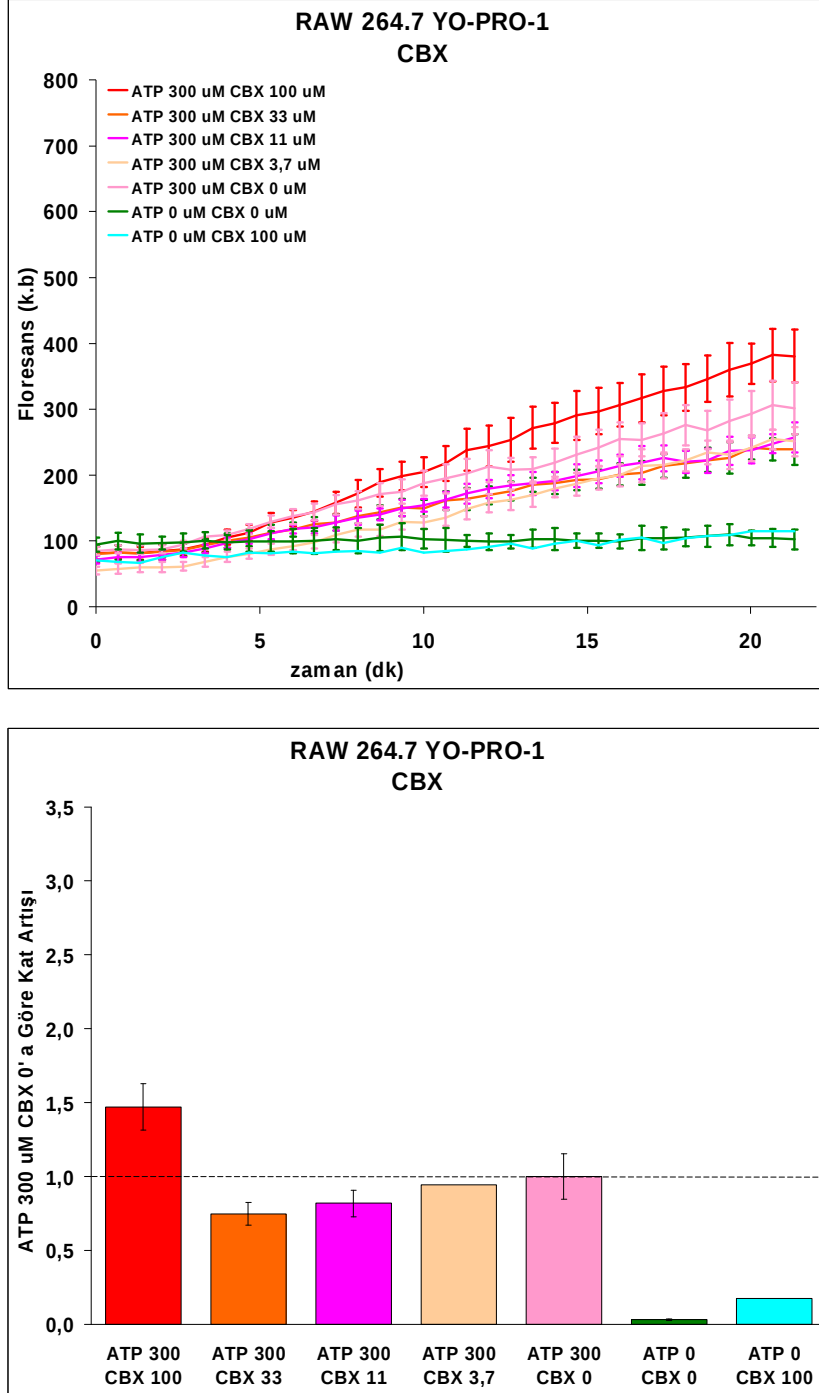
RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla Lucifer Yellow ve YO-PRO-1 girişi görüldüğünden her iki floresan boya girişi için CBX, NPPB ve NFA' nın farklı konsantrasyonlardaki etkisi incelenmiştir.

CBX ile elde edilen ilk ve oldukça beklenmedik gözlem hücrelerin dinamik blebilenmelerini durdurmasıdır. ATP uyarısıyla hücre membranının farklı yerlerinde sürekli oluşup geri çekilen blebler yerine bu maddenin uygulanması ile oluşup, olduğu gibi kalan blebler görülmüştür. Buna ek olarak, ATP uyarısıyla lamel tabanından kalkan hücreler, ATP ile beraber CBX uygulandığında lamel tabanından hemen hemen hiç kalkmamaktadır. ATP' nin dolayısıyla da P2X₇ uyarısının en belirgin morfolojik etkilerini ortadan kaldırma etkisi, CBX' in ilk göze çarpan etkisidir. Benzer etki NFA ve NPPB ile de gözlenmiştir. CBX, NFA ve NPPB' nin bu morfolojik etkileri konsantrasyon bağımlı bulunmuştur. Bu bulgu deney bir film olarak izlendiğinde ancak net olarak görülebilmektedir, dolayısı ile bu etki ile ilgili görüntüler metin içine alınmamıştır. Sözü edilen etki, tüm inhibitörler için hem RAW 264.7 hem de HEK-mP2X₇ hücrelerinde görülmüştür.

3.2.2 CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişine Etkisi

Panneksin-1 inhibitörü olduğu ve P2X₇ aracılı YO-PRO-1 girişini panneksin-1 üzerinden inhibe ettiği öne sürülen CBX'in, RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 girişine herhangi bir inhibitör etkisi gözlenmemiştir (şekil-3.2.2.1 üst). 33 µM, 11 µM ve 3,7 µM CBX, ATP uyarısı ile oluşan YO-PRO-1 girişini inhibe etmemektedir. CBX' in ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişine olan etkisizliği, CBX' li yanıtlar CBX' siz ATP yanıtının katı olarak ifade edildiğinde elde edilen değerlerden anlaşılmaktadır. Bu değerler sırasıyla $0,74 \pm 0,08$; $0,81 \pm 0,09$ ve $0,94$ 'tür (şekil-3.2.2.1 alt). Bununla beraber 100 µM CBX ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 girişini bir miktar arttırmaktadır. Her ne kadar 100 µM CBX, ATP uyarısı olmadan da hafif bir YO-PRO-1 girişi yapıyor olsa da, bu artış ATP ile olan yanıtaki

artışı açıklamaya yetmemektedir. CBX bir panneksin inhibitörüdür dolayısı ile bu bulgu ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin RAW 264.7 hücrelerinde panneksin aracılı olmadığını düşündürmektedir.

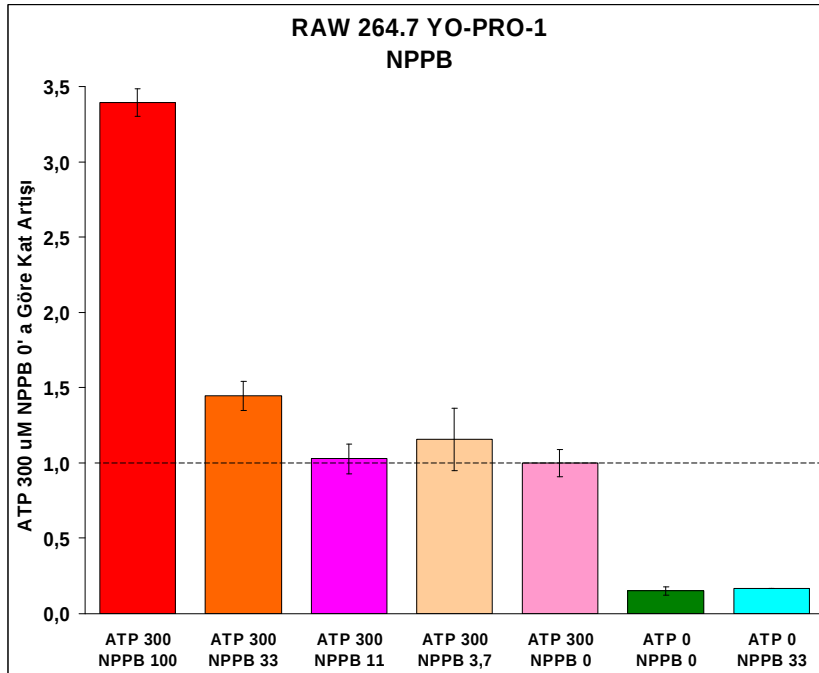
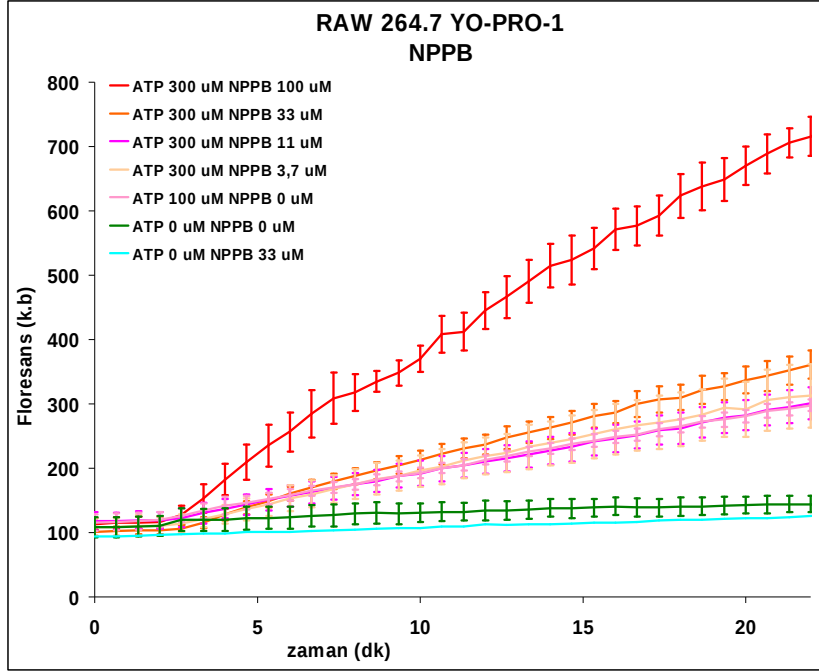


Şekil-3.2.2.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin CBX duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M CBX ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μ M + 0 μ M CBX koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

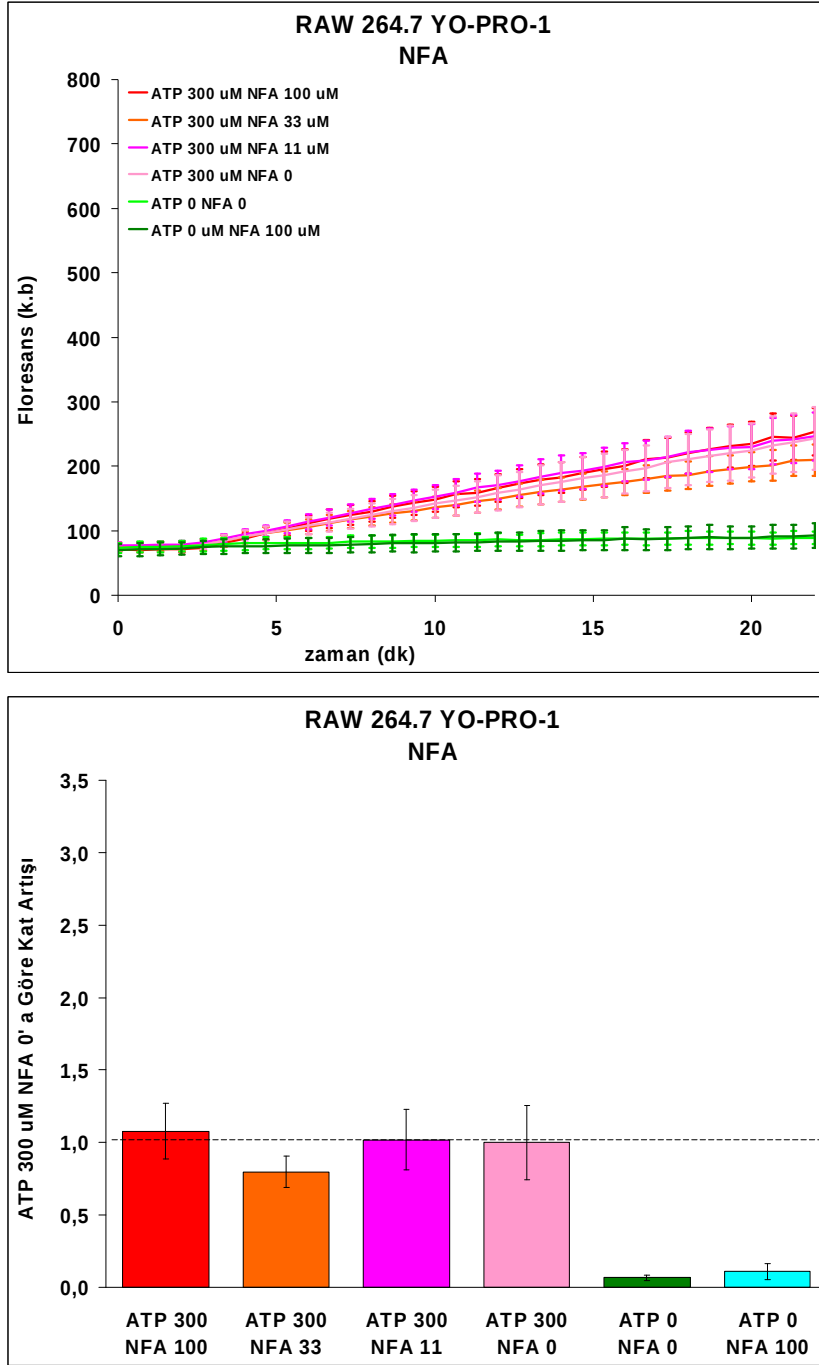
Bir anyon taşıyıcı/kanal inhibitörü olan NPPB 33 μ M, 11 μ M ve 3,7 μ M derişimde ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 girişlerine ölçülebilir bir etki yapmamıştır (şekil-3.2.2.2 üst panel). Eğrilerin eğimleri de sayısal olarak yakındır (ortalama $\pm$ SEM değerleri sırasıyla $1,44 \pm 0,09$; $1,02 \pm 0,09$ ve $1,15 \pm 0,21$) (şekil-3.2.2.2 alt panel). Ancak 100 μ M NPPB yine CBX' e benzer olarak ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişini inhibe etmemekle beraber arttırmaktadır. Bu durum gerek floresans artış eğrilerinden (şekil-3.2.2.2 üst panel) gerekse eğimlerin sayısal değerlerinden anlaşılmaktadır (şekil-3.2.2.2 alt panel). CBX' e benzer şekilde, RAW 264.7 hücrelerinde bir anyon taşıyıcı/kanal inhibitörü olan NPPB'nin ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 girişine bir inhibitör etkisi gözlenmemiştir. YO-PRO-1 pozitif yüklü bir floresan boya olduğundan bu anyon taşıyıcı/kanal inhibitörü ile alınan sonuç beklenmedik değildir. Ancak bu madde aynı zamanda CBX kadar potent bir pannexin inhibitörü olarak da bilinmektedir. Dolayısı ile bu bulgu CBX bulgularımız gibi ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin RAW 264.7 hücrelerinde pannexsin aracılı olmadığını düşündürmektedir.

Bir diğer anyon taşıyıcı/kanal inhibitörü olan NFA 100 μ M, 33 μ M ve 11 μ M derişimde ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 girişlerine RAW 264.7 hücrelerinde ölçülebilir bir etki yapmamıştır (şekil-3.2.2.3 üst panel). NFA' nın ATP ile oluşan YOPRO-1 girişi üzerine etkisizliği, eğimlerin sayısal değerlerinden de anlaşılmaktadır (ortalama $\pm$ SEM değerleri sırasıyla $1,07 \pm 0,19$; $0,79 \pm 0,10$; $1 \pm 0,2$) (şekil-3.2.2.3 alt panel). NFA bir anyon taşıyıcı inhibitörü olduğu için, YO-PRO-1 ise pozitif yüklü bir floresan boya olduğundan, NFA' nın YO-PRO-1 girişini inhibe etmesi zaten beklenmemektedir.

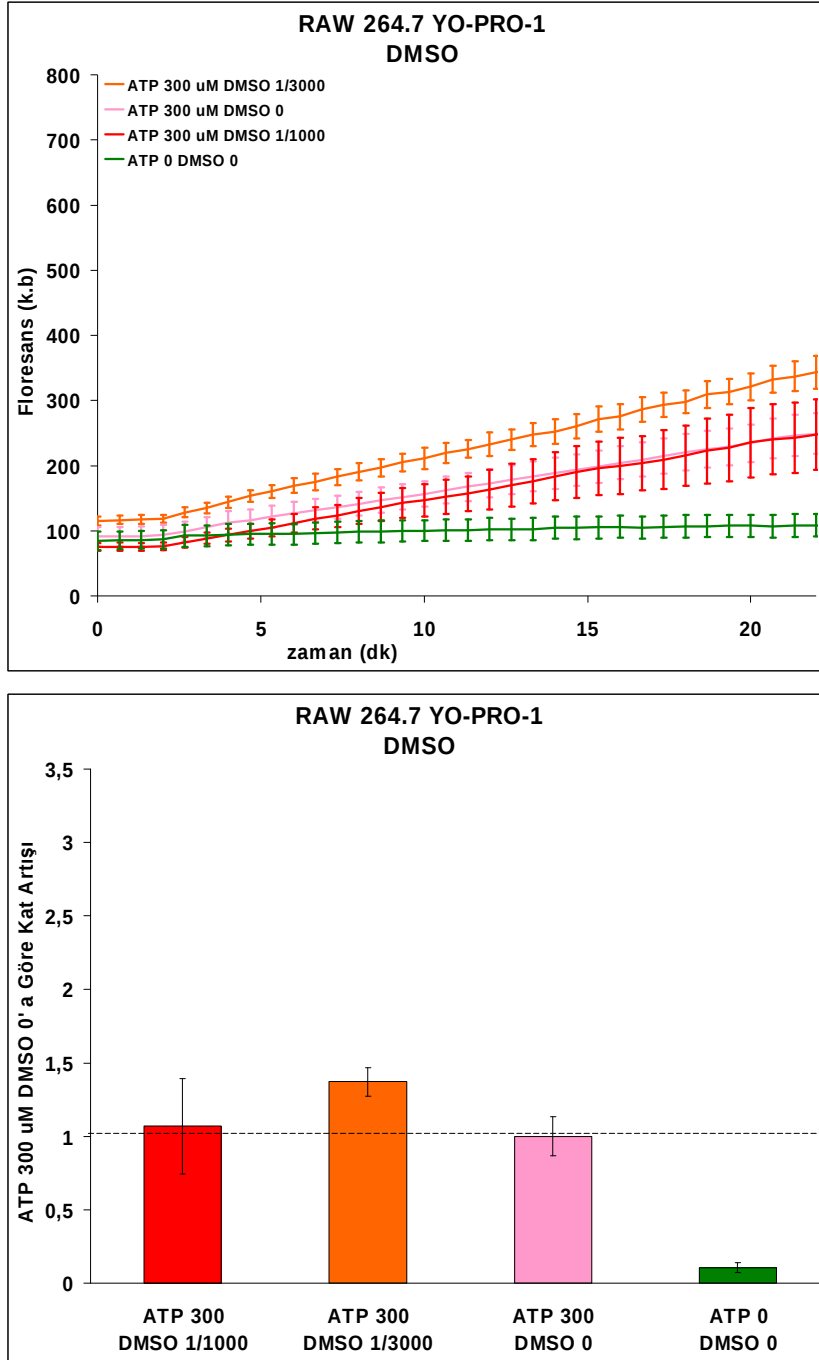
NPPB ve NFA' nın çözücülerini DMSO olmasından dolayı 100 μ M NPPB' nin ATP aracılı YO-PRO-1 girişini arttırıcı etkisinin DMSO' dan kaynaklanıp kaynaklanmadığı ayrıca test edilmiştir. Bunun için NPPB ve NFA' nın 100 μ M ve 33 μ M' ina karşılık gelen sulandırılmalarda (1/1000 ve 1/3000) DMSO kullanılmış ve ATP aracılı YO-PRO-1 girişine bir arttırıcı etkisinin olmadığı gözlenmiştir (şekil-3.2.2.4).



Şekil-3.2.2.2: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin NPPB duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M NPPB ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μ M + 0 μ M NPPB koşulunda elde edilen floresans artış eğiminine göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir (ATP 0 NPPB 33 deneyi 1 gün yapılmıştır). veriler, ortalama $\pm$ SEM verilmiştir.



Şekil-3.2.2.3: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin NFA duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3, 7, 11, 33 ve 100 μM NFA ile 8 dakika 37°C ' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μM) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μM + 0 μM NFA koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.



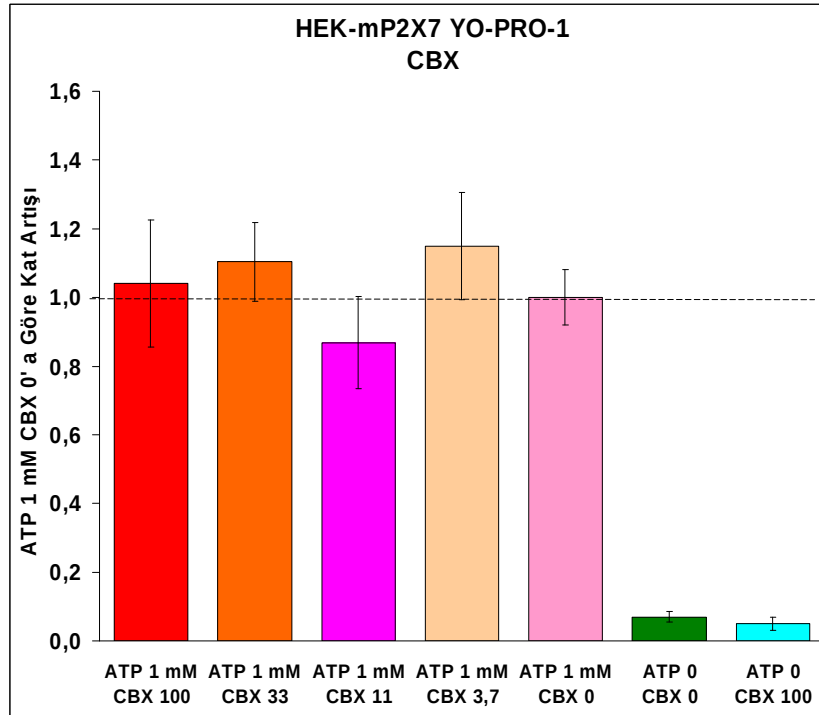
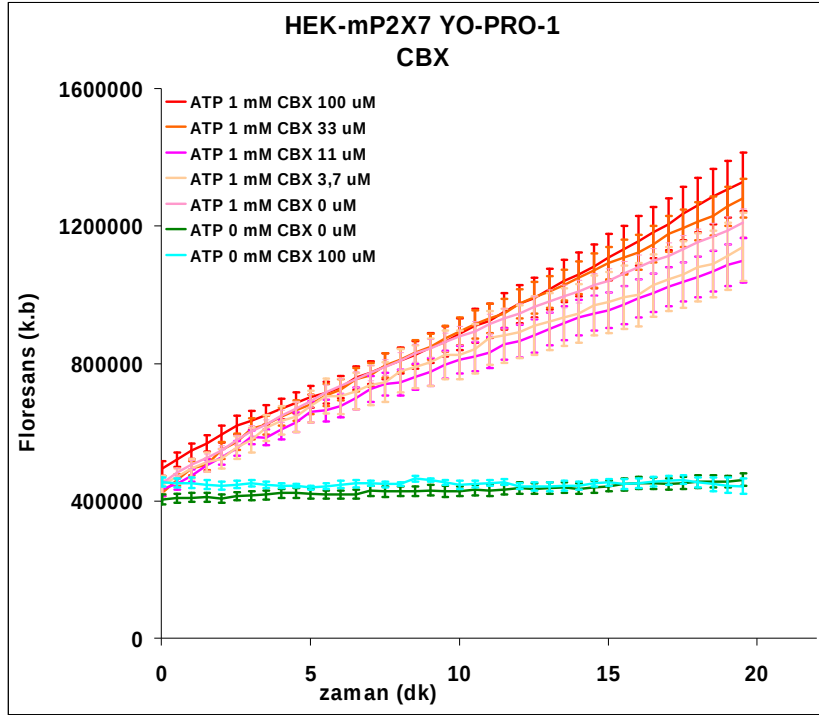
Şekil-3.2.2.4: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinde görülen NPPB ve NFA duyarlılığının taşıyıcı (DMSO) etkisi. RAW 264.7 hücreleri ayrıntıları “materyal ve metod” kısmında açıklanan nedenlerle 0, 1/1000 ve 1/3000 oranında sulandırılmış DMSO ile 8 dakika 37°C’ de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 300 μ M + 0 DMSO koşulunda elde edilen floresans artış eğiminine göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir

3.2.3 CBX, NPPB ve NFA' nın HEK-mP2X7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 Girişine Etkisi

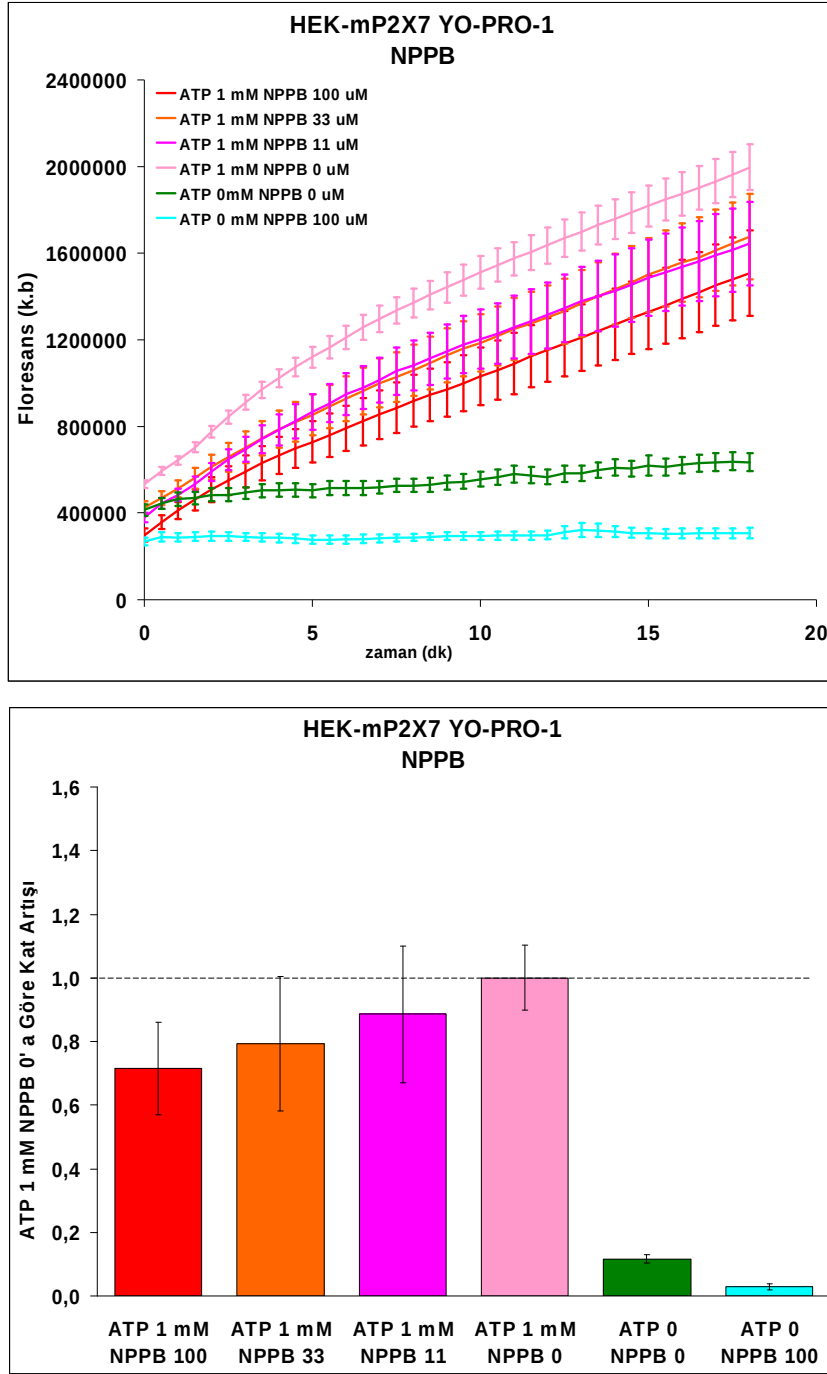
Konfokal deneylerinde, yukarıda da bahsedildiği gibi Panneksin-1 inhibitörü CBX' in ve anyon taşıyıcı/kanal blokörü olan NPPB ve NFA'nın, RAW 264.7 hücrelerinde görülen morfolojik etkileri HEK-mP2X7 hücrelerinde de görülmüştür. CBX' in ATP ile aktive olan YO-PRO-1 giriş yanıtlarını inhibe edip etmediği plaka okuyucu kullanılarak nicel olarak incelenmiştir.

CBX 100 μ M, 33 μ M, 11 μ M ve 3,7 μ M derişimlerde ATP uyarısı ile oluşan YO-PRO-1 girişini inhibe etmemektedir (şekil-3.2.3.1 üst panel). CBX' in ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişine olan etkisizliği, CBX ile ölçülen değerler CBX' siz ATP yanıtının (1 mM ATP + 0 CBX) katı olarak ifade edildiğinde elde edilen ortalama $\pm$ SEM değerlerlerinden de anlaşılmaktadır. Bu değerler, CBX 100 μ M, 33 μ M, 11 μ M ve 3,7 μ M koşulları için elde edilen değerler sırasıyla $1,04 \pm 0,18$; $1,10 \pm 0,12$; $0,87 \pm 0,13$ ve $1,14 \pm 0,15$ (şekil-3.2.3.1 alt panel).

Diğer yandan NPPB, ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişini belirgin şekilde inhibe etmektedir (şekil-3.2.3.2 üst panel). Ancak bu inhibisyon doz bağımlı gibi görünmektedir. NPPB 100 μ M, 33 μ M ve 11 μ M koşullarında elde edilen floresans artış eğimleri 1 mM ATP + 0 NPPB koşulunda elde edilenin kat artışı olarak ifade edildiğinde sırasıyla $0,72 \pm 0,15$; $0,79 \pm 0,21$; $0,89 \pm 0,21$ ' dir (şekil-3.2.3.2 alt panel).



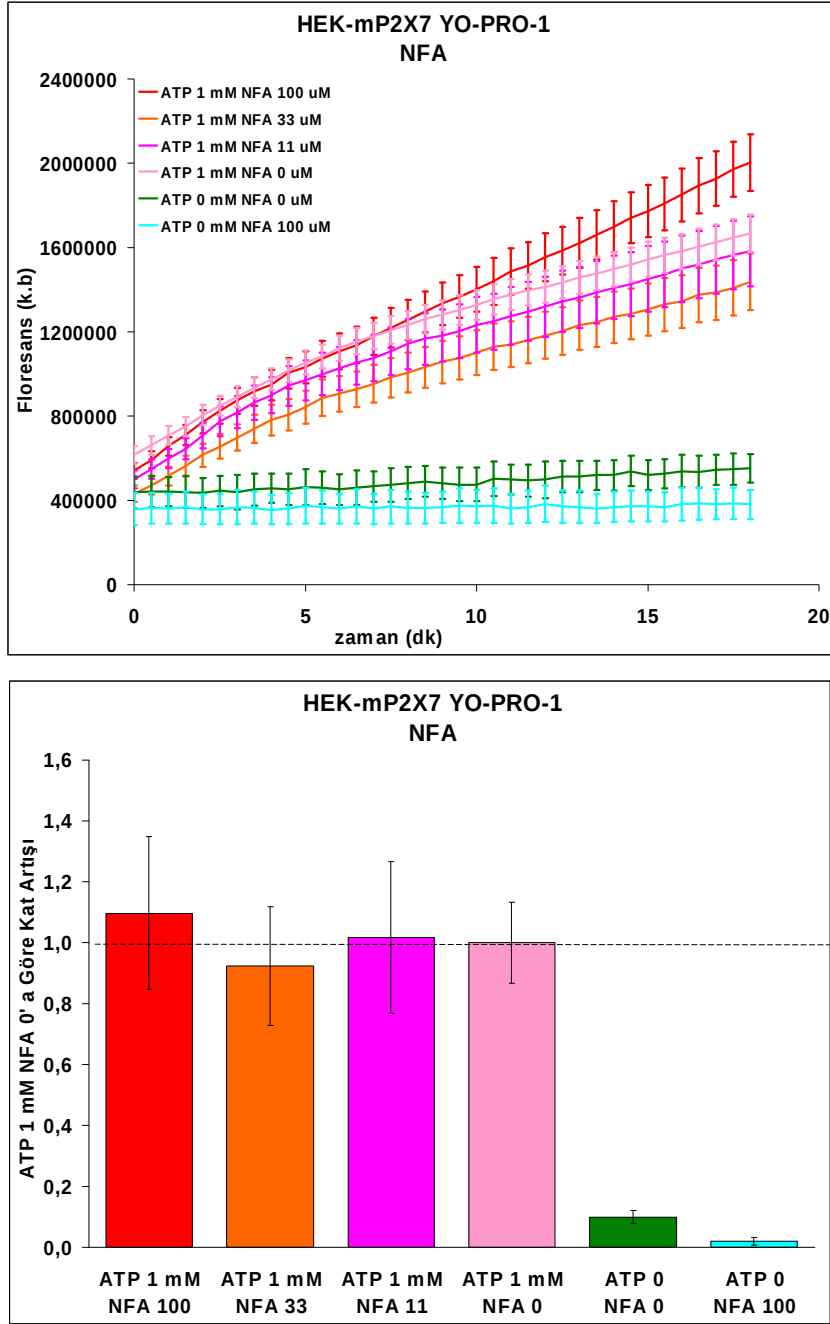
Şekil-3.2.3.1: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin CBX duyarlılığı. HEK-mP2X7 hücreleri 0; 3,7; 11; 33 ve 100 μM CBX ile 8 dakika 37°C ' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak spektrofotrimetrede YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 μM CBX koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.



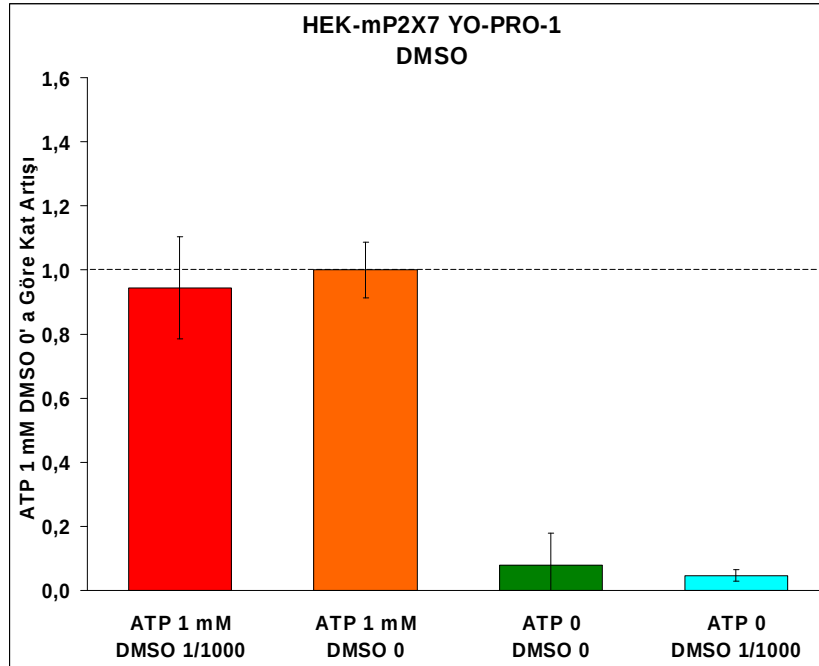
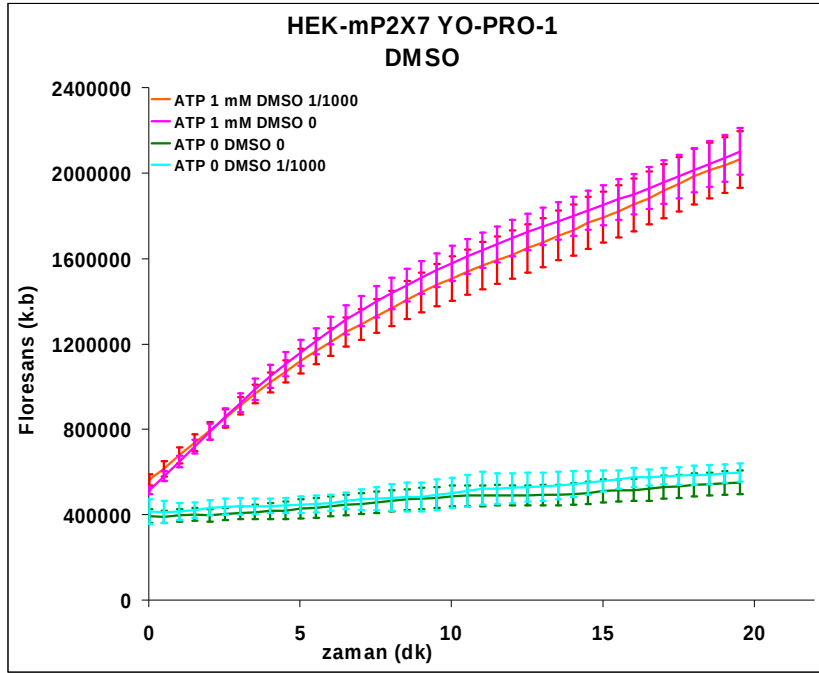
Şekil-3.2.3.2: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinin NPPB duyarlılığı. **(B)** HEK-mP2X7 hücreleri 0,11, 33 ve 100 μ M NPPB ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 μ M NPPB koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.

NFA ise ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişine bir inhibisyon etkisi yapamamaktadır (şekil-3.2.3.3 üst panel). NFA 100 μ M, 33 μ M ve 11 μ M koşullarında elde edilen floresans artış eğimleri 1 mM ATP + 0 NFA koşulunda elde edilenin kat artışı olarak ifade edildiğinde sırasıyla $1,10 \pm 0,25$; $0,92 \pm 0,19$; $1,02 \pm 0,25$ ' dir (şekil-3.2.3.3 alt panel).

NPPB ve NFA' nın çözücüsü DMSO olduğundan ayrıca test edilmiştir. DMSO' nun ATP aracılı YO-PRO-1 girişine etkisizliği gösterilmiştir. Bunun için NPPB' nin 100 μ M' ına karşılık gelen sulandırmayla (1/1000) DMSO kullanılmış ve ATP aracılı YO-PRO-1 girişine arttırıcı etkisinin olmadığı gözlenmiştir (şekil-3.2.3.1D). 1/1000 DMSO varlığında görülen ATP aracılı YO-PRO-1 giriş eğimi, ATP 1 mM + 0 DMSO koşulunda görülen eğimin kat artışı cinsinden $0,94 \pm 0,09$ ' dur.



Şekil-3.2.3.3: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinde NFA duyarlılığı. HEK-mP2X7 hücreleri 0,11, 33 ve 100 μ M NFA ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak spektrofloretride YO-PRO-1 girişı zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 μ M NFA koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.



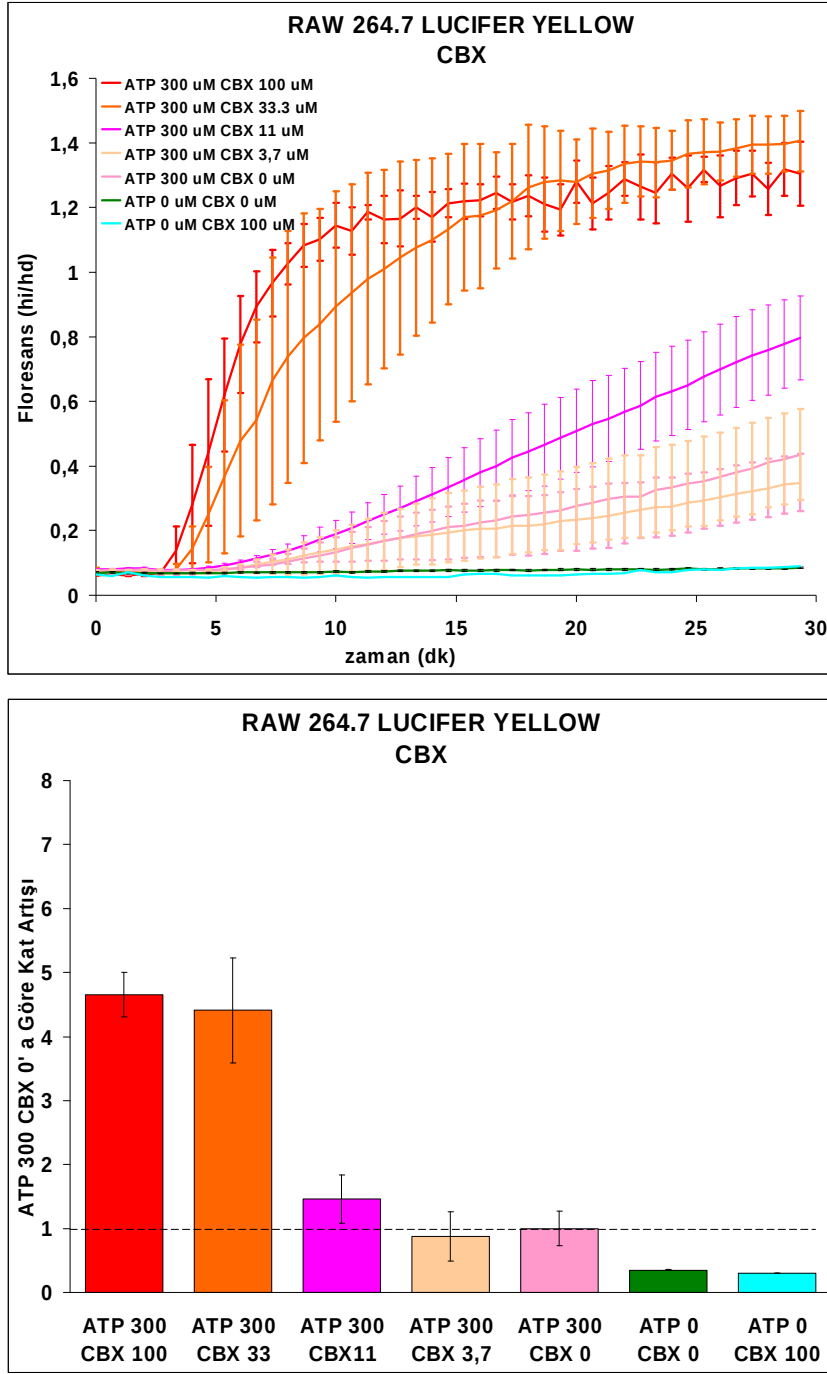
Şekil-3.2.3.4: HEK-mP2X7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 girişinde görülen NPPB ve NFA duyarlılığında taşıyıcı (DMSO) etkisi. HEK-mP2X₇ hücreleri 1/1000 DMSO ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 1 mM) uygulanarak konfokal mikroskop altında YO-PRO-1 girişi zaman boyunca incelenmiştir (üst panel). Floresans artış eğrilerine lineer fit yapılarak hesaplanan eğimler, ATP 1 mM + 0 DMSO koşulunda elde edilen floresans artış eğimlerinin ortalamasına göre kat artışı olarak ifade edilmiştir (alt panel). Deneyler 3-6 ayrı günün ortalama $\pm$ SEM' i olarak verilmiştir.

3.2.4 CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan Lucifer Yellow Girişine Etkisi

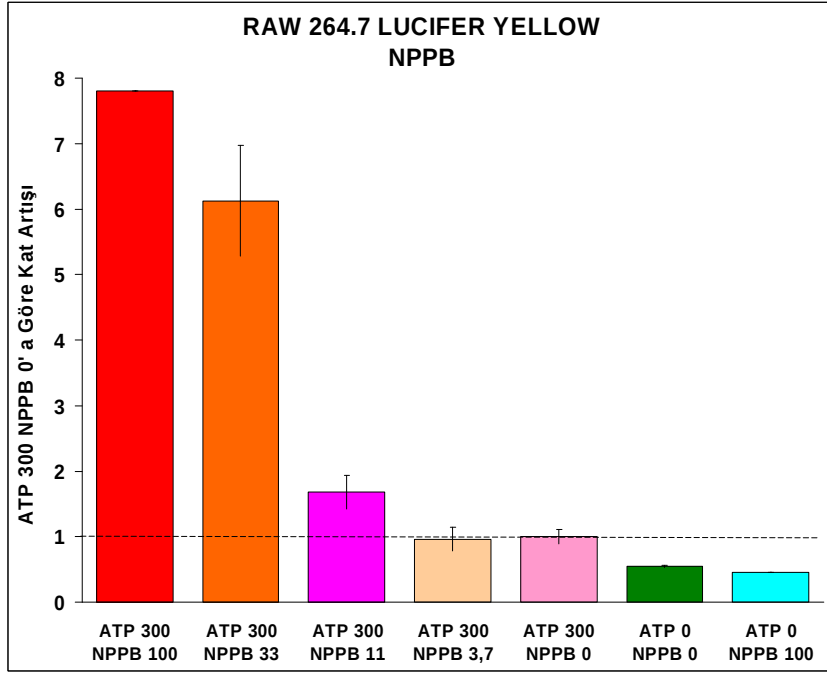
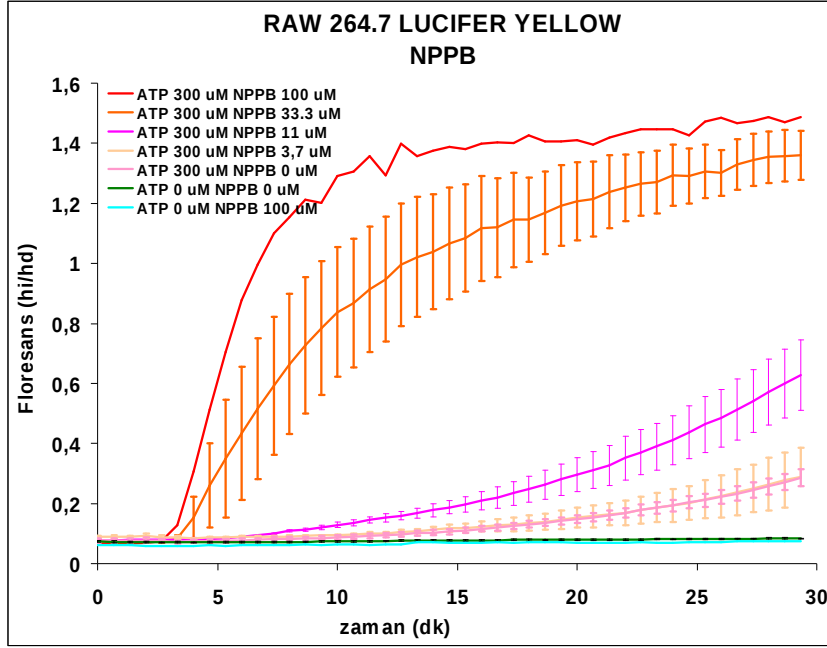
RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow olmak üzere iki ayrı geçirgenlik görülmektedir. Bu nedenle CBX, NPPB ve NFA' nın YO-PRO-1 girişinde inhibisyon etkisi incelendikten sonra Lucifer Yellow girişi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

CBX, ATP uyarısıyla oluşan Lucifer Yellow girişini inhibe etmemekte ilginç olarak belirgin olarak arttırmaktadır. ATP aracılı Lucifer Yellow girişinin, 100, 33 ve 11 μM CBX ile doz bağımlı olarak arttığı hi/hd oranlarından açıkça görülmektedir (şekil-3.2.4.1 üst panel). CBX varlığında ölçülen ATP aracılı Lucifer Yellow girişi eğrileri altında kalan alan, CBX 0 koşulunda görülenlere oranlandığında; 100, 33, 11 ve 3,7 μM CBX için sırasıyla $4,66 \pm 0,34$; $4,41 \pm 0,82$; $1,46 \pm 0,37$ ve $0,88 \pm 0,39$ bulunmuştur.

Anyon taşıyıcı inhibitörü NPPB de CBX' e benzer olarak ATP aracılı Lucifer Yellow girişini inhibe etmemekte ancak beklenmedik şekilde büyük oranda arttırmaktadır. NPPB 100, 33 ve 11 μM NPPB' nin ATP aracılı Lucifer Yellow girişini belirgin olarak arttırdığı kinetik ölçümlerden açıkça görülmektedir (şekil-3.2.4.2 üst panel). NPPB varlığında ölçülen ATP aracılı Lucifer Yellow girişi eğrileri altında kalan alan, NPPB 0 koşulunda görülenlere oranlandığında; 100, 33, 11 ve 3,7 μM NPPB için sırasıyla $7; 6,13 \pm 0,85$; $1,26 \pm 0,46$; $0,96 \pm 0,18$ bulunmuştur (şekil-3.2.4.2 alt panel).



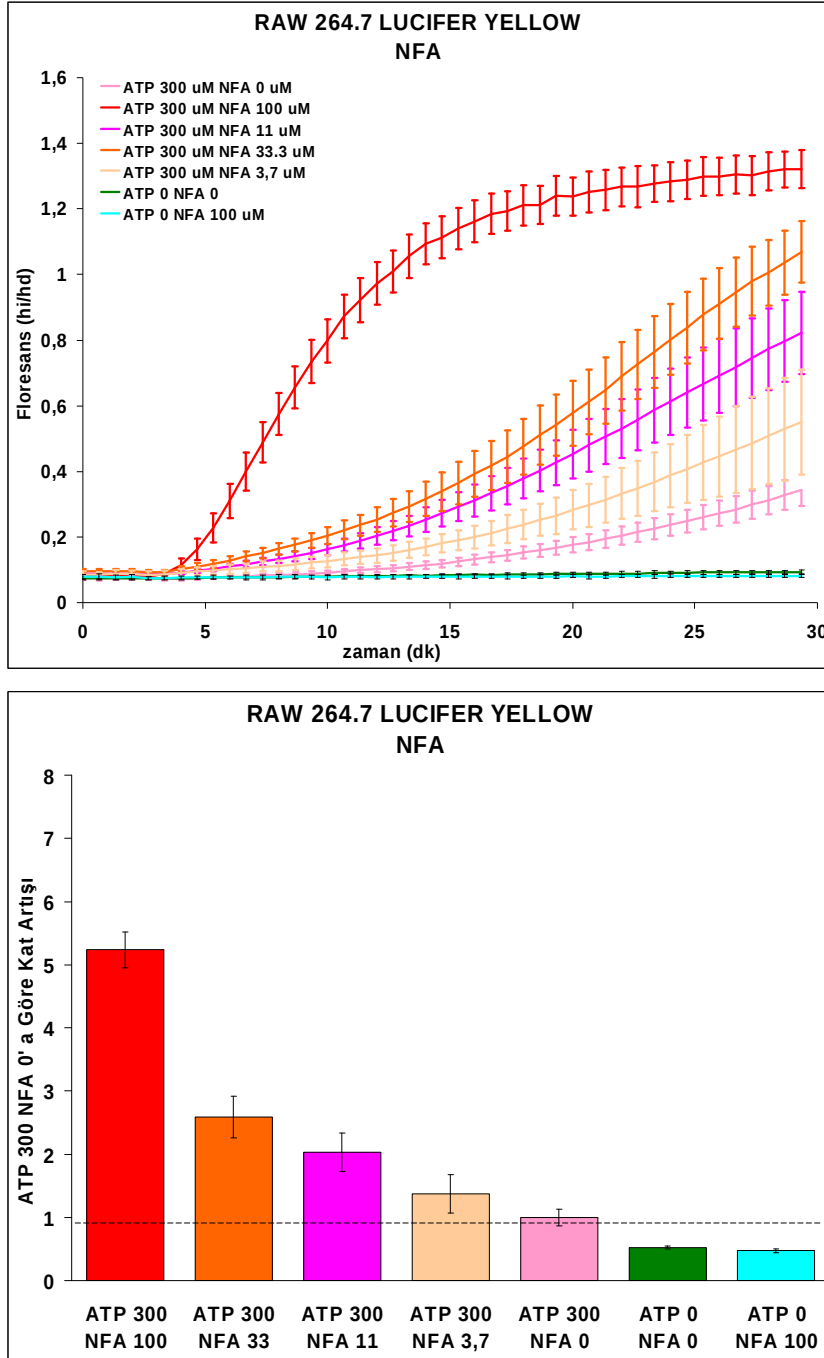
Şekil-3.2.4.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin CBX duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M CBX ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oranlararak (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Alt panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μ M + CBX 0 koşulunda elde edilen alanların ortalamasına göreceli verilmiştir. Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir (ATP 0 CBX 100 deneyi 1 gün yapılmıştır). Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.



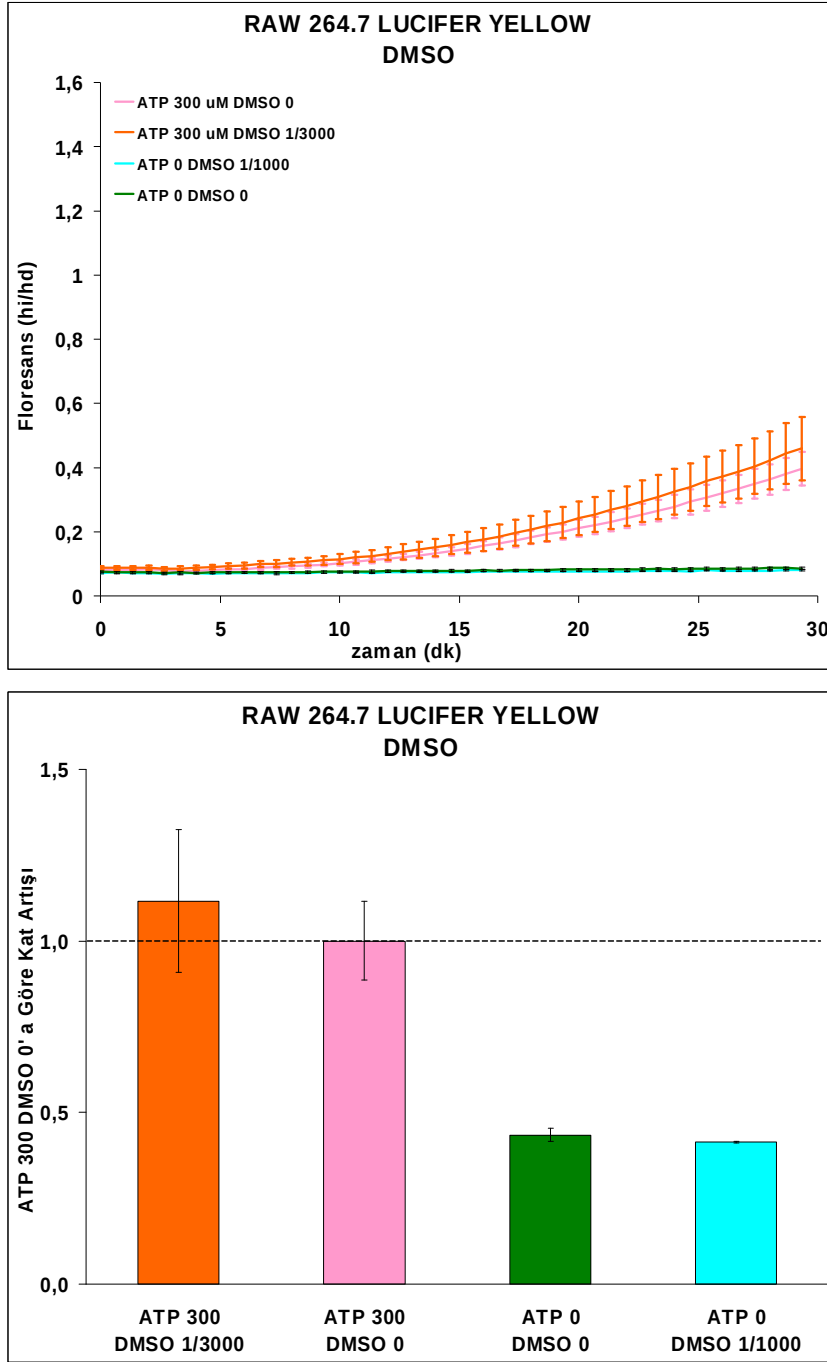
Şekil-3.2.4.2: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin NPPB duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μM NPPB ile 8 dakika 37°C ' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μM) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oranlararak (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Alt panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μM + NPPB 0 koşulunda elde edilen alanların ortalamasına göre kat artışı şeklinde verilmiştir. Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir (ATP 300 μM NPPB 100 μM deneyi 1 gün yapılmıştır). Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Başka bir anyon taşıyıcı inhibitörü NFA de CBX ve NPPB' ye benzer olarak ATP aracılı Lucifer Yellow girişini inhibe etmemekte ancak beklenmedik şekilde ve belirgin olarak arttırmaktadır. Bu çıkarım kinetik ölçümlerden yapılabileceği gibi (şekil-3.2.4.3 üst panel), eğrilerin altında kalan alanların karşılaştırılmasıyla da görülecektir (şekil-3.2.4.3 alt panel). NFA varlığında ölçülen ATP aracılı Lucifer Yellow girişi eğrileri altında kalan alan, NFA 0 koşulunda görülenlere oranlandığında; 100, 33 , 11 ve 3.7 μM NFA için sırasıyla $5,23 \pm 0,29$; $2,59 \pm 0,33$; $2,03 \pm 0,30$; $1,37 \pm 0,30$ ' dir.

Anyon taşıyıcı inhibitörleri olarak bilinen NPPB ve NFA' in ATP aracılı Lucifer Yellow girişini inhibe etmek yerine arttırıcı etkisinin görülmesi akla ilk etapta çözücü etkisini getirmektedir. Çözücü olarak kullanılan DMSO' nun, NFA veya NPPB' nin muhtemel inhibisyon etkisi maskeleyebileceği, bu nedenle inhibisyon yerine aktivasyon görülebileceği şeklinde bir yan etkiyi dışarlamak için, NPPB ve NFA' nın 33 μM kullanımıyla gelen DMSO' ya karşılık bir sulandırmayla (1/3000) DMSO kullanılmış ve benzer bir Lucifer Yellow girişi artışı olup olmadığı incelenmiştir. Ancak 1/3000 DMSO ATP aracılı oluşan Lucifer Yellow girişinde inhibisyon yada arttırma gibi bir etkide bulunmamıştır (şekil-3.2.4.4). Dolayısıyla NFA ve NPPB' nin gösterdiği Lucifer Yellow yanıtlarındaki arttırıcı etki çözücü etkisi değildir.



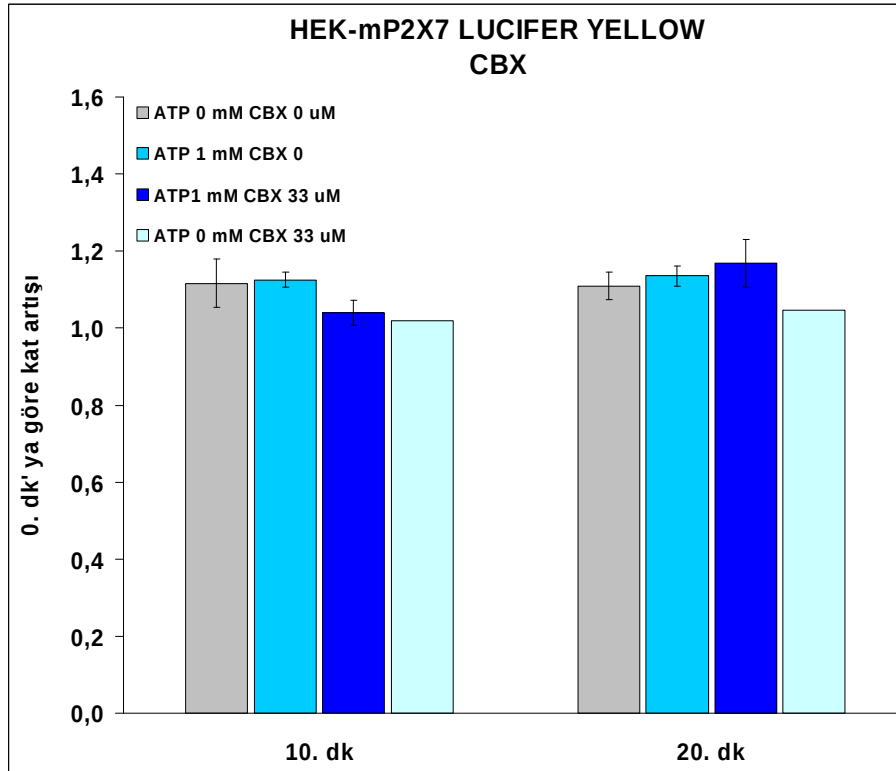
Şekil-3.2.4.3: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin NFA duyarlılığı. RAW 264.7 hücreleri 0, 3,7, 11, 33 ve 100 μ M NFA ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oranlar (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Sol panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μ M NFA 0' ın kat artışı şeklinde verilmiştir (alt panel). Deneyler 4-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.



Şekil-3.2.4.4: RAW 264. hücrelerinde ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinde görülen NPPB ve NFA duyarlılığında taşıyıcı (DMSO) etkisi. RAW 264.7 hücreleri 0, 1/1000, 1/3000 sulandırılmış DMSO ile 8 dakika 37° C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 300 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansa oranlar olarak (hi/hd) zamanla değişim eğrileri elde edilmiştir (üst panel). Alt panelde her bir eğri altında kalan alan, ATP 300 μ M + DMSO 0 koşulunda elde edilen alanların ortalama oranına göre verilmiştir. Veriler 34-197 hücreden elde edilmiştir. Deneyler 2-6 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

3.2.5 CBX' in HEK-mP2X₇ Hücrelerinde Lucifer Yellow Girişine Etkisi.

RAW 264.7 hücrelerinde CBX' in ATP ile oluşan Lucifer Yellow girişinin arttırması, Lucifer Yellow girişinin görülmediği HEK-mP2X₇ hücrelerinde de CBX' nin bu girişi aktive edebilme olasılığını akla getirmiştir. Bunun için ATP uygulanarak 0., 10. ve 20. dakikalarda ölçülen hi/hd oranına, 33 μ M CBX' in etkisi incelenmiştir. Buna göre, 0. dakikaya oranlandığında, CBX 33 μ M uygulanmış ve uygulanmamış koşullar arasında Lucifer Yellow girişi bakımından fark görülmemiştir. Ayrıca CBX 33 μ M' ın ATP' siz herhangi bir etkisi de bulunmamaktadır (şekil-3.2.5.1).

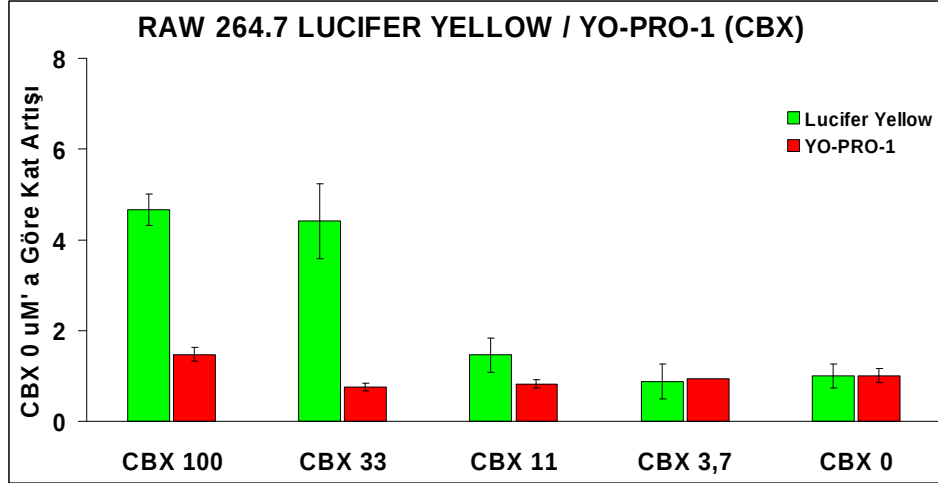


Şekil-3.2.5.1 HEK-mP2X₇ hücrelerinde CBX' in ATP ile Lucifer Yellow aktivasyonu. HEK-mP2X₇ hücreleri 33 μ M CBX ile 8 dakika 37°C' de inkübe edilmiş ve ATP (0 veya 1mM) uygulanarak konfokal mikroskop altında Lucifer Yellow girişi zaman boyunca incelenmiştir. Hücre içi floresans hücre dışı floresansın oranları (hi/hd) 0., 10. ve 20. dakikalar için ölçülmüştür. Veriler her bir uygulama için 0. dakikaya normalize edilmiştir. Deneyler 1-3 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

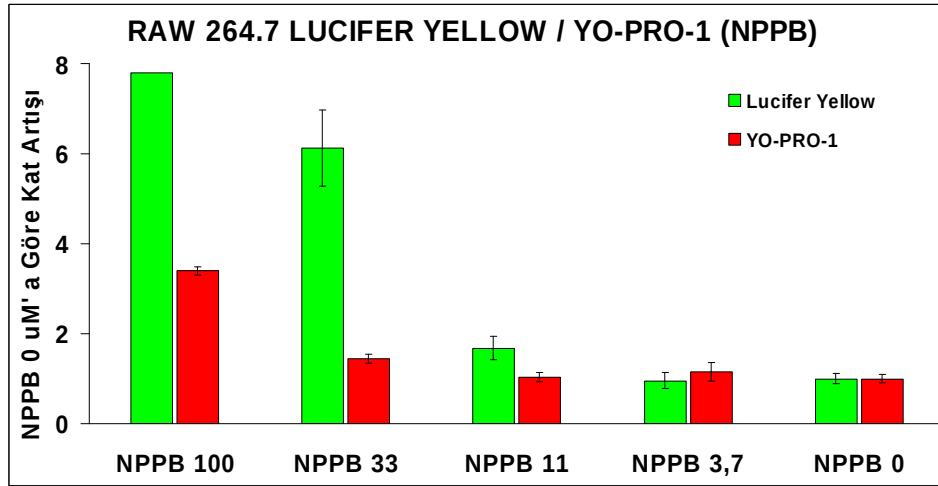
3.2.6 CBX, NPPB ve NFA' nın RAW 264.7 Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow Girişi Arasında Ayırıştırıcılığı

RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişi üzerinde, kısım 3.2.2 ve 3.2.3' de açıklanan CBX, NPPB ve NFA' nın etkileri şekil-3.2.6.1' de özetlenmiştir. Buna göre, CBX, NFA ve NPPB, özellikle 33 μ M derişime kadar RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile aktive olan YO-PRO-1 girişinde pek etkili olmazken, Lucifer Yellow girişini açıkça arttırmıştır. Öyleki, 33 μ M derişimde YO-PRO-1 girişinde bu maddeler tamamen etkisizken, Lucifer Yellow girişi katlarca artmaktadır. Bu maddeler, RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 ile Lucifer Yellow girişinin ayırıştırılmasında önemli bir araç oluşturmaktadır.

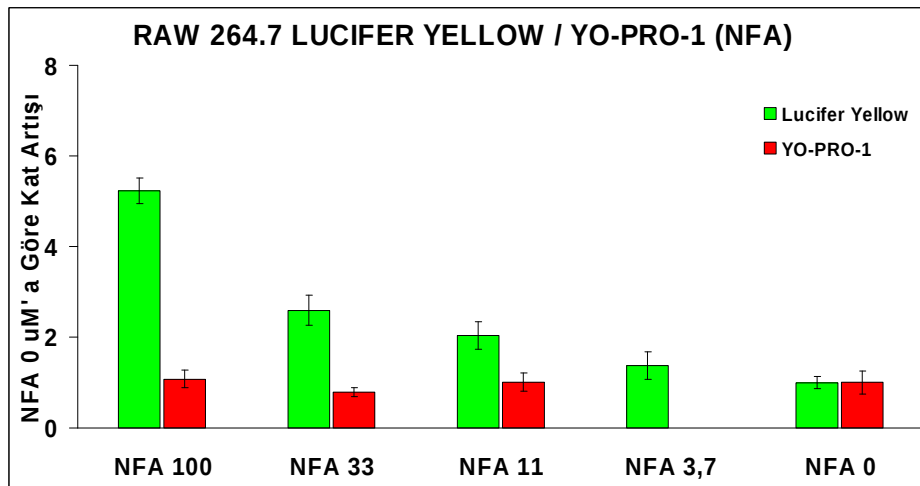
A



B



C

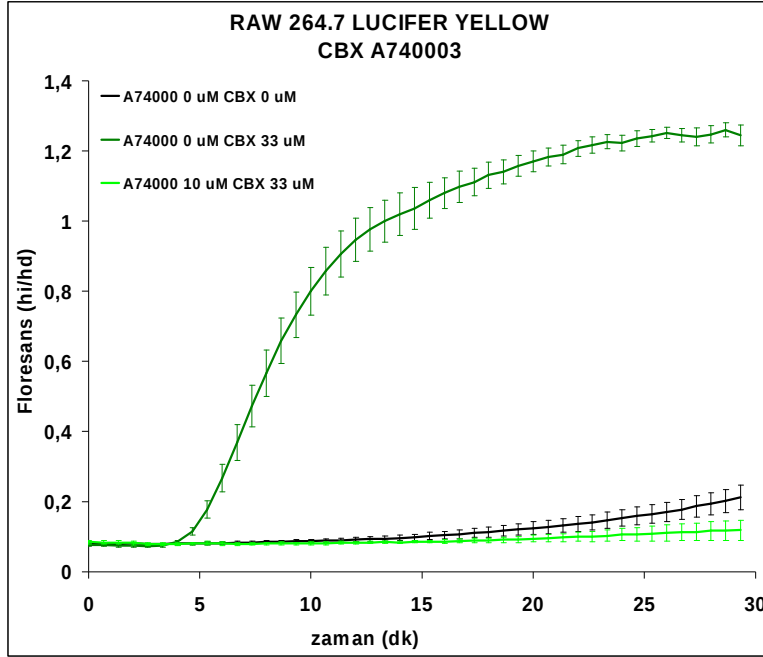


Şekil-3.2.6.1: RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişlerinin CBX, NPPB ve NFA duyarlılığı bakımından ayrışması **(A)** Ayrıntıları kısım 3.2.2 ve kısım 3.2.4' te açıklanarak gerçekleştirilen YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow geçirgenliklerine CBX' in, **(B)** NPPB' nin **(C)** NFA' nın konsantrasyon bağımlı etkisi aynı grafikte gösterilmiştir.

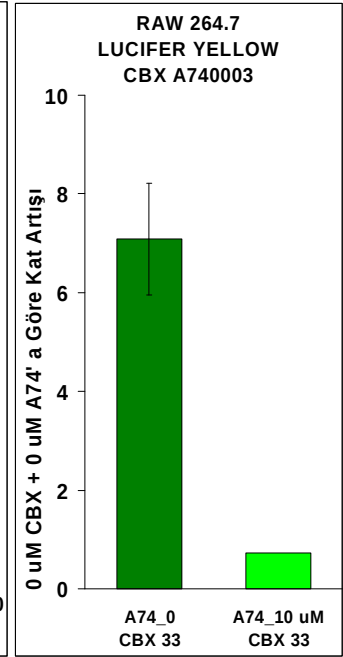
3.2.7 RAW 264.7 Hücrelerinde ATP ile Artan Lucifer Yellow Girişinin Seçici P2X₇ Antagonist Duyarlılığı

RAW 264.7 hücrelerinde görülen ATP aracılı Lucifer Yellow girişi CBX uygulamasıyla artmaktadır (kısım 3.2.3). Burada akla gelen ilk soru, söz konusu boya girişi artışının P2X₇ aracılı olup olmadığıdır. Yani CBX' in yaptığı ATP aracılı Lucifer Yellow girişi artışı acaba P2X₇ reseptörü üzerinden olan bir etki midir, yoksa başka bir ATP reseptörü mü işe karışmaktadır, ya da non spesifik bir ATP CBX etileşmesiyle mi ilgilidir? Bu sorulara cevap vermek amacıyla, söz konusu boya girişindeki artışın seçici P2X₇ antagonisti olan A740003' e duyarlılığı incelenmiştir.

A



B



Şekil-3.2.7.1: RAW 264.7 hücrelerinde CBX ile artan ATP indüklemeli Lucifer Yellow girişinin seçici P2X₇ antagonisti A740003 duyarlılığı. **(A)** RAW 264.7 hücreleri CBX 0, CBX 33 μ M ve CBX 33 μ M+A740003 10 μ M varlığına ayrıntıları "materyal metod" kısmında açıklanan şekilde 8 dakika 37 °C' de inkübe edilmiş ve ATP (100 μ M) uygulanarak konfokal mikroskop altında görüntülenmiştir ve ölçülmüştür. **(B)** A panelinde farklı koşullar için elde edilen hi/hd-zaman eğrilerinin altında kalan alan hesaplanmıştır. Tüm eğrilerin başlangıç değerinin altında kalan sabit alan, bütün eğrilerin altında kalan alanlardan çıkarılarak, 0 μ M CBX+ 0 μ M A740003' e oranlanmıştır. Deneyler 4-5 ayrı gün tekrar edilmiştir. Data ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 33 μM CBX' varlığında oluşan büyük ATP (100 μM) yanıtı, seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 (10 μM) ile tamamen ortadan kalkmaktadır (Şekil-3.2.7.1). Bu sonuç bize CBX in arttırdığı ATP aracılı Lucifer Yellow giriş yanıtının P2X₇ reseptörü aracılı olduğunu düşündürmektedir.

4. TARTIŞMA

P2X₇ reseptörü büyük YO-PRO-1 gibi büyük moleküllere geçirgenliği keşfedildiği ve klonlandığı zamandan bu yana birçok klinik ve laboratuvar araştırmanın ilham kaynağı olmuştur (Surprenant ve ark., 1996). Gerek in vivo gerekse in vitro olarak fonksiyonu araştırılmakta, hastalık modellelerinde ilaç hedefi olarak düşünülmektedir (Honore ve ark., 2006).

P2X₇ reseptörünün aktivasyonu ile oluşan büyük molekül geçirgenliğinin zannedildiğinin aksine seçici olduğu, en az iki ayrı geçirgenlik yolağı aktive ettiği, bu geçirgenlik yolaklarının hücre tipi ve/veya reseptör türüne göre özelliklerinin değiştiğinin gösterilmesi, reseptörün fonksiyonuna dair çalışmalar için önemli bir kilometre taşı olmuştur (Cankurtaran-Sayar ve ark., 2009; Schachter ve ark., 2008)

Cankurtaran-Sayar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, fare makrofajı kökenli bir hücre serisi olan RAW 264.7 hücreleri ve sıçan P2X₇ reseptörünü aşırı ifade eden HEK hücreleri (HEK-rP2X₇) kullanılmıştır. Bu iki hücreden RAW 264.7 hücreleri hem negatif yüklü Lucifer Yellow' a hem de pozitif yüklü YO-PRO-1' e geçirgen iken, HEK-rP2X₇ hücresi ise sadece pozitif yüklü YO-PRO-1' e geçirgen bulunmuştur. Dahası RAW 264.7 hücreleri arasında, her iki geçirgenliği (YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow) gösterenler ve sadece pozitif (YO-PRO-1) geçirgenlik gösterenler olarak 2 ayrı hücre popülasyonu gösterilmiştir. Bu da negatif ve pozitif yüklü madde geçirgenliklerinin ayrı yollarla olduğuna dair kuvvetli bir delil olarak sunulmuştur.

Ancak sözkonusu çalışmada 2 tartışmalı nokta bulunmaktadır: bunlardan birincisi RAW 264.7 hücreleri P2X₇ reseptörü transfekte edilmiş hücreler olmadığı için, ATP uyarısıyla aktive olan geçirgenliğin P2X₇ olduğu kesin değildir. İkincisi ise, RAW 264.7 hücrelerinin fare türü olmasına karşın HEK-rP2X₇ hücrelerindeki reseptörün sıçan türü olmasıdır. Bu durum iki hücre arasındaki geçirgenlik farklarını karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Her ne kadar RAW 264.7 hücre serisi P2X₇ çalışmalarında sıklıkla kullanılıyor ve bu hücrelerde ATP ile aktive olan reseptörün P2X₇ olduğu kabul ediliyorsa da, tez çalışmasında imkanlar ölçüsünde bu reseptörün P2X₇ olduğuna ilişkin farmakolojik deliller bulunmaya çalışılmıştır. Bir diğer önemli

nokta, RAW 264.7 hücrelerinde geçirgenlik özellikleri farklı 2 ayrı popülasyonun varlığıdır. Bu bulguyu açıklamak üzere şöyle bir hipotez kurulmuştur: Pozitif geçirgenlik reseptörün kendisi üzerinden olmaktadır, bu nedenle bütün hücrelerde görülmektedir. Negatif geçirgenlik ise reseptöre yardımcı başka bir protein (veya reseptör üzerinde geçirgenlik değişikliği yapacak fosforilasyon vb. modifikasyonlar) gerektirmektedir ve bu proteinin (veya reseptör üzerinde geçirgenlik değişikliğine yol açacak fosforilasyon vb. modifikasyonu yapacak proteinin) bulunduğu hücrelerde hem negatif hem pozitif geçirgenlik gözlenirken, bu proteinin bulunmadığı hücrelerde sadece pozitif geçirgenlik görülmektedir.

Hem RAW 264.7 hücrelerinde geçirgenlikleri aktive eden reseptörün P2X₇ olup olmadığını hem de geçirgenlikler için reseptörün tek başına yetip yetmediğini test etmek amacıyla RAW 264.7 hücrelerinden klonlanan P2X₇ reseptör DNA'sı HEK-293 hücrelerine transfekte edilmiştir (HEK-mP2X₇). Öncelikle iki hücrede ATP uyarısıyla hangi geçirgenliklerin oluştuğu incelenmiştir. İlginç olarak, RAW 264.7 hücrelerinde negatif (Lucifer Yellow) ve pozitif (YO-PRO-1) geçirgenlik oluşurken, bu hücrelerden klonlanan P2X₇ reseptörünü taşıyan HEK-mP2X₇ hücrelerinde sadece pozitif geçirgenlik gözlenmiştir (şekil-3.1.1.1). Bu durum, RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan geçirgenlik için P2X₇ reseptörünün yetmediği, Lucifer Yellow girişi için yardımcı bir protein veya modifikasyon gerektiği, bu protein veya modifikasyonun ise HEK-mP2X₇ hücrelerinde bulunmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Zaten RAW 264.7 hücreleri arasında Lucifer Yellow almayan hücrelerin varlığı, gözlenen geçirgenlikler için reseptörün tek başına yeterli olmadığı kuşkusunu uyandırmaktadır. Daha sonra RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücrelerinde, bilinen P2X₇ agonistleri BzATP, ATP ve ADP için doz-floresan boya girişi eğrileri elde edilmiş ve karşılaştırılmıştır. BzATP ve ATP 2,5 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılamamıştır çünkü bu agonistler daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıkça yanıt azalmaktadır (şekil: 3.1.2.1 ve Hibell, 2000). YO-PRO-1 için RAW 264.7 hücrelerinden elde edilen agonist etkinlik sırası BzATP > ATP > ADP ve EC₅₀ değerleri, 30 µM > 100 µM > 1 mM (veya daha büyük) olarak tespit edilmiştir (şekil-3.1.2.1A). Lucifer Yellow için BzATP > ATP > ADP ve EC₅₀ değerleri, 50 µM > 100 µM > 1 mM (veya daha büyük) olarak tespit edilmiştir (şekil-3.1.3.1). Bu agonist profili, RAW 264.7 hücrelerinde geçirgenlikten sorumlu reseptörün P2Y reseptörleri olmadığını göstermektedir zira P2Y reseptörleri için hem agonist etkinlik sırası bu şekilde değildir hem de aktivasyonları için bu kadar yüksek agonist konsantrasyonu

gerekmemektedir. Boya girişi aktive ettiği bilinen P2X₂ ve P2X₄ reseptörlerinin agonist etkinlik sırası da, RAW 264.7 hücrelerinden elde edilenle uyumsuzdur. řu halde RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile aktive olarak boya girişi aktive eden reseptörün agonist profili fare P2X₇ reseptörünün agonist profiliyle uyum göstermektedir. Bu profil, kullanılan yöntemin (plaka okuyuculu spektrofiorimetre) bir artefaktı değildir ve konfokal mikroskop ile de teyit edilmiştir. Seçici ve yarışmalı P2X₇ antagonisti A740003' ün RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla oluşan YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişlerini literatürde rapor edilen IC₅₀ değeriyle uyumlu şekilde birkaç µM civarında inhibe ettiği görölmüştür (şekil-3.1.4.1, şekil-3.1.5.1, Donnelly-Roberts, 2009). Yarışmalı bir antagonistten beklendiği gibi daha yüksek agonist kullanılarak elde edilen antagonist IC₅₀ değeri daha yüksektir (300 µM ATP' de ~3 µM, 100 µM ATP'de ~1 µM). A740003' ün P2Y reseptörleri ve P2X₇ hariç P2X reseptör yanıtlarını inhibe etmediği bilinmektedir (Donnelly-Roberts, 2009). Dolayısıyla antagonist profili de, RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile aktive olan reseptörün P2X₇ olduğunu göstermektedir.

Sürpriz olarak, RAW 264.7 hücrelerinden klonlanmış P2X₇ reseptörünü taşıyan HEK-mP2X₇ hücrelerinde YO-PRO-1 için agonist etkinlik profili RAW 264.7 hücrelerinden farklılıklar göstermektedir. Öncelikle ADP, YO-PRO-1 girişi aktive edememektedir. İkinci olarak, BzATP ile ATP doz-yanıt eğrileri birbirlerine yaklaşmışlardır, BzATP' nin etkinliği RAW 264.7' de olduğu kadar ATP' den yüksek değildir (şekil-3.1.1.1B). EC₅₀ değerleri 100 µM (BzATP) > 300 µM (ATP) olarak tespit edilmiştir. Seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 ise YO-PRO-1 girişini beklendiği gibi 1 µM IC₅₀ civarında inhibe etmektedir.

Özetle RAW 264.7 ile HEK-mP2X₇ hücreleri arasında biri fonksiyonel diğeri farmakolojik olmak üzere 2 temel fark gözlenmiştir: 1) HEK-mP2X₇ hücrelerinde Lucifer Yellow girişi görölmemektedir 2) HEK-mP2X₇ hücrelerinde BzATP ile ATP etkinlikleri yakındır ve ADP, HEK-mP2X₇ hücrelerinde YO-PRO-1 girişi aktive edememektedir. Bu durum birkaç şekilde açıklanabilir: 1) RAW 264.7 hücrelerinde P2X₇ ile beraber, agonist ve antagonist profili P2X₇' ye çok benzeyen tanımlanmamış bir reseptör daha bulunmakta ve asıl fonksiyonu bu reseptör görmektedir. Dolayısıyla P2X₇ transfekte HEK-mP2X₇ hücrelerinin agonist profili ile RAW 264.7 hücrelerinin agonist profili farklı olabilir. 2) RAW 264.7 hücrelerinde P2X₇ reseptörünün, farklı özellikte birkaç formu bulunmaktadır. Bu formlardan sadece biri klonlanıp HEK

hücrelerine transfekte edildiğinde, HEK-mP2X₇ ile RAW 264.7 hücreleri arasında fark görülecektir. 1. hipotez, P2X₇ ile tamamen aynı agonist ve antagonist profiline sahip tanımlanmamış bir reseptörü gerektirdiği için akla yatkın görünmemektedir. Buna karşın 2. hipotez biyolojik sistemde karşılaşılabilen bir durumdur ve P2X₇ için rapor edilen bir gözlemdir. Gerçekten de, agonist profili RAW 264.7 hücrelerine benzeyen bir P2X₇ “splice” varyantı (P2X₇k) bulunmaktadır (Nicke ve ark., 2009). Tez çalışmasında RAW 264.7 hücrelerinden P2X₇k değil “tam uzunluk” tabir edilen P2X₇ formu klonlanıp transfekte edilmiştir. Dolayısıyla HEK-mP2X₇ ve RAW 264.7 hücreleri arasındaki agonist profili farkı “splice” varyanttan kaynaklanabilir.

Literatürde hayli geniş yer kaplayan ve tartışmalara yol açan bir diğer konu ise P2X₇ reseptör aktivasyonunda, panneksin-1 adlı gedik-kavşak proteininin gerekliliğidir. Panneksin-1’ in farmakolojik ve moleküler biyolojik olarak inhibe edildiği koşullarda P2X₇ reseptör aracılı boya girişinin ortadan kalktığına dair bulgulara karşın, benzer yöntemler kullanılarak P2X₇ reseptör aracılı boya girişinin panneksin-1 inhibisyonundan etkilenmediğini ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Tez çalışmasının ikinci kısmında, panneksin-1’ in farmakolojik inhibisyonunun P2X₇ reseptör aracılı boya girişine olan etkisi incelenmiştir. RAW 264.7 hücrelerinde P2X₇ reseptörü iki ayrı geçirgenlik yolağı aktive etmektedir. Hem RAW 264.7 hücrelerinde negatif geçirgenlik göstermeyen alt bir hücre popülasyonunun görülmesi, hem de HEK-mP2X₇ hücrelerinde P2X₇ ifade edilmesine rağmen negatif geçirgenliğin görülmemesi, negatif geçirgenlik için reseptör varlığının yetmediği, reseptör dışında ek yardımcı bir proteinin varlığını düşündürmektedir. Panneksin-1 proteini büyük molekülleri geçiren, seçici olmadığı düşünülen bir membran gedik-kavşak proteindir. ve hem HEK-293 hücrelerinde hem de RAW 264.7 hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir (Pelegrin ve Surprenant, 2007). Dolayısıyla, negatif geçirgenliğin oluşmasında reseptör varlığının yetmemesini panneksin-1 ile ilişkilendirerek şöyle bir hipotez ortaya atılabilir: P2X₇ reseptörü sadece pozitif boyaları (YO-PRO-1) geçiriyordur, panneksin-1 ise hem pozitif (YO-PRO-1) hem negatif boyaları (Lucifer Yellow) geçiriyordur ve P2X₇ aracılığıyla aktive olabiliyordur. Dolayısıyla, RAW 264.7 hücrelerinin bazılarında P2X₇ reseptörü panneksin-1 ile çiftlenebildiği için hem pozitif hem negatif geçirgenlik görülürken, bazılarında bu çiftlenim olmadığından sadece P2X₇ üzerinden pozitif geçirgenliği görülüyordur. HEK-mP2X₇ hücrelerinde bu çiftlenim olmadığından sadece pozitif geçirgenlik görülüyordur. Bu hipotezde panneksin-1 yerine anyon taşıyıcıları da düşünülebilir ve negatif geçirgenliğin bu

taşıyıcılar üzerinden olduğu ileri sürülebilir. RAW 264.7 ve HEK-mP2X₇ hücreleri arasındaki geçirgenlik farkını açıklamak üzere kurulan bu hipotezi test etmek amacıyla pannexin-1 inhibitörü olduğu iddia edilen bir ajan olan CBX' in, anyon taşıyıcı inhibitörleri olan NPPB ve NFA' nın YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişi üzerine etkileri incelenmiştir. CBX, NPPB ve NFA' nın göze çarpan ilk etkisi, P2X₇ uyarısıyla hücrelerin lamel tabanından kalkmalarını doz bağımlı olarak ortadan kaldırmaları ve dinamik bleblenmelerini engellemeleridir. Yapısal ve fonksiyonel olarak birbirlerinden hayli farklı bu ajanların morfolojik etkilerinin benzerliği kayda değer bir bulgudur. Bununla beraber CBX, NPPB ve NFA' nın YO-PRO-1 girişine inhibe edici bir etkisi olmadığı gibi , CBX ve NPPB' nin yüksek konsantrasyonlarda arttırıcı etkisi ortaya çıkmıştır. NPPB ve NFA anyon taşıyıcı inhibitörleri oldukları için pozitif yüklü YO-PRO-1 girişini inhibe etmemeleri beklenen bir sonuçtur ancak CBX' in inhibe etmemesi önemli bir bulgudur (şekil-3.2.3.1). Çünkü P2X₇ reseptörünü aşırı ifade eden HEK-293 hücrelerinde 10-20 μ M CBX' in pozitif geçirgenliğe net bir inhibisyon etkisi iddia edilmektedir (Pelegri ve Surprenant, 2006). İlginç olarak CBX, NPPB ve NFA' in Lucifer Yellow girişi üzerine beklenen inhibisyon etkisi görülmemekle beraber, açık bir aktivasyon etkisi görülmüştür. Öyleki; YO-PRO-1 girişine etkilerinin olmadığı konsantrasyonlarda (11 ve 33 μ M) Lucifer Yellow girişini belirgin olarak arttırmaktadırlar (şekil-3.2.3.1 ve şekil-3.2.6.1). Bu etki inhibitörlerin spesifik olmayan kendi etkileri değil, P2X₇ uyarısını gerektiren ve sadece RAW 264.7 hücrelerinde görülen bir etkidir. Zaten kimyasal yapıları ve fonksiyonları birbirinden çok farklı 3 ajanın aynı spesifik olmayan etkiyi göstermesi düşük olasılıklı bir durumdur. Yine de bu arttırıcı etkinin P2X₇ reseptör aracılı olduğunu göstermek amacıyla, seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 duyarlılığı incelenmiş ve antagonistle bu arttırıcı etkinin ortadan kalktığı görülmüştür (şekil-3.2.7.1). Pannexin-1 ve anyon taşıyıcı inhibitörlerinin YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow girişi üzerine etkileri her ne kadar beklendiği gibi olmasa da, iki ayrı geçirgenlik için etkilerinin farklı olması bu geçirgenlik yollarının ayrıştırılmasında son derece yararlı olmuştur. HEK-mP2X₇ hücrelerinde P2X₇ uyarısıyla Lucifer Yellow girişi görülmemesine rağmen tedbiren CBX bu hücrelere de ATP uyarısıyla beraber uygulanmış ancak herhangi bir arttırıcı etki gözlenmemiştir (şekil-3.2.3.1, şekil-3.2.3.2, şekil-3.2.3.3).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1) BzATP, ATP ve ADP ile oluşturulan agonist profili ve seçici P2X₇ reseptör antagonisti A740003 duyarlılığı, RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile aktive olan, YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow geçirgenliğinden sorumlu reseptörün P2X₇ olduğunu ortaya koymuştur.

2) RAW 264.7 hücrelerinden klonlanan P2X₇ reseptörü transfekte edilen HEK-mP2X₇ hücreleri ile RAW 264.7 hücreleri arasında BzATP ile ATP doz-cevap eğrilerinin birbirlerine uzaklığı bakımından fark görülmüştür. Ayrıca ADP RAW 264.7 hücrelerinde YO-PRO-1 girişi sağlarken HEK-mP2X₇ hücrelerinde sağlayamamaktadır. Diğer bir fark da, RAW 264.7 hücrelerinde ATP uyarısıyla görülen Lucifer Yellow girişinin HEK-mP2X₇ hücrelerinde görülmemesidir. Bu durum YO-PRO-1 için reseptörün kendisi yeterli iken, Lucifer Yellow girişi için reseptör varlığının yeterli olmadığını dolayısıyla bu iki geçirgenlik yolağının ayrık iki yolak olduğunu düşündürmektedir.

3) Panneksin-1 ve anyon taşıyıcı inhibitörleri, ATP uyarısıyla hücrelerin aşırı blebilenmesi ve lamel tabanından kalkmalarını hemen hemen tamamen ortadan kaldırmaktadır. Yine bu inhibitörler, YO-PRO-1 girişine 33 ve 11 μ M konsantrasyonlarda etkisiz iken Lucifer Yellow girişinde gözle görülür bir arttırıcı etki yapmaktadırlar. Bu da, YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow geçirgenliklerinin ayrı yolaklar olduğunu göstermektedir. CBX' in Lucifer Yellow geçirgenliğini arttırıcı etkisi spesifik olmayan bir etki değil P2X₇ reseptör aracılı bir etkidir.

4) RAW 264.7 hücrelerinde BzATP' nin ATP' ye göre HEK-mP2X₇ hücreleriyle karşılaştırıldığında çok daha etkin bir agonist olması, RAW 264.7 hücrelerinde ATP ile aktive olan reseptörün yine bir P2X₇ olduğunu ancak splice varyant olduğunu düşündürmektedir çünkü bu agonist profili bu gözlemlerle uyumlu bir P2X₇ splice varyantı (P2X₇k) rapor edilmiştir. Söz konusu splice varyant HEK-293 hücrelerine transfekte edilerek, agonist profili RAW 264.7 ile karşılaştırılabilir.

ÖZET

P2X Reseptörlerinin Aktive Ettiği Membran Geçirgenliğinde Seçiciliğinin, Tür Farklarının Ve Gedik-Kavşak Proteinlerinin Rolünün İncelenmesi

P2X₇, küçük katyonlara geçirgen bir iyon kanalı olan P2X reseptör ailesinin 7 üyesinden biridir. P2X₇ reseptörlerinin aktivasyonu hücre membranının 800 Da' a kadar olan büyük moleküllere geçirgen hale gelmesine yol açmaktadır ve bu bakımdan diğer P2X reseptörlerinden farklılık göstermektedir. P2X₇ reseptörlerinin bu özelliği çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Membran geçirgenliğindeki bu artışın seçici olduğu ve hücre tipine göre bu seçiciliğin değiştiği gösterilmiştir. Bu geçirgenliğin panneksin-1 adlı gedik-kavşak proteini aracılığıyla olduğu iddia edilmektedir. Panneksin-1 bir membran proteindir ve 1 kDa'a kadar olan molekülleri geçirebilmektedir. Hücre içi [Ca²⁺] artışı, membran depolarizasyonu ve mekanik stres gibi durumlarda aktive olabilmektedir.

Bu tezde, RAW 264.7 hücreleri ile bu hücrelerden klonlanan P2X₇ reseptörünü ifade eden HEK-mP2X₇ hücreleri kullanılmıştır. RAW 264.7 hücrelerinde endojen olarak ATP uyarısıyla aktive olan geçirgenlik yanıtının P2X₇ aracılı olup olmadığını ve geçirgenlikteki artış için reseptörün yeterli olup olmadığını test etmek için bu yöntem düşünülmüştür. Öncelikle bu iki hücre arasında geçirgenlik farkı görülmüştür. ATP uyarısıyla RAW 264.7 hücreleri hem pozitif yüklü YO-PRO-1' i hem negatif yüklü Lucifer Yellow' u geçirmektedir. HEK-mP2X₇ hücreleri ise sadece pozitif yüklü YO-PRO-1'i geçirmektedir. İkinci olarak, hücreler arasında agonist etkinlikleri farklı bulunmuştur. Dolayısıyla, Lucifer Yellow girişi için P2X₇ reseptörünün kendisi yetmemekte yardımcı bir proteine ihtiyaç duymaktadır.

Diğer yandan, panneksin-1 ve anyon taşıyıcı inhibitörleri YO-PRO-1 girişini etkilemediği dozlarda, Lucifer Yellow girişini açıkça arttırmaktadır. Tek başına reseptör ekspresyonunun Lucifer Yellow geçirgenliği için yetersizliği ve geçirgenlik yollarının inhibitörlerden farklı şekilde etkilenmeleri, Lucifer Yellow ve YO-PRO-1 girişinin farklı geçirgenlik yolları ile olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: P2X reseptörleri, membran geçirgenliği, floresan mikroskopisi, gedik-kavşak, RAW 264.7

SUMMARY

Investigation Of The Role Of Selectivity, Species Difference And Gap-Junction Proteins In P2X-Activated Membrane Permeability

P2X₇ is one of the seven members of P2X receptor family which is permeable to small cations. It activates a permeability to large molecules up to 800 Da and in this respect differs from other P2X receptors. This property of P2X₇ receptors has been a subject of many investigations. It is showed that this increase in permeability is selective and the selectivity depends on the cell type. It is claimed that this permeability occurs via a gap-junction protein called pannexin-1. Pannexin-1 is a membrane protein and permeable to large molecules up to 1 kDa. It is activated by increase in intracellular [Ca²⁺]_i, membrane depolarization, and mechanical stress.

In this thesis, RAW 264.7 cells and HEK-mP2X₇ cells expressing P2X₇ receptor cloned from RAW 264.7 cells were used. This method were thought to test whether the permeability response endogenously activated by ATP in RAW 264.7 cells occurs via P2X₇ or not and to test whether P2X₇ receptor is sufficient to large permeability or not. Firstly, a permeability difference has been seen between these cells. RAW 264.7 cells uptake both positively charged YO-PRO-1 and negatively charged Lucifer Yellow. HEK-mP2X₇ cells uptake only positively charged YO-PRO-1. Secondly, agonist potency differences between cells have been found. Therefore, P2X₇ receptor per se is not sufficient to uptake Lucifer Yellow and it needs an accessory protein.

On the other hand, inhibitors of pannexin-1 and anion transporters clearly enhanced Lucifer Yellow uptake at concentrations that they did not effect YO-PRO-1 uptake. Insufficiency of receptor expression to activate Lucifer Yellow permeability and differential effects of inhibitors on permeability pathways showed that Lucifer Yellow and YO-PRO-1 uptake were different permeability pathways.

Key words: P2X receptors, membrane permeability, fluorescence microscopy, gap-junctions, RAW 264.7

KAYNAKLAR

- ADINOLFI, E; CIRILO, M; WOLTERSDORF, R; FALZONI, S; CHIOZZI, P; PELLEGATTI, P; CALLEGARI, MG; SANDONÀ, D; MARKWARDT, F; SCHMALZING, G; DI VIRGILIO, F. (2010). Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J.* **24(9)**:3393-404.
- ALBERTO, A. V; FARIA, R. X; COUTO, C. G; FERREIRA, LG; SOUZA, C. A; TEIXEIRA, P. C; FRÓES, M. M; ALVES, LA. (2013). Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **386(9)**:775-87.
- ALVES, L. A; BEZERRA, R. J; FARIA, R. X; FERREIRA, L. G; DA SILVA FRUTUOSO, V. (2013). Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain. *Molecules.* **18(9)**:10953-72
- ANTONIO, L; STEWART, A. P; VARANDA, W. A; EDWARDSON, J. M. (2014). Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS Lett.* **588(12)**:2125-8
- BHASKARACHARYA, A; DAO-UNG, P; JALILIAN, I; SPILDREJORDE, M; SKARRATT, K. K; FULLER, SJ; SLUYTER, R; STOKE, S L. (2014). Probenecid blocks human P2X7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. *PLoS One.* **9(3)**:e93058.
- BURNSTOCK, G. (2013a) Introduction and perspective, historical note. *Front Cell Neurosci.* **21**:7:227
- BURNSTOCK, G. (2013b) Purinergic mechanisms and pain--an update. *Eur J Pharmacol.* **15**;716(1-3):24-40.
- CANKURTARAN-SAYAR, S; SAYAR, K; UGUR, M. (2009). P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol.* **76(6)**:1323-32.
- CHESSELL, I. P; SIMON, J; HIBELL, A. D; MICHEL, A. D; BARNARD, E. A; HUMPHREY, P. P. (1998). Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett.* **13**;439(1-2):26-30.
- CHIU, Y. H; RAVICHANDRAN, K. S; BAYLISS, D. A. (2014). Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel. *Channels (Austin).* **8(2)**:103-9.
- CODDOU, C; YAN, Z; OBSIL, T; HUIDOBRO-TORO, JP; STOJILKOVIĆ, SS. (2011a). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev.* **63(3)**:641-83.

- CODDOU, C; STOJILKOVIC, S. S; HUIDOBRO-TORO, J. P. (2011b). Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci*. **22(3)**:335-54.
- DONNELLY-ROBERTS, D. L; NAMOVIC, M. T; HAN, P; JARVIS, M. F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol*. **157(7)**:1203-14.
- DONNELLY-ROBERTS, D. L; NAMOVIC, M. T; SURBER, B; VAIDYANATHAN, S. X; PEREZ-MEDRANO, A; WANG, Y; CARROLL, W. A.; JARVIS, M. F. (2009). [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*. **56(1)**:223-9.
- FRANCESCHINI, A; ADINOLFI, E. (2014). P2X receptors: New players in cancer pain. *World J Biol Chem*. **26;5(4)**:429-36.
- GUO, C; MASIN, M; QURESHI, O. S; MURRELL-LAGNADO, R. D. (2007). Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol*. **72(6)**:1447-56
- HIBELL, A. D; KIDD, E. J; CHESSELL, I. P; HUMPHREY, P. P; MICHEL, A. D. (2000). Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors. *Br J Pharmacol*. **130(1)**:167-73.
- HONORE, P; DONNELLY-ROBERTS, D; NAMOVIC, M. T; HSIEH, G; ZHU, C. Z; MIKUSA, J. P; HERNANDEZ, G; ZHONG, C; GAUVÍN, D. M; CHANDRAN, P; HARRIS, R; MEDRANO, A. P; CARROLL, W; MARSH, K; SULLIVAN, J. P; FALTYNEK, C. R; JARVIS M.F. (2006). A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino)2,2dimethylpropyl)2(3,4dimethoxyphenyl)acet amide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. **319(3)**:1376-85.
- JIANG, L. H; RASSENDREN, F; MACKENZIE, A; ZHANG, Y. H; SURPRENANT, A; NORTH, R. A. (2005). N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. **289(5)**:C1295-302.
- JIANG, L. H. (2009). Inhibition of P2X(7) receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J*. **38(3)**:339-46
- KACZMAREK-HÁJEK, K; LÖRINCZI, E; HAUSMANN, R; NICKE, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal*. **8(3)**:375-417.
- MACKENZIE, A. B; YOUNG, M. T; ADINOLFI, E; SURPRENANT, A. (2005). Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem*. **280(40)**:33968-76.
- MARQUES-DA-SILVA, C; CHAVES, M. M; RODRIGUES, J. C; CORTE-REAL, S; COUTÍNHO-SILVA, R; PERSECHINI, P. M. (2011). Differential modulation

of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*. **6(9)**:e25356

MURRELL-LAGNADO, R. D; QURESHI, O. S. (2008). Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors. *Mol Membr Biol*. **25(4)**:321-31.

NICKE, A; KUAN, Y. H; MASIN, M; RETTINGER, J; MARQUEZ-KLAKA, B; BENDER, O; GÓRECKI, D. C; MURRELL-LAGNADO, R. D; SOTO, F. (2009). A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem*. **284(38)**:25813-22.

NORTH, R. A; SURPRENANT, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **40**:563-80

NORTH, R. A; JARVIS M. F. (2013). P2X receptors as drug targets. *Mol Pharmacol*. **83(4)**:759-69

PELEGRIN, P (2011). Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br J Pharmacol*. **163(5)**:908-11.

PELEGRIN, P; SURPRENANT, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*. **25(21)**:5071-82.

PELEGRIN, P; SURPRENANT, A. (2007). Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1 β release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem*. **282(4)**:2386-94.

ROBINSON, L. E; MURRELL-LAGNADO, R. D. (2013). The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci*. **22**;7:233.

PENUELA, S.; GEHI, R; LAIRD, D.W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta*. **1828(1)**:15-22

ROBINSON, L. E; SHRIDAR, M; SMITH, P; MURRELL-LAGNADO R. D. (2014). Plasma Membrane Cholesterol as a Regulator of Human and Rodent P2X7 Receptor Activation and Sensitization. *J Biol Chem*. **289(46)**:31983-94.

SAMWAYS, D. S; LI, Z; EGAN, T. M. (2014). Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci*. 1-18.

SAUL, A; HAUSMANN, R; KLESS, A; NICKE, A. (2013) Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci*. **18**;7:250.

SCHACHTER, J; MOTTA, A. P; DE SOUZA ZAMORANO, A; DA SILVA-SOUZA, H. A; GUÍMARÃES, M. Z; PERSECHINI, P. M. (2008). ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci*. **121(Pt 19)**:3261-70.

- STEINBERG, T. H; NEWMAN, A. S; SWANSON, J. A; SILVERSTEIN, S. C. (1987a). Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol.* **105(6 Pt 1)**:2695-702.
- STEINBERG, T. H; NEWMAN, A. S; SWANSON, J. A; SILVERSTEIN, S. C. (1987b). ATP4⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem.* **25;262(18)**:8884-8.
- SURPRENANT, A; RASSENDREN, F; KAWASHIMA, E; NORTH, R. A; BUELL, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* **272(5262)**:735-8.
- VERHOEF, P. A; ESTACION, M; SCHILLING, W; DUBYAK, G. R. (2003). P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol.* **170(11)**:5728-38.
- VIRGINIO, C; CHURCH, D; NORTH, R. A; SURPRENANT, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology.* **36(9)**:1285-94.
- YAN, Z; LI, S; LIANG, Z; TOMIĆ, M; STOJILKOVIC, S. S. (2008). The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol.* **132(5)**:563-73.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Şerife

Soyadı: CANKURTARAN SAYAR

Doğum yeri, tarihi: Ankara, 06-10-1979

Uyruğu: T.C

Medeni durumu: Evli

İletişim: 0 312 595 81 72

0 530 467 57 80

e-mail: serife.cankurtaran@medicine.ankara.edu.tr

Eğitimi:

Doktora: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AbD

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AbD, 2005-2008

Lisans: Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik, 1997-2002

Lise: Altındağ Uluğbey Lisesi

İlköğretim: Abdullah Tokur İlköğretim Okulu

Yabancı dili: İngilizce

Ünvanı: Bilim uzmanı, 2008

Mesleki deneyimi: Hücre/membran biyofiziği, spektroskopi (floresans mikroskopisi, konfokal mikroskop, spektroskopik ölçümler)

Bilimsel ilgi alanları:

Yayın(lar):

1- P2X7 Receptor Activates Multiple Selective Dye-Permeation Pathways in RAW 264.7 and Human Embryonic Kidney 293 Cells

By: Cankurtaran-Sayar, Serife; Sayar, Kemal; Ugur, Mehmet, MOLECULAR

PHARMACOLOGY Volume: 76 Issue: 6 Pages: 1323-1332 Published: DEC 2009

Bildiriler:

1- Stimulation of P2X7 receptors activates multiple permeability pathways with different selectivities in HEK-293 and RAW 264.7 cells

By:Cankurtaran-Sayar, S; Sayar, K ; Ugur, M

FUNDAMENTAL & CLINICAL PHARMACOLOGY, Volume: 22, Pages: 63-63, Supplement: 2, Published: AUG 2008

2- Effects of carbenoxolone, niflumic acid, NPPB and probenecid on P2X7 mediated YOPRO-1 and lucifer yellow influx in RAW 264.7 and mouse P2X7 transfected HEK 293 cells

By: Sayar, Kemal; Cankurtaran-Sayar, Serife; Ugur, Mehmet, PURINERGIC SIGNALLING Volume: 10 Issue: 4 Pages: 760-760 Meeting Abstract: C033 Published: DEC 2014

Bilimsel etkinlikleri:

- 1- Hücresel Yapışmanın G-Proteinine Kenetli Reseptör Aracılı Sinyal İletimi Üzerindeki Modülatör Etkisinin Olası Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması, 2009-2011 TUBITAK 1001, 108 S 344, bursiyer (bu proje doktora tezinden yapılmamıştır)
- 2- P2X₇ Reseptör Aktivasyonu ile Oluşan Membran Geçirgenliğinin Karakterizasyonu, Gedik-Kavşak ve Taşıyıcı Proteinleriyle İlişkisinin İncelenmesi, 2013-2015, TUBITAK 1001, 112 S 615, bursiyer (bu proje doktora tezinden yapılmıştır)