



**Anormal Çalışan Yarım Kanalların Oluşmasına Yol
Açan Cx26 Mutasyonları Epidermisteki
Keratinosidlerin Kalsiyum İyon Dengesini
Değiştirerek Bu Hücrelerin Farklılaşma
Mekanizmalarını Etkiler**

Program Kodu: 3501

Proje No: 210T035

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Gülistan Meşe Özçivici

Bursiyer(ler):
Velsel Bay
Hande Aypek

OCAK 2014
İZMİR



ÖNSÖZ

Bu projede keratitis-ichthyosis-deafness (KID) sendromuna neden olan connexin26 mutasyonlarından I30N, D50A, D50Y ve A88V'nin protein biyosentez mekanizmalarına, Cx26 yarım kanal fonksiyonuna ve hücrelerdeki kalsiyum sinyallerine olan etkileri araştırılmıştır. Bunun sonucunda, temel olarak, belirtilen mutasyonların hücrelerde aktif yarım kanallar oluşturdukları ve hücre içindeki kalsiyum miktarlarında artışlara neden olduğu gözlenmiştir.

Proje çalışmaları esnasında kullanılan vektörler için Stony Brook Üniversitesi'nden Prof. Dr. Thomas White'a, proje süresince kullanılan teknikler, analizler ve karşılaşılan problemler konusunda bizlere yardımcı olan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Özden Yalçın Özuysal ve Makine Mühendisliği Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Engin Özçivici'ye teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi (BIOMER) personeline bazı deneylerde verdikleri teknik destekten dolayı teşekkür ederiz.

Bu proje TÜBİTAK Kimya ve Biyoloji Araştırma Destek Grubu tarafından desteklenmiş ve Yrd. Doç. Dr. Gülistan Meşe Özçivici yürütücülüğünde tamamlanmıştır.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 Hücreler arası iletişim ve connexin'ler	2
2.2 Yarım kanalların fonksiyonları	4
2.3 Sağırlığa neden olan Cx26 mutasyonları.....	5
2.4 Epidermis ve epidermal connexin'ler	6
2.5 Sendromik sağırlığa neden olan Cx26 mutasyonları	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
3.1 Mutasyonların oluşturulması ve farklı ekspresyon vektörlerine klonlanması	9
3.2 Hücre kültürü	10
3.3 Actin-Cx26 immunohistokimyasal boyaması	11
3.4 İkili Immunohistokimyasal Analizler	11
3.5 Western Blot analizleri	12
3.5.1 Protein İzolasyonu	12
3.5.2 Western blot protokolü.....	13
3.6 mRNA ifade analizleri	13
3.7 Hücre içine floresan boya alım analizleri	14
3.8 Hücre dışına ATP salım analizleri.....	15
3.9 Hücre içi kalsiyum miktarının tayini.....	15

4. BULGULAR	16
4.1 KID sendromu mutasyonlarının oluşturulması	16
4.1.1 Cx26G11E (32G>A) mutasyon sonuçları	16
4.1.2 Cx26I30N (89T>A) mutasyon sonuçları.....	17
4.1.3 Cx26D50A (149A>C) mutasyon sonuçları.....	17
4.1.4 Cx26D50Y (148G>T) mutasyon sonuçları.....	18
4.1.5 Cx26A88V (263C>T) mutasyon sonuçları	18
4.2 Mutasyonların Cx26'nın hücre içindeki lokalizasyonlarına olan etkileri	19
4.3 Mutasyonların Cx26'nın ifade edilmesine etkileri.....	20
4.4 KID sendromu mutasyonlarının Cx26 protein biyosentez yolağına olan etkileri.....	21
4.5 KID sendromu mutasyonlarının yarım kanal yapma potansiyelleri	23
4.6 Cx26 mutasyonlarının hücrelerden hücre dışına ATP salınımlarına etkisi	26
4.7 Cx26 KID sendromu mutasyonlarının hücrelerdeki kalsiyum miktarlarına etkisi	26
4.8 Cx26 KID sendromu mutasyonlarının keratinosidler üzerindeki etkileri.....	28
4.8.1 Cx26 mutasyonlarının keratinosidlerde protein biyosentezine olan etkileri	28
4.8.2 KID sendromu mutasyonlarının keratinosid farklılaşma belirteçlerine etkileri.....	29
4.8.3 Mutasyonların keratinosidler hücre dışına ATP salınımlarına etkileri	29
4.8.4 Mutasyonların keratinosidler hücrelerdeki kalsiyum miktarlarına etkileri	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6. KAYNAKLAR.....	35



TÜBİTAK

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Connexin ve oluklu bağlantıların organizasyonu.	3
Şekil 2. PCR-güdümlü mutagenesis yöntemiyle mutasyonların oluşturulması	10
Şekil 3 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26G11E sekansının karşılaştırılması.....	16
Şekil 4 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26I30N sekansının karşılaştırılması.	17
Şekil 5 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26D50A sekansının karşılaştırılması.....	17
Şekil 6 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26D50Y sekansının karşılaştırılması.....	18
Şekil 7 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26A88V sekansının karşılaştırılması.	18
Şekil 8 Mutasyonların Cx26 protein lokalizasyonuna etkileri.....	19
Şekil 9. Mutasyonların Cx26 protein ve mRNA sentezine olan etkileri.....	20
Şekil 10. Cx26 mutasyonlarının ER stres belirteçlerinden BiP protein sentezine etkileri.	21
Şekil 11. Cx26 ve ER belirteci BiP protein lokalizasyonları.....	22
Şekil 12. Cx26 ve Golgi aparatı belirteci Golgin97 lokalizasyonu.	23
Şekil 13. Neurobiotin boya alım analizleri.	24
Şekil 14. Ethidium bromide alım analizleri.....	25
Şekil 15. N2A hücrelerinden hücre dışına ATP salınım miktarları.....	26
Şekil 16. Hücre içindeki kalsiyum miktarlarının ve hücre boyutlarının karşılaştırılması.....	27
Şekil 17. Cx26 mutasyonlarının ER stres belirteçlerinden BiP protein sentezine etkileri.	28
Şekil 18. Mutasyonların HaCaT farklılaşmasına etkileri.....	29
Şekil 19. HaCaT hücrelerinden hücre dışına ATP salınım miktarları.	30
Şekil 20. Hücre içindeki kalsiyum miktarlarının ve hücre boyutlarının karşılaştırılması.....	31



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. PCR güdümlü mutagenesisle mutasyonların oluşturulması için kullanılan primerler .9

Tablo 2 RT-PCR'da kullanılan primer listesi..... 14

Connexin'lerin oluşturduğu gap junction'lar ve yarım kanallar insan vücudundaki deri gibi birçok doku ve organın normal olarak faaliyetlerini devam ettirmesinde önemli görevler üstlenirler. Connexin26 mutasyonları hem sendromik olmayan sağırlığa hem de keratitis-ichthyosis-deafness (KID) sendromu gibi deri hastalıklarıyla bağlantılı sendromik sağırlığa neden olmaktadır. Sendromik sağırlığa neden olan mutasyonlar Cx26'nın yeni fonksiyonlar kazanmasına neden olmakta bunun da epidermal hücrelerin fizyolojisini nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir. Bu projede, KID sendromuna neden olduğu gösterilmiş Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının, gap junction iletişimi bulunmayan N2A ve HeLa hücreleriyle, iletişim bulunan HaCaT insan keratinosid hücrelerinde Western blot ile proteinin yapısına, immunohistokimyasal yöntemlerle protein lokalizasyonuna, floresan boya alım deneyleriyle yarım kanal fonksiyonlarına, hücre dışındaki ATP miktarının belirlenmesiyle kanallardan hücre dışına molekül salınım kapasitelerine ve Fluo-3AM boyası ve akış sitometresiyle de kalsiyum sinyallerine olan etkileri araştırılmıştır. Buna göre mutasyonların, Cx26 protein üretimini etkilemediği fakat mutant proteinlerin daha çok hücre içinde biriktikleri ve hücre zarında gap junction plakaları oluşturmadıkları gözlenmiştir. Ayrıca hücre içinde biriken diğer mutasyonlardan farklı olarak, Cx26I30N mutasyonunun hücre içinde çoğunlukla Golgi aygıtında biriktiği gözlenmiştir. Mutant Cx26 proteinleri bulunan hücrelerin Cx26WT bulduran hücrelere oranla daha çok neurobiotin ve ethidium bromide alımına neden oldukları gözlenmiştir. Mutasyonların hem N2A hem de HaCaT hücrelerinde hücre dışına ATP salınım miktarlarına bir etkisi olmadığı, buna karşılık her iki hücre tipinde hücre içindeki kalsiyum miktarında WTCx26'a göre 1,3 ile 2,4 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının diğer KID sendromu mutasyonları gibi hücrelerde sürekli aktif olan yarım kanallar yaptıkları ve hücrelerdeki kalsiyum mekanizmalarını etkiledikleri gözlenmiştir. Cx26 mutasyonları epidermiste sürekli açık bulunan yarım kanallar oluşturarak, hücre dışına saldıkları moleküllerle kalsiyum sinyallerini otokrin/parakrin sinyallerle etkileyerek keratinosidlerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarında değişimlere yol açabilirler. Bu şekilde, KID sendromu hastalarında gözlenen fenotiplerden biri olan epidermin normalden fazla kalınlaşmasına neden olabilir.

Anahtar kelimeler: Connexin26, oluklu bağlantılar, yarım kanallar, epidermis, keratitis-ichthyosis-deafness (KID) sendromu, keratinosidler, kalsiyum regülasyonu



ABSTRACT

Hemichannels and gap junctions, formed from connexins, play important roles in functioning of many tissues and organs including the epidermis. Connexin26 mutations cause both non-syndromic and syndromic deafness with skin disorders including keratitis-ichthyosis-deafness syndrome (KIDS). Mutations of syndromic deafness cause Cx26 to acquire new functions and it is not exactly known how these changes affect the function and physiology of epidermal keratinocytes. Here, we examined the effect of Cx26 mutations associated with KIDS in both communication-deficient cell lines, N2A and HeLa, and human keratinocytes, HaCaT. We studied the effect of mutation on protein levels by Western blot analysis, protein localization by immunostaining, hemichannel function by fluorescent dye uptake and ATP release assays and intracellular calcium signals by Fluo-3AM dye and flow cytometer analysis. Based on these, mutations did not affect the protein levels in transfected cells but the localization of mutant proteins were altered where they were not able to form gap junction plaques at cell-to-cell junctions. Besides, the Cx26I30N mutation caused protein to accumulate in Golgi apparatus in contrast to other mutations. Further, the uptake of neurobiotin and ethidium bromide into the cell was more in cells with mutant proteins compared to cells expressing Cx26WT but there was no statistically significant difference in the amount of ATP released into the medium among groups in both N2A and HaCaT cells. However, the cells expressing mutant proteins had 1.3-2.4 fold increase in intracellular calcium level compared to cells with Cx26WT. In conclusion, similar to other KID syndrome mutations, Cx26I30N, D50A, D50Y and A88V formed active hemichannels in transfected cells and also interfered with the intracellular calcium signals, leading to an increase in calcium. Therefore, by forming active hemichannels and releasing molecules into the extracellular environment that may influence cells through autocrine and paracrine signals, Cx26 mutations might affect the proliferation and differentiation mechanisms of keratinocytes. This way, they might result in the development of epidermal phenotypes observed in KID syndrome patients.

Key words: Connexin26, gap junctions, hemichannels, epidermis, keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome, keratinocyte, calcium regulation



1. GİRİŞ

Connexin'lerin oluşturduğu yarım kanallar ve oluklu bağlantılar vücudtaki bir çok organın homeostasisinin kontrol edilmesinde önemli görevler üstlenirler. Gap junction kanallarıyla hücreler arasında iyonların (Na^+ , K^+), küçük metabolitlerin (glucose, glutamate) ve ikincil ulakların (ATP, IP_3 , Ca^{2+}) geçişini sağlayarak ve connexonlar/yarım kanallar vasıtasıyla da hücre dışına ATP ve NAD^+ gibi molekülleri salarak parakrin sinyallerle hücre büyümesi, gelişimi ve farklılaşması gibi farklı bir çok hücresele olayı kontrol ederler (Kanno ve Loewenstein, 1964; Lawrence vd., 1978; White ve Paul, 1999; Vinken vd., 2006). Mesela, oluklu bağlantıların, hem kalsiyum iyonlarının hem de IP_3 gibi ikincil ulakların hücreler tarafından paylaşılmasını sağlayarak dokularda kalsiyum sinyallerinin aktivasyonuna neden oldukları öngörülmektedir. Bunun yanında connexon'lar vasıtasıyla hücre dışına salınan ATP gibi sinyal moleküllerinin de parakrin ve otokrin sinyallerle hücre içine kalsiyum alımını sağladığı gösterilmiştir. Bu şekilde, connexin'lerin iki farklı mekanizmayla hücre içindeki kalsiyum miktarlarını kontrol edebilecekleri vurgulanmıştır (Beltramello vd., 2005; Bruzzone ve Cohen-Salmon, 2005).

İnsan vücudunun en büyük organı olan deri, vücudu fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı korumasının yanında mikropların girişine karşı bariyer olarak çalışır. Epidermisin dört farklı katmanında değişik farklılaşma düzeylerine sahip hücreler bulunmaktadır. Bir çok molekül ve sinyal yolağının yanı sıra, connexin'ler ve Ca^{2+} metabolizması keratinosidlerin çoğalmalarını ve farklılaşmalarını düzenleyerek epidermis homeostasisinin devam ettirilmesini sağlayan etmenler arasında bulunmaktadır (Blanpain ve Fuchs, 2006; Dinkova-Kostova vd., 2007). Bu bileşenlerde meydana gelebilecek herhangi bir problem üst derinin yapısını etkileyerek deride anormalliklere veya hastalıklara neden olmaktadır (Pani ve Singh, 2008; Tsutsumi vd., 2009).

Connexin'lerin hücreler ve dokular için önemi bu gen ailesindeki bazı üyelerin kalıtsal hastalıklarla bağlantısının bulunmasıyla pekiştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak bilineni Cx26 mutasyonlarının sebep olduğu kalıtsal sendromik olmayan işitme kaybıdır (White ve Paul, 1999). Şimdiye kadar bulunan 100'den fazla mutasyonunun iç kulakta Cx26 proteininde fonksiyon kaybına sebep olduğu, Cx26 bulunan deri, karaciğer gibi organlar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Kelly vd., 2014). Sendromik olmayan sağırılığın yanında bazı baskın olarak çalışan Cx26 mutasyonları kalıtsal deri hastalıklarıyla bağlantılı sendromik sağırılığa yol açmaktadır (Richard vd., 1998; Maestrini vd., 1999; Richard vd., 2002; Richard vd., 2004). Sendromik olmayan sağırılığa sebep olan mutasyonların genel olarak proteinin fonksiyon kaybına yol açtığı gösterilmiştir fakat sendromik sağırılıkla ilişkili mutasyonların Cx26'nın, yeni fonksiyonlar kazanarak epidermiste gözlenen değişikliklere sebep olduğu öngörülmektedir (Lee ve White, 2009; Kelly vd., 2014). Epidermiste Cx26'nın yanı sıra Cx30, Cx31, Cx32 ve Cx43 gibi farklı izorformlar da sentezlenmektedir. Bu genlerden bazıları

sendromik olmayan sağırılığa neden olan mutasyonların sebep olduğu Cx26 proteinindeki fonksiyon kaybını telafi edip epidermisin normal bir şekilde görevini yürütmesini sağlarken, deri hastalıklarıyla bağlantılı sendromik sağırılık mutasyonlarının neden olduğu yeni fonksiyonların üstesinden gelememektedirler (Lee ve White, 2009; Kelly vd., 2014). Son dönemdeki çalışmalar göstermiştir ki hastalığa bağlı olarak baskın olarak çalışan Cx26 mutasyonları üç farklı şekilde çalışmaktadır: (i) aynı hücrede bulunan diğer connexin protein/kanallarının çalışmalarını baskın bir şekilde engellemek, (ii) hücre içinde Cx26 proteinin birikmesine sebep olmak ve (iii) sürekli olarak açık bulunan yarım kanalların yapımına yol açmak (Mese vd., 2014; Kelly vd., 2014). Sendromik sağırılığa neden olan Cx26 mutasyonlarının epidermiste hyperkeratosis'e (epidermisin aşırı kalınlaşması) yol açtığı gözlenmiş fakat yeni fonksiyonlar kazanan Cx26 proteinlerinin epidermisin homeostasisinin korunmasında rol oynayan moleküler mekanizmaları nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir.

Connexin'lere bağlı deri hastalıklarının moleküler mekanizmalarının tanımlanması ve bu proteinlerin epidermisdeki görevlerinin anlaşılmasında, hastalığa sebep olan mutasyonların karakterizasyonu önemli bir rol oynamaktadır. Bu amaçla, bu projede Cx26'nın neden olduğu deri hastalıklarından olan keratitis-ichthyosis-deafness (KID) sendromuna sebep olduğu gösterilen yeni bulunmuş mutasyonlar kullanılarak değişimlerin proteinin yapısına, fonksiyonuna ve yarım kanal oluşturma potansiyellerine olan etkilerinin yanı sıra mutasyonların keratinosidlerdeki kanalların fonksiyonlarına, hücrelerin farklılaşmasına ve kalsiyum sinyallerine etkilerinin ortaya konması planlanmıştır. Keratinosidlerdeki gap junction'ların epidermisteki görevlerinin anlaşılması ve connexin mutasyonlarının hücrelerde neden olduğu değişimlerin ortaya konması, hastalıkların anlaşılmasına ve bunlara özgü tedaviye yönelik yeni protokollerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

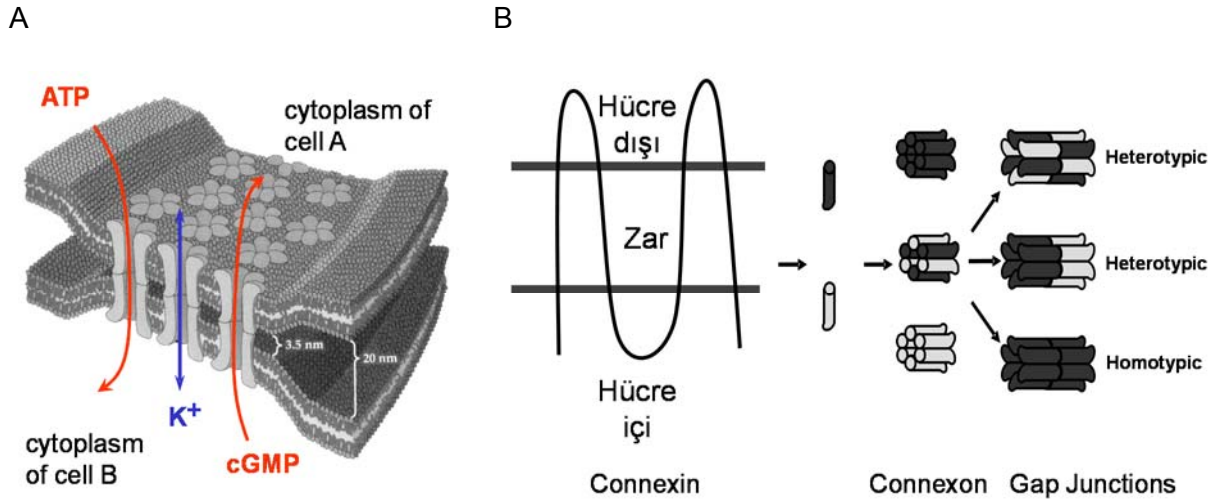
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Hücreler arası iletişim ve connexin'ler

Hücreler arası iletişim çok hücreli canlılarda doku içi dengesinin sağlanmasında ve devam ettirilmesinde rol oynayan mekanizmalardan birisidir. Hücrelerin kullandığı iletişim mekanizmalarından birisi de hücre sitoplazmaları arasında doğrudan bağlantı kuran gap junction (oluklu bağlantı) kanalları vasıtasıyla gerçekleştirilir (Robertson, 1963; Revel ve Karnovsky, 1967; Wei vd., 2004). Gap junction'lar komşu hücreler arasında iyonların, aminoasitlerin, ikincil ulakların, küçük metabolitlerin ve siRNA'lerin değişimini gerçekleştirirler (Şekil 1A). Hücrelerarası bu iletişim hücrelerin senkronizasyonu, farklılaşması, büyümesi ve damarsız dokuların atık ve metabolit koordinasyonunun yapılması gibi bir çok fizyolojik olay

için vazgeçilmez bir unsurdur (Kanno ve Loewenstein, 1964; Lawrence vd., 1978; White ve Paul, 1999; Valiunas vd., 2005).

Oluklu bağlantılar omurgasız ve omurgalı bütün canlılarda iki hücre zarının birbirlerine çok yaklaştığı bölgelerde (2-4 nm'lik boşluk bırakarak), yüzlercesinin bir arada olduğu gruplar (plakalar) halinde bulunurlar (Şekil 1A) (Bruzzone vd., 1996; White ve Paul, 1999; Vinken vd., 2006). Chordate filumunda gap junctionlar, protein seviyesinde aynı özellikleri taşıyan connexin (Cx) adı verilen bir gen ailesi tarafından kodlanır (Şekil 1B) (Goodenough, 1974; Zoidl ve Dermietzel, 2010). Proteinler yapısal olarak, kanalların duvarlarını oluşturan 4 tane transmembran bölge, bu bölgeleri hücre dışında birbirine bağlayan ve kanalların/hücrelerin birbirlerini tanımada ve connexon'ların birbirlerine yapışmasında görev alan 2 tane döngü (EL1 and EL2) ile hücre içinde bulunan amino-terminal uç, karboksil-terminal uç ve ikinci ve üçüncü transmembranları birbirine bağlayan bir döngü (IL) içermektedirler. Bu dört bölge arasından C-terminal uç ve hücre içindeki döngü hem dizilim hem de uzunluk bakımından izoformlar arasında farklılıkların en çok olduğu ve posttranslasyonel değişikliklerin (örneğin fosforlama) en çok görüldüğü bölgelerdir (Harris, 2001; Lampe ve Lau, 2004; King ve Lampe, 2005).



Şekil 1. Connexin ve oluklu bağlantıların organizasyonu. A) Oluklu bağlantılar komşu hücrelerin sitoplazmaları arasında doğrudan bağlantı kurarak iyonların ve küçük moleküllerin geçişini sağlarlar (Evans ve Martin, 2002). B) 4 transmembran bölgesine sahip connexin'ler bir araya gelerek önce connexon'ları daha sonra da hücre zarında gap junction'ları oluştururlar (Mese vd., 2007).

Hücrelerin çevrelerinde olan olaylara gerekli yanıtları vermeleri ve çabuk bir şekilde değişikliklere uyum sağlamaları için gap junctionlar sürekli bir yapım-yıkım döngüsü içerisinde (Musil vd.). Gap junction'ların yapımı, altı tane connexin'in bir araya gelip connexon adı verilen yarım kanalları oluşturmasıyla endoplazmik retikulumda başlayıp trans-Golgi aygıtında tamamlanır (Musil ve Goodenough, 1993; Das Sarma vd., 2002; Laird, 2006).

Daha sonra hücre zarına keseciklerle taşınan connexon'lar ya kendi başlarına görev yaparlar (non-junctional kanallar) ya da hücre zarında serbest bir şekilde dağılarak hücrenin komşu hücrelerle birbirlerine çok yaklaştığı kısımlardaki komşu connexon'larla kenetlenerek oluklu bağlantıların yapımını tamamlarlar (Harris, 2001; Goodenough ve Paul, 2003). Son senelerde, gap junction'ların yanı sıra hücre zarında bulunan yarım kanalların hücrelerin yaşamlarını ve faaliyetlerini sürdürmeleri için önemli olduğu gösterilmiştir. Normal şartlarda ya da hastalık durumlarında bu kanallar açılarak değişik faktörlerin (ATP, glutamate, NAD) hücre dışına salınımı sağlayarak otokrin ve parakrin sinyallerle çevrelerini etkilemektedirler (Goodenough ve Paul, 2003; Saez vd., 2005; Evans vd., 2006).

İnsan genomunda en az 21 farklı connexin izoformu bulunmaktadır. Bu genlerden bir ya da bir kaç memeli hücrelerinin yaşamlarının tamamında ya da belirli evrelerinde ifade edilmektedirler. Mesela, Cx43 vücudumuzdaki bir çok hücrede bulunurken, Cx26 en çok kulaktaki salyangoz (kohlea), karaciğer, plasenta ve deride üretilmektedir (Harris, 2001). Epidermisteki keratinosidler başta Cx26, Cx43, Cx30.3, Cx31 olmak üzere en az 9 farklı connexin izoformu ifade etmektedirler (Wiszniewski vd., 2000 Meda P 2000; Kretz vd., 2003). Birden çok connexin izoformunun aynı anda ifade edilmesi hem connexon'ların hem de oluklu bağlantıların yapısını etkileyebilir. Yarım kanallar ya da oluklu bağlantılar yapılırken eğer bir çeşit connexin yapıya katılırsa homomerik/homotipik kanallar, kanal oluşumu sırasında birden fazla connexin kullanıldıysa heteromerik/heterotipik kanallar oluşur (Şekil 1B) (Beyer vd., 1995; Bukauskas vd., 2006). Bu türden farklı etkileşimler yapısal ve fonksiyonel çeşitliliği arttırdığı gibi hücreler arasında değiştirilen moleküllerin çeşitliliğini de etkiler.

2.2 Yarım kanalların fonksiyonları

Connexin'lerin hücreler arasında gap junction kanalları kurarak hücreler arasında iletişim sağlamanın yanı sıra, hücre zarında non-junctional yarım kanallar oluşturarak hücre içi ve dışı arasında madde geçişinde rol oynadıkları gösterilmiştir (Goodenough ve Paul, 2003; Evans vd., 2006). Normal dokuda yarım kanalların nasıl çalıştığı konusunda pek fazla bilgi bulunmamakla beraber hücre kültüründe yarım kanalların normal koşullarda hücre dışının kompozisyonunun değiştirilmesiyle (lipofilik moleküller ve büyüme faktörlerinin uygulanması, pH ya da katyon miktarındaki değişiklikler, ve hücre zarında gözlenen voltaj değişiklikleri), patolojik durumlarda ise mikrop istilası ya da mutasyonlar sonucunda yapılarında meydana gelen değişiklikler nedeniyle aktif olan connexon kanalları oluşturdukları gözlenmiştir (Goodenough ve Paul, 2003; Tran Van Nhieu vd., 2003; Montgomery vd., 2004; Stong vd., 2006; Gerido vd., 2007; Saez vd., 2010; Kelly vd. 2014). Normal durumlarda, retinada bulunan pigment epitel hücrelerinin (RPE) embriyonik dönemde hücre dışına Cx43 yarım kanallarıyla ATP salgılayarak hem komşu RPE hücrelerin hem de progenitör hücrelerin fonksiyonlarını ve



gelişimlerini etkileyebileceği gösterilmiştir (Pearson vd., 2005). Hastalık gibi durumlar için dizanteriye sebep olan Shigella mikrobunun epitel hücrelerin istilası sırasında Cx26 yarım kanallarını aktifleştirerek hücrelerden ATP salınımına sebep olması örnek olarak gösterilebilir (Tran Van Nhieu vd., 2003). Hücrelerden salınan ATP kalsiyum yolaklarını harekete geçirerek bakterilerin epitel hücrelere saldırganlığını ve hücrelerdeki yayılımını artırdığı gözlenmiştir (Tran Van Nhieu vd., 2003). Benzer şekilde, bağırsakta mikrobiyal hastalıklar sırasında Cx43 protein seviyesinin artmasının açık olarak bulunan yarım kanalların çoğalmasına sebep olduğu ve bağırsak hücrelerinden su salınımını artırıp ishale yol açtığı gözlenmiştir (Guttman vd., 2010). Bunun gibi kalıtsal hastalıklara sebep olan bazı mutasyonların da Cx26, Cx30, 32 ve Cx43 proteinlerinin hücrelerde sürekli açık bulunan yarım kanallar oluşturmalarına neden olduğu gösterilmiştir (Essenfelder vd., 2004; Stong vd., 2006; Gerido vd., 2007; Abrams vd., 2002; Dobrowolski vd., 2007). Açık yarım kanallar kontrolsüz molekül alım ve salınımına sebep olacağı için hem mutant kanalın olduğu hücreleri hem de komşu hücrelerin metabolizmalarını olumsuz yönde etkileyip hastalarda görülen patolojilerin gelişmesinde rol oynayabilirler.

2.3 Sağırlığa neden olan Cx26 mutasyonları

Gap junction'ların insan fizyolojisi için önemi connexin mutasyonlarının farklı kalıtsal hastalıklara neden olduğunun gösterilmesiyle ortaya konmuştur. Connexin'lerdeki mutasyonlara bağlı olduğu gösterilen ilk genetik hastalık Cx32 mutasyonlarının sebep olduğu X-linked Charcot-Marie-Tooth sendromu'dur (Bergoffen vd., 1993). Bunun ardından Cx26, Cx43, Cx46 ve Cx50 gibi farklı izoformların sağırlık, katarakt ve deri hastalıkları gibi bir çok patolojik duruma sebep olduğu gösterilmiştir (White, 2000; Evans ve Martin, 2002; Gerido ve White, 2004; Mese vd. 2007). Bunlardan Cx26'daki mutasyonlar insanlarda sendromik olmayan sağırlığın başlıca nedenlerinden biridir (Kelsell vd., 1997). Cx26 mutasyonlarının hangi mekanizmalarla sağırlığa neden olduğunun anlaşılması için yapılan çalışmalarda mutasyonların genel olarak Cx26'da fonksiyon kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Sendromik olmayan sağırlıkla bağlantılı Cx26 mutasyonlarının aşağıda listelenen farklı mekanizmalarla protein ya da kanallarda fonksiyon kaybına yol açtığı gösterilmiştir:

- (i) 35delG, 167delT,235delC mutasyonları protein sentezinin erkenden durmasına neden olarak kısa fonksiyonel olmayan Cx26 proteinleri oluşturabilirler (Zelante vd., 1997; Morell vd., 1998; Kudo vd., 2000).
- (ii) G59A, D66H ve R184Q mutasyonları hücre içi protein trafiğini etkileyerek proteinlerin hücre içinde birikmesine neden olabilirler (Marziano vd., 2003; Su vd., 2010; Berger vd., 2014).
- (iii) C169Y mutasyonu connexon'ların hücre dışında kenetlenmesini engelleyerek fonksiyonel olmayan kanallar oluşturabilirler (Birkenhager vd., 2014).



- (iv) T8M ve N206S mutasyonları hücre zarında gap junction kanal yapımını sağlamalarına rağmen hücreler arasında madde geçişini sınırlayarak kanalların normal çalışmasını etkileyebilirler (Mese vd., 2008)

Kalıtsal sağırılığa sebep olan Cx26 mutasyonlarının bir çok deri hastalığıyla (sağırılıkla bağlantılı palmoplantar keratoderma (PPK; OMİM# 148350), keratitis-ichthyosis-deafness sendromu (KİD sendromu; OMİM# 148210), Bart–Pumphrey sendromu (OMİM# 149200) ve Vohwinkel sendromu (OMİM# 124500) bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Richard vd., 1998b; Richard vd., 2002; van Steensel vd., 2002; Richard vd., 2004; Maestrini vd., 1999). Bu hastalıklarda görülen en temel ortak özellik hepsinin üst deri katmanlarının normalden çok kalınlaşmasına yol açmasıdır. Sendromik sağırılığa neden olan Cx26 mutasyonlarının hangi mekanizmalarla deri anormalliklerine neden olduğu tam olarak bilinmemektedir.

2.4 Epidermis ve epidermal connexin'ler

İnsan vücudunun en büyük organı olan deri fiziksel, kimyasal, mekanik travmalara ve zararlı mikroplara karşı bir bariyer görevi görür. Aynı zamanda vücudun su kaybını önleyerek hem su dengesini hem de vücudun ısısını kontrol eder. İnsan üst derisi dört farklı katmandan oluşur: Stratum Bazale (en derin), Stratum Spinozum, Stratum Granülozum ve Stratum Corneum (en yüzey). En derinde bulunan stratum bazale'da bulunan keratinosidler birbirlerine ve bazal membrana bir çok yapışma moleküyle bağlanırlar (Blanpain ve Fuchs, 2006). Buradaki hücreler bölünme özellikleri olan kök hücrelerdir ve bölünüp farklılaşarak üst katmanlardaki keratinosidler oluştururlar. En üst katmandan da zamanla atılırlar. Hücrelerin farklılaşma süresince hem protein hem de yapısal seviyesinde bir çok değişiklikler gözlenir. Bu hücrel olaylarda bir çok protein yolağı, bazal membran bileşenleri, kalsiyum iyon dengesi, bağlanma moleküllerinin rol oynadığı gösterilmiştir (Fuchs, 1990; Fuchs, 2007). Bunların yanı sıra son zamanlarda derinin farklı katmanlarında ifade edilen connexin mutasyonlarının farklı kalıtsal deri hastalıklarıyla bağlantılı olduğunun gösterilmesi hücreler arası iletişim ve connexin'lerin epidermis fonksiyonu için önemini ortaya koymuştur (Richard vd., 1998a; Macari vd., 2000; Richard vd., 2002). Ek olarak, derideki kalsiyum iyon dengesinin korunması epidermisin her katmanındaki hücrelerin normal bir şekilde çalışması için vazgeçilmez bir unsurdur. Kalsiyum keratinosidlerin bölünmesi, çoğalması ve farklılaşmasında rol oynamanın yanı sıra, hücrelerin birbirine ya da bazal membrana bağlanmasını sağlayan yapışma moleküllerinin ifade edilmelerini ve fonksiyonlarını da kontrol etmektedir (Pani ve Singh, 2008). Epidermiste stratum granülozum'da en yüksek ve bazal tabakada en düşük sevide olmak üzere bir kalsiyum eğili (gradient) vardır. Kalsiyum seviyesinin bu şekilde sürdürülmesi epidermisin yapısının devam ettirilip iç dengesinin korunmasında önemlidir. Bu sistemdeki herhangi bir aksaklığın deri hastalıklarına yol açtığı gösterilmiştir (Proksch vd., 2008).

Epidermis gap junctionlarla birbirine sıkıca bağlantılı olup, bu junctionların sağladığı hücreler arası iletişimin keratinosid büyümesi ve farklılaşmasında önemli roller oynadığı öngörülmüştür. İnsan epidermisinde, gelişim evrelerinin değişik zamanlarında ve bölgelerinde birbirleriyle farklı ya da örtüşen bir şekilde ifade edilen en az dokuz connexin geni bulunmaktadır (Kelsell vd., 2000; Di vd., 2002). Cx43 interfollicular epidermis'te bulunurken; Cx26 özellikle epidermis'in en kalın olduğu ve en çok aşınmaya uğrayan palmo-plantar (el ayası-ayak tabanı) epidermisinde üretilmektedir. Bunun yanında Cx26 ve Cx43 saç foliküllerinde ve ter bezlerinde de ifade edilmektedir (Salomon vd., 1994). Ek olarak, Cx30, Cx30.3 ve Cx31 epidermisin farklılaşmanın en çok olduğu üst tabakalarında bulunur. Bu genlerin tam olarak görevleri bilinmemekle birlikte Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31 ve Cx43'ün farklı deri hastalıklarına yol açması oluklu bağlantılarla yapılan iletişimin epidermisin normal bir şekilde görevini yapmasında önemli olduğunu vurgulamaktadır (Morley vd., 2005).

2.5 Sendromik sağırlığa neden olan Cx26 mutasyonları

Connexin'lerin epidermisteki görevlerinin ve bunlardan kaynaklanan hastalıkların moleküler mekanizmalarının anlaşılması için yapılan çalışmalar sendromik olmayan sağırlığa neden olan Cx26 mutasyonlarının proteinde ya da kanallarda fonksiyon kaybına neden olarak sadece iç kulağı etkilediğini göstermiştir (White, 2000; Bruzzone vd., 2003). Bu da, Cx26'nın yokluğunun epidermisin normal gelişimini ve çalışmasını engellemediğini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, deri hastalıklarına sebep olan mutasyonların Cx26'nın farklı bir şekilde çalışmasına neden olduğuna işaret etmektedir. Örneğin, kurbağa yumurtalarında ifade ettirilen Cx26'nın sağırlıkla bağlantılı PPK mutasyonlarından R75W, delE42, and D66H'in hücrelerde baskın olarak normal Cx26 ve Cx43 kanallarının fonksiyonlarını baskıladığı gözlenmiştir (Richard vd., 1998b; Rouan vd., 2001). Bunun gibi Vohwinkel sendromu'na sebep olan Cx26G59A ve D66H mutasyonları da beraber ifade edilen Cx32 and Cx43'ün aktivetelerini etkilemektedirler. G59A hem Cx32'yi hem de Cx43'ü baskımlarken, D66H sadece Cx43'ün floresan boya geçirgenliğini engellemiştir (Thomas vd., 2004). Buna karşılık başka bir grup mutasyonun connexin'lerin hücre zarında aktif bir şekilde çalışan yarım kanallar yapmalarına neden olduğu gösterilmiştir. Cx26 KID sendromu mutasyonları G12R, N14K, A40V, G45E ve D50N, kurbağa yumurtalarında ya da hücre hatlarında ifade ettirildiklerinde hücrelerin kısa bir süre içinde (24 saat içinde) ölmelerine sebep olmuştur (Montgomery vd., 2004; Gerido vd., 2007; Lee vd., 2009). Ayrıca mutant proteinler kurbağa yumurtalarının hücre zarında yüksek elektrik akımı (membrane current) oluşturarak, hücre zarında sürekli açık olan yarım kanalların bulunduğu işaret etmiştir. Sürekli açık olan yarım kanalların bulunduğu hücrelerden hücre dışına ATP gibi sinyal moleküllerin salınarak parakrin sinyallerle hücrelerdeki kalsiyum iyon dengesini etkilediği tespit edilmiştir (Sanchez vd., 2010; Terrinoni vd., 2010). Bu örneklerde de görüldüğü üzere, mutant proteinler aktif connexon'lar yaparak hücrenin depolarizasyonuna ve sonunda ölümüne

sebeplerin yanında hücre dışına saldırdığı moleküllerle çevrelerindeki hücrelerin fonksiyonlarını da etkilemektedir. Deri hastalıklarına sebep olan connexin mutasyonlarının analiz edildiği *in vivo* modeller olarak Vohwinkel sendromuna sebep olan Cx26-D66H transgenik geni taşıyan ve KID sendromuna neden olan Cx26-G45E transgenik geni taşıyan fareler bulunmaktadır (Bakirtzis vd., 2003; Mese vd., 2011). Cx26-D66H transgenik fareleri insanlarda görülen Vohwinkel sendromu fenotiplerine benzer özellikler göstermesinin yanında moleküler düzeyde mutant Cx26D66G transjeni normal Cx26 ve Cx30'un hücre zarına gitme mekanizmalarını etkileyerek hücre içinde birikmelerine sebep olmuştur (Bakirtzis vd., 2003). Benzer şekilde, Cx26G45E transgenik fareleri de epidermin kalınlaşması gibi KID sendromu bulunan hastalarda gözlenen fenotipler geliştirmiştir. Bunun yanında transgenik geni taşıyan farelerin yaşam kaliteleri azalmış ve Cx26G45E mutasyonunu taşıyan hastalarda gözlemlendiği üzere ölüm oranları da önemli oranda artmıştır (Jonard vd., 2008; Mese vd., 2011). Farelerden izole edilen keratinosidlerde Cx26G45E'nin sürekli açık olarak bulunan yarım kanalları oluşturdukları gözlenmiştir (Mese vd., 2011). Buna göre, mutasyonlar Cx26 proteininde buldukları yere bağlı olarak epidermiste yeni fonksiyonlar kazanmalarını sağlayarak, keratinosidlerin büyümelerini ve farklılaşma mekanizmalarını etkilerler. Bunun da farklı fenotiplere sahip değişik deri hastalıklarının gelişmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Hastalık ya da yaralanma durumlarında epidermisteki connexin dağılımında büyük ölçekte değişiklikler olduğu görülmüştür (Coutinho vd., 2003). Yaraların iyileşmesi sırasında keratinosidlerin çoğalmaya başlamasından önceki evrede epidermiste Cx26 protein miktarında önemli artışlar olduğu gözlenmiş ve fakat bunun iyileşme mekanizmalarındaki rolü tam olarak anlayamamıştır (Labarthe vd., 1998; Djalilian vd., 2006). Aynı şekilde keratinosidlerin aşırı çoğalmasına sebep olan hastalıklarda da Cx26 miktarında önemli ölçüde artma gözlenmiştir. Bu çalışmalar, Cx26'nın epidermisteki keratinosidlerin farklılaşma mekanizmalarında rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Cx26 seviyesindeki artışlar, hücre zarında non-junctional olarak görev yapan Cx26 yarım kanallarının artmasına neden olarak hücrelerin dışarıya ATP gibi sinyal molekülleri salgılamalarına yol açabilirler. Bu moleküller parakrin sinyallerle keratinosidlerin çoğalma ve/veya farklılaşma yollarını etkileyerek hücrelerin aşırı çoğalmasına ve farklılaşmasını sağlayabilirler. Belirtilen mekanizmaların anlaşılması hem connexin mutasyonlarına bağlı hastalıklara sebep olan moleküler mekanizmalara hem de connexinlerin/oluklu bağlantıların epidermisteki görevlerinin anlaşılmasına ışık tutacak ve connexinlerden kaynaklanan deri hastalıklarına özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine öncül olacaktır. Bu doğrultuda, bu projeye hastalarda yeni bulunmuş KID sendromuna neden olan Cx26 mutasyonlarının (G11E, I30N, D50Y, D50A ve A88V) protein, kanal ve hücre seviyesinde etkilerinin araştırılması öngörülmüştür.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Mutasyonların oluşturulması ve farklı ekspresyon vektörlerine klonlanması

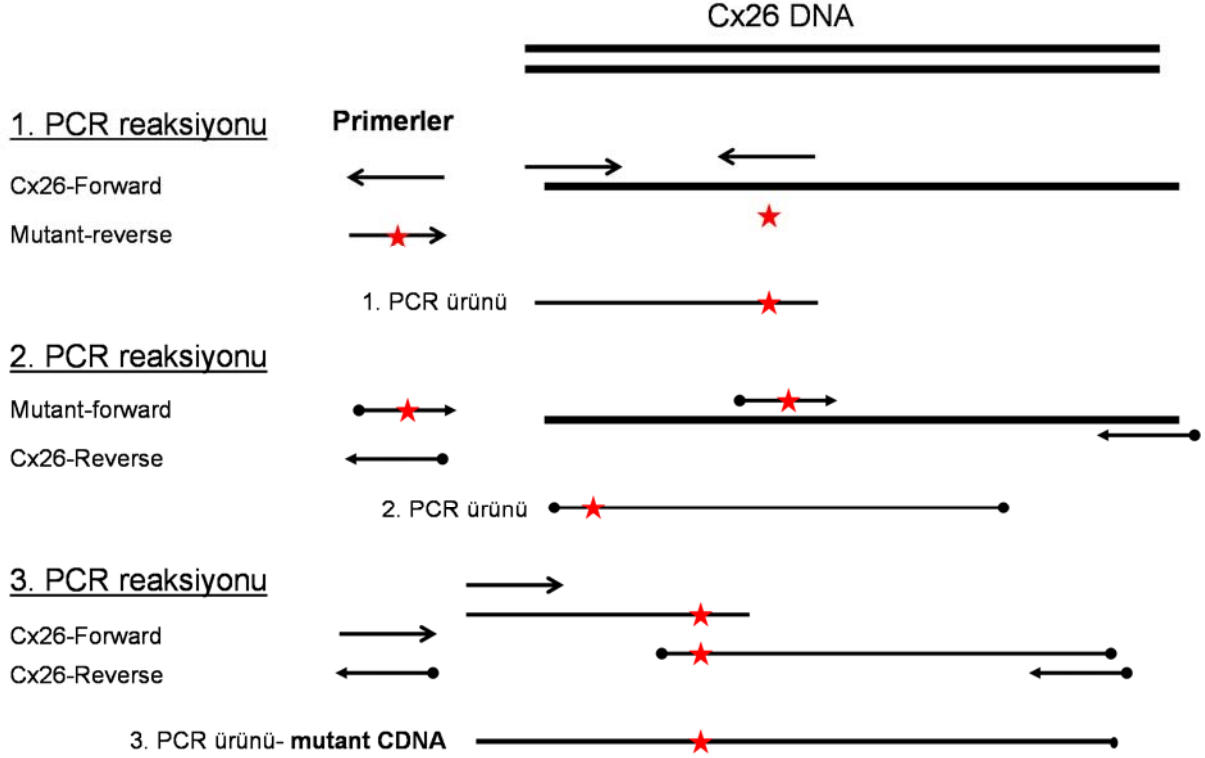
Tablo 1’de bulunan primerler (büyük ve kalın olarak belirtilen harfler, mutasyon için gerekli değişimleri göstermektedir, Microsynth GA) ismarlandıktan sonra, ilk olarak normal (wild-type) Cx26 geni normal insan genomik DNA’sından PCR’la sentezlenmiştir. Cx26WT cDNA’sı, pBSBK vektörüne BamHI enzimiyle kesilerek klonlanmış ve sekansı teyit edilmiştir (Iztech Biomer ve Macrogen Europe). Daha sonra Cx26 cDNA’sının memeli hücrelerde ifade edilmeleri için BamHI enzimiyle kesilerek pCS2+ ve pIRES2-EGFP vektörlerine klonlanmıştır.

Tablo 1. PCR güdümlü mutagenesisle mutasyonların oluşturulması için kullanılan primerler

5'-Cx26 -Forward	5'- tg ttgt gg atcc atggattggg gc acgc -3'
3'-Cx26-Reverse	5'- tg ttgt gg atcc ttaaactggc ttttt -3'
G11E-Forward:	5'- tg ttgt gg atcc atgga ttggggcagc ctgcagacga t ct gg Ag gg tg ga acaaa -3'
I30N-forward	5'- cc gtc ct ct tca At tttcg cattatga-3
I30N-reverse	5'- tcataatg cgaaaa T tga agaggacgg -3'
D50Y-Forward	5'- gatgagcagg cc T actttgt ctgca – 3'
D50Y-Reverse	5'- tg cag acaaag Ag g cctgctc at c -3'
D50A-Forward	5'- gatgagcagg ccg C ctttgt ctgca -3'
D50A-Reverse	5'- tg cag acaaag G cgg cctgctc at c -3'
A88V-Forward	5'- gtgtcc acgccag T gc t ct agtggc -3'
A88V-Reverse	5'- gccactagga gc Actggcgt ggacac -3'

Cx26WT klonunun elde edilmesinden sonra KID sendromuna sebep olan G11E, I30N, D50Y, D50A ve A88V mutasyonları PCR-güdümlü mutagenesis yöntemiyle oluşturulmuştur (Şekil 2).

Bu yöntemle 3 farklı PCR reaksiyonu oluşturularak mutasyonu içeren cDNA'lar sentezlenmiştir. Öncelikle Cx26-forward ve mutant-reverse primerleri kullanılarak Cx26WT cDNA’sından 5’-mutant-cDNA’sı sentezlenmiştir. Daha sonra mutant-forward ve Cx26-reverse primerleri kullanılarak Cx26WT cDNA’sından 3’-mutant-cDNA’sı elde edilmiştir. Son PCR reaksiyonunda ise 5’-mutant-cDNA ve 3’-mutant cDNA kalıp (template) olarak kullanılarak Cx26-forward ve Cx26-reverse primerleriyle mutasyonları içeren cDNA'lar sentezlenmiştir. cDNA'lar BamHI enzimiyle kesilerek pBSBK vektörüne klonlanmış ve sekansları doğrulanmıştır (Iztech Biomer ve Macrogen Europe). cDNA'lar son olarak pCS2+ ve pIRES2-EGFP2 memeli ekspresyon vektörlerine BamHI enzimiyle kesilerek klonlanmıştır. Vektörler midiprep kitle çoğaltılarak deneylerde kullanılmıştır (Invitrogen).



Şekil 2. PCR-güdümlü mutagenesis yöntemiyle mutasyonların oluşturulması. Mutasyonların oluşturulması sırasında Cx26WT cDNA'sı baz alınarak 3 aşamalı PCR sentez metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Hücre kültürü

Bu çalışmada mutasyonların protein ve kanal yapımı ve fonksiyonuna etkilerini araştırmak için hücreler arası iletişimden yoksun fare neuroblastoma, N2A, hücresi (ATCC, CCL-131) ve insan rahim kanseri hücresi HeLa (ATCC, CCL-2) kullanılmıştır. Aynı zamanda mutasyonların keratinosidlere etkilerinin araştırılması için projede önerilen primer hücrelerin yerine immortalized HaCaT hücre (CLS) hattı kullanılmıştır. Primer hücrelerin devamlılığı ve transfeksiyonu sırasında yaşanan problemler nedeniyle bu hücreler yerine HaCaT hücreleri tercih edilmiştir.

Bütün hücre tipleri için besi yeri olarak DMEM (Hyclone ya da GIBCO) / %10 FBS (Biological Industries)/ %1 Penicillin/Streptomycin (GIBCO) kullanılmıştır. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde büyütülüp devam ettirilmiştir. Bütün deneylerde, hücreler pasajlandıktan 24 saat sonra Cx26WT ve mutant vektörler transfeksiyonla hücrelere verilmiş ve 24-48 arasında da deneyler yapılmıştır.

N2A ve HeLa hücrelerinin transfeksiyonu için Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ve HaCaT hücreleri için Lipofectamine 3000 (Invitrogen) kullanılmıştır.

Lipofectamine 2000 transfeksiyonu için önce DNA ve Lipofectamine 2000 ayrı ayrı serum olmayan DMEM’de 1:2 veya 1:3 oranında hazırlanıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda DNA ve Lipofectamine 2000 solüsyonları birleştirilip yavaşça karıştırıldıktan sonra 20 dakika daha oda sıcaklığında bekletilmiştir. DNA+Lipofectamine 2000 solüsyonu damla damla hücre besi yerine eklenmiştir. Transfeksiyondan 6 saat sonra hücre besi yeri değiştirilmiş ve olası yarım kanalların çalışmalarını engellemek için besi yerine son konsantrasyonu 3,2mM olacak şekilde $CaCl_2$ eklenmiştir. Hücreler 24 ile 48 saat sonra deneylerde kullanılmıştır.

Lipofectamine 3000 transfeksiyonu için DNA:Lipofectamine3000 oranı olarak 1:3 kullanılmıştır. Önce Lipofectamine 3000 serum olmayan DMEM’e eklenip vortex’le karıştırılmıştır. DNA serum olmayan DMEM ve kitle gelen P3000 miyarıyla karıştırılarak hazırlanmıştır. DNA solüsyonu, Lipofectamine 3000 solüsyonuna eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışım hücrelere damla damla verilmiş ve olası yarım kanalların çalışmalarını engellemek için besi yerine son konsantrasyonu 3,2mM olacak şekilde $CaCl_2$ eklenmiştir. Hücreler 24 ile 48 saat sonra deneylerde kullanılmıştır.

3.3 Actin-Cx26 immunohistokimyasal boyaması

Lamel’de büyütülen ve pCS2+ Cx26WT, Cx26I30N, Cx26D50A, Cx26D50Y ve Cx26A88V’yle transfekte edilen HeLa hücreleri iki defa 1XPBS’le yıkandıktan sonra 1X PBS’te hazırlanmış %4 paraformaldehyde ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100’lü 1XPBS’le hücre zarının geçirgenliği 15 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3 BSA bulunan %0.1 TritonX-100’lü 1XPBS’le 30 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücrelere tavşan anti-Cx26 birincil antikor (rabbit anti-Cx26 antibody (Invitrogen)) 1:500 oranında bütün gece 4°C’de ya da 1 saat boyunca oda sıcaklığında uygulanmıştır. Birincil antikor üç kere 1XPBS’le yıkandıktan sonra tavşana karşı üretilen floresan molekül bağlı ikincil antikor (Alexa Fluor 555-anti-rabbit antikor (Invitrogen), 1:500 oranında) ve Alexa Fluor 488-Phalloidin (1:200 oranında) 45 dakika boyunca uygulanmıştır. Üç kere 1XPBS’le yıkanan lameller cam lamlara hücre çekirdeğini boyamak için DAPI yükleme solüsyonuyla (mounting medium) yüklenmiştir. Hazırlanan cam lamalar floresan mikroskopta 40X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da (NIH) birleştirilmiştir.

3.4 İkili Immunohistokimyasal Analizler

Lamel üzerinde büyütülen HeLa hücreleri pCS2+ Cx26WT ve mutant vektörleriyle transfekte edilip Golgi aparatı belirteç molekülü golgin 97 ve Cx26 proteinleri immunokimyasal olarak tespit edilmiştir. Deney günü hücreler iki defa 1XPBS’le yıkandıktan sonra 1XPBS’te hazırlanmış %4 paraformaldehyde ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100’lü 1XPBS’le hücre zarının geçirgenliği 15 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3 BSA bulunan



%0.1 TritonX-100'lü 1XPBS'le 30 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücreler aynı anda 1:200 oranında fare anti-golgin 97 birincil antikoru ve 1:500 oranında tavşan anti-Cx26 birincil antikoru 1 saat boyunca oda sıcaklığında maruz bırakılmıştır. Daha sonra golgin 97, fareye karşı üretilen floresan molekül bağlı ikincil antikor (Alexa Fluor 488- anti- mouse antikor, 1:200 (Invitrogen)) ve tavşana karşı üretilen floresan molekül bağlı ikincil antikorla (Alexa Fluor 555- anti- rabbit antikor (Invitrogen)) tespit edilmiştir. Üç kere 1XPBS'le yıkanan lameller cam lamlara hücre çekirdeğini boyamak için DAPI yükleme solüsyonuyla (mounting medium) yüklenmiştir. Hazırlanan cam lamlar floresan mikroskopta 100X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da (NIH) birleştirilmiştir.

Proteinlerin ER'da biriktikleri ER spesifik GPR78/BiP ve Cx26 ikili boyamasıyla aynı protokol takip edilerek aşağıdaki antikolar kullanılarak yapılmıştır:

Birincil antikolar: ER için, fare anti-GRP78/BiP birincil antikoru (Abcam, 1:200) ve Cx26 için, 1:500 oranında tavşan anti-Cx26 birincil antikoru (Invitrogen)

İkincil antikolar: GRP78/BiP için fareye karşı üretilen floresan molekül bağlı ikincil antikor (Alexa Fluor 555- anti-mouse antikor, 1:200 (Invitrogen)) ve tavşana karşı üretilen floresan molekül bağlı ikincil antikorla (Alexa Fluor 488- anti-rabbit antikor (Invitrogen)).

3.5 Western Blot analizleri

3.5.1 Protein İzolasyonu

Transfekte edilen hücreler sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80°C'de saklanmıştır. Protein izolasyonu sırasında dondurulmuş hücreler buzun üzerinde 5 dakika boyunca çözdürüldükten sonra üzerlerine Lysis buffer (10 mmol/l Tris pH 7.5, 1 mmol/l EDTA, 0.1 % Triton X-100, 1X protease inhibitor and 1 mM DTT) eklenerek, hücreler kazınarak toplanmıştır. Eppendorf tüplere toplanan hücreler 26G'lik insülin şırıngalarıyla homojenize edildikten sonra buzun üzerinde 20 dakika boyunca bekletilmişlerdir. Kısa bir vortex'ten sonra hücreler 4°C'de ve 14000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilip sıvı kısmı yeni Eppendorf tüpe aktarılmış, protein miktarı Bradford testiyle belirlendikten sonra -80°C'de saklanmışlardır.

Bradford için proteinler 1:200 oranında (1 µl protein, 159 µl dH₂O and 40 µl 5X Bradford miyar olacak şekilde) 96-kuyucuklu kaplarda ikili örnekler olarak hazırlanmıştır. Protein konsantrasyonlarının tayini için 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/ml BSA konsantrasyonları hazırlanarak, spektrofotometre ile 595nm'de ölçümler yapıp standart eğri hazırlanmıştır. Deneysel örnekler de spektrofotometrede ölçülerek, standart eğri kullanılarak örneklerdeki protein miktarları tayin edilmiştir.



Mutasyonların Cx26 protein miktarına etkileri N2A hücrelerinde ve mutasyonların ER katlanmamış protein cevabına (UPR) etkileri hem N2A hem de HaCaT hücrelerinde araştırılmıştır.

3.5.2 Western blot protokolü

Hücrelerden izole edilmiş proteinler yükleme boyası eklenerek eşit konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Örnekler protein belirteciyle beraber (NEB) SDS-PAGE jelinde yürütülmüştür. Nitrocellulose membranına geçirilen proteinler 1X TBS-Tween-20 (0.05 %) (TBS-T) ile yıkandıktan sonra, 1X TBS-T'te çözünen %5 süt tozu ile membran 2-3 saat boyunca bloklanmıştır. Membran daha sonra 1:1000 olarak seyreltilen tavşan anti-Cx26 antikoruyla (Invitrogen) bütün gece 4°C'de döndürülmüştür. Bir sonraki gün membran 1X TBS-T ile 15'er dakika süreyle 3 kere yıkandıktan sonra 1:2500 olarak seyreltilen peroxidase'e bağlı keçi anti-tavşan ikincil antikoruyla (Pierce) muamele edilmiştir. Membran 1X TBS-T ile 15'er dakika süreyle 3 kere yıkandıktan sonra üzerine SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo) uygulanarak Versadoc görüntüleme sistemiyle (Bio-Rad) görüntülenmiştir. Bu deneylerde, γ -tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmış, aynı membran aynı protokol takip edilerek 1:10000 seyreltilen γ -tubulin miktarının tayini için kullanılmıştır. Birincil antikor olarak fare anti- γ -tubulin antikoru (Sigma) ve ikincil antikor olarak peroxidase'e bağlı keçi anti-fare (Dako) kullanılarak görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

N2A ve HaCaT hücrelerinde aynı protocol takip edilerek GRP78/BiP protein seviyeleri belirlenmiştir. Bu deneylerde de γ -tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Fare anti-GRP78/BiP birincil antikoru (Abcam) ve peroxidase'e bağlı keçi anti-fare ikincil antikoruyla BiP protein seviyeleri belirlenmiştir.

3.6 mRNA ifade analizleri

Moleküler ifade analizlerinde kullanılmak üzere dizayn edilen primerler (Tablo 2) nukleaz içermeyen suda çözülmüş, kullanım solüsyonu 500X'lik stok solüsyonunu 10X'e seyrelterek elde edilmiştir. Toplam mRNA izolasyonu için, 6 kuyulu platelerde bulunan hücreler iki kere 1XPBS ile yıkandıktan sonra sıvı azotla dondurulmuştur. Sıvı azottan alınan platelerin kuyularına 200 μ l lysis buffer eklenip hücreler buzun üzerinde 2-3 dk boyunca bekletilmiştir. Kuyulardaki parçalanmış hücreler 1.5 ml'lik eppendorf tüplerde toplanmış ve insülin iğnesi yardımıyla homojenize hale getirilmiştir. Tüpteki sıvılar, üzerlerine kendi hacimleri kadar etanol eklenerek toplam mRNA izolasyonu PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen örneklerin mRNA konsantrasyonları Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür. Eşit miktarlarda mRNA'dan First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ile elde edilen cDNA'lar RT-PCR analizi için kullanılmıştır. Çevrimler sonucu elde

edilen ifade eğrileri kontrollü olarak analiz edilmiştir. Üç tekrarlı (triplicate) olarak yürütülen RT-PCR deneylerinde numune sayısı da üç olarak kullanılmıştır.

Tablo 2 RT-PCR’da kullanılan primer listesi

Cx26 forward primer	5'-ctgcagctgatcttcggtgc-3'
Cx26 reverse primer	5'-aagcagtcacagtggt-3'
Fare GAPDH forward primer	5'-gacatgccgctggagaaac-3'
Fare GAPDH reverse primer	5'-agcccaggatgcccttagt-3'
Keratin 10 forward primer	5'-gccaacatcctgcttcagat-3'
Keratin 10 reverse primer	5'-ggctctcaattgcatctcc-3'
Involucrin forward primer	5'-tctgcctcagccttactgtg-3'
Involucrin reverse primer	5'-cagtggagtggctgttca-3'
İnsan GAPDH forward primer	5'-gaaggtgaaggcggagtca-3'
İnsan GAPDH reverse primer	5'-aatgaaggggtcattgatgg-3'

Bütün mRNA ifade analizi deneylerinde N2A’lerde fare ve HaCaT’larda insan GAPDH geni içsel kontrol (housekeeping gen) olarak kullanılmıştır. Transfeksiyondan sonra, N2A hücrelerinde Cx26 gen ifadesi için insan Cx26 primerleri, HaCaT hücrelerinde Keratin10 ve Involucrin genleri için insan keratin10 ve involucrin primerleri kullanılmıştır (Tablo 2). RT-PCR BioRad IQ5 & MYQ sisteminde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Delta-Delta Ct yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.7 Hücre içine floresan boya alım analizleri

Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücreler yarım kanalların açılmasına olanak sağlamak amacıyla kalsiyum bulunmayan besi yerinde 20 dakika boyunca 37°C’de tutulmuştur. Bunu takiben hücreler 1X PBS’de hazırlanan 0,5mg/ml neurobiotin boyasına 20 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında maruz bırakılmışlardır. Belirtilen sürenin sonunda hücreler 1X PBS’le yıkanmış ve 1X PBS’te hazırlanmış %4 paraformaldehide ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100’lü 1XPBS’le hücre zarının geçirgenliği 10 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3 BSA bulunan %0.1 TritonX-100’lü 1XPBS’le 15 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücreler 1:1000 oranında tetra methyl rhodamine isothiocyanate (TRIT-C)’e bağlı streptavidin’le (Pierce) muamele edilmişlerdir. 1XPBS’le yıkanan hücreler floresan mikroskopta 20X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da (NIH) analizleri gerçekleştirilmiştir.

Ethidium bromide (EtBr) alım deneylerinde transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler yarım kanalların açılmasına olanak sağlamak amacıyla kalsiyum bulunmayan ortamda 20 dakika kadar bekletildikten sonra 10µM EtBr bulunan solüsyona 3 dakika süreyle maruz bırakılmışlardır. Bu sürenin sonunda hücreler 1X PBS’te hazırlanmış %4 paraformaldehide ile 20 dakika boyunca sabitlenmiş ve floresan mikroskopta 20X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da (NIH) analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.8 Hücre dışına ATP salım analizleri

Cx26 WT ve mutant vektörleriyle transfekte edilen hücreler, tranfeksiyondan 24 saat sonra kalsiyum bulunmayan 1XPBS'le 30 dakika boyunca 37°C %5 CO₂ inkübatöründe tutulduktan sonra, 1XPBS toplanarak deney gününe kadar -80°C'de saklanmıştır. Deneylerde kullanılan hücreler total protein izolasyonunun yapılması için sıvı azotta dondurularak -80°C'de saklanmıştır. ATP salınım deneyleri için ATP determination kit (Invitrogen) protokolü takip edilerek yapılmıştır. Bu kit D-luciferin substratının ateşböceği luciferase'ı varlığında ATP kullanım miktarının biyoışımaya yöntemi (560 nm'de maksimum emisyon) ile ölçülmesine dayanmaktadır. Öncelikle kitle beraber gelen standart ATP solüsyonu kullanılarak 0.1nM, 0.2nM, 0.5nM, 1nM ve 4nM ATP standart solüsyonları hazırlanarak 560 nm'de ışınımları ölçülmüştür. Bu değerler kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Deney grupları için ise -80°C'de dondurulmuş PBS'ler çözülerek luciferase+luciferin reaksiyon solüsyonuna eklenmiş ve ışınımları 560nm'de ölçülmüştür. Hücrelerden hücre dışına salınan ATP miktarları standart eğri kullanılarak belirlenmiştir.

Sıvı azotta dondurulan hücrelerden toplam protein yukarıda 3.5.1 protein izolasyonu bölümünde belirtildiği şekilde izole edilmiş ve toplam protein miktarı Bradford testiyle belirlenmiştir. Hesaplanan ATP miktarı toplam protein miktarına normalize edilerek karşılaştırılmıştır.

3.9 Hücre içi kalsiyum miktarının tayini

N2A ve HaCaT hücrelerindeki kalsiyum miktarı, pCS2+ Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V vektörleriyle transfekte edilen hücrelerde Fluo-3AM kalsiyum belirteci (Invitrogen) ve akış sitometresi kullanılarak belirlenmiştir. N2A hücreleri iki kez 1X PBS ve HaCaT hücreleri de iki kez EDTA solüsyonuyla yıkandıktan sonra hücrelere son konsantrasyonu 5µM olacak şekilde kalsiyum/magnezyum bulunmayan 1X PBS'de çözünmüş Fluo-3AM boyası verilmiştir. Bundan sonra bütün deneyler karanlıkta yapılmıştır. Hücreler 30 dakika boyunca 37°C'de hücre kültürü inkübatöründe bekletildikten sonra solüsyon ortamdan alınmış ve hücrelere 1X PBS eklenmiştir. Hücreler daha sonra %0,25 Trypsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra toplanmış ve 1100 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti kalsiyum ve magnezyum içeren HBSS solüsyonunda çözülüp akış sitometresi (FACSCANTO BD) ile analizleri yapılmıştır.

Akış sitometresinde ileri ışık saçılmaları hücre boyutunun karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır

(http://docs.abcam.com/pdf/protocols/Introduction_to_flow_cytometry_May_10.pdf).

Hücrelerdeki kalsiyum miktarının belirlenmesi sırasında aynı hücrelerin ileri saçılma (forward scatter) yayılımları belirlenmiş ve değişimler gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

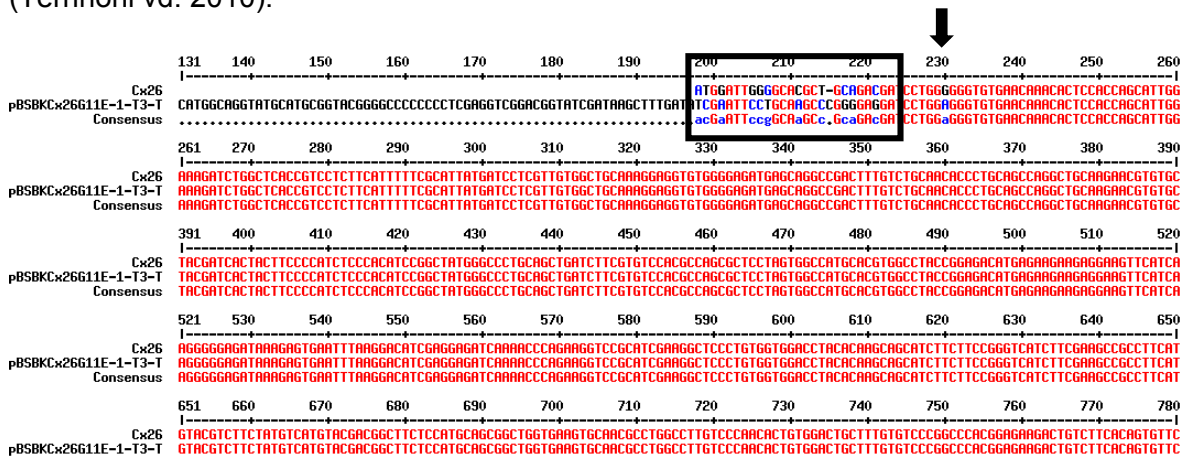
4. BULGULAR

4.1 KID sendromu mutasyonlarının oluşturulması

Keratitis-ichthyosis-deafness sendromuna neden olan yeni mutasyonların connexin kanallarının yapılarına ve çalışma mekanizmalarına olan etkisinin araştırılması amacıyla, insan Connexin26 geninde G11E, I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonları PCR-temelli mutagenез yöntemiyle oluşturulmuştur. PCR'la elde edilen DNA parçalarının doğru mutasyonları içerdiğini tespit etmek amacıyla mutasyonları içeren PCR parçaları öncelikli olarak pBSBK bakteriyel ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Sekanslamaya gönderilen klonlar normal insan Cx26 gen dizilimine karşı Multialin programı (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) kullanılarak hizalanmış ve mutasyonların yerleri ve doğrulukları tespit edilmiştir:

4.1.1 Cx26G11E (32G>A) mutasyon sonuçları

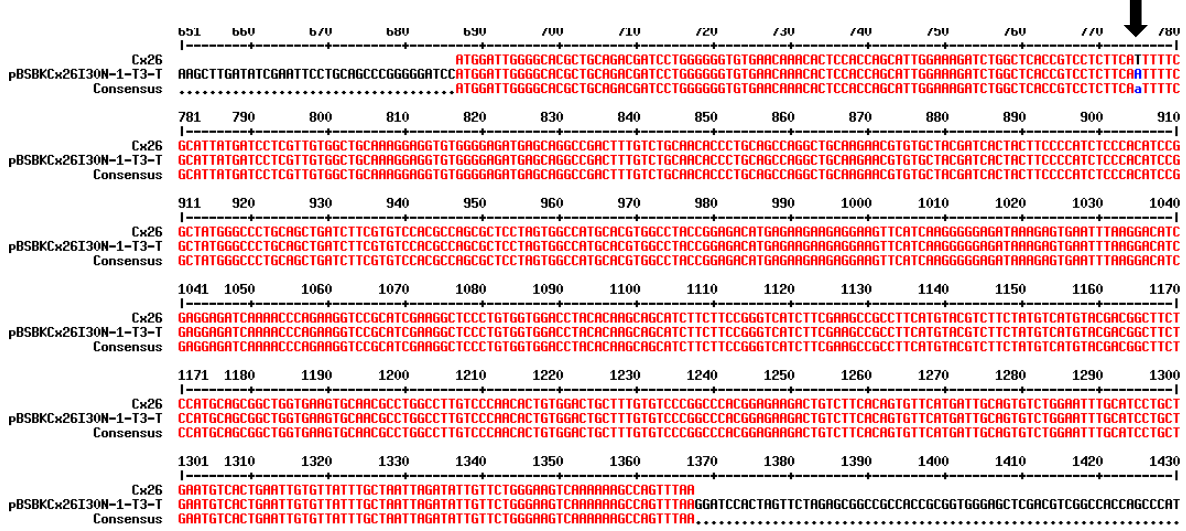
Cx26G11E mutasyonunu içeren klonlarda 32'inci nükleotidde Guanin'den Adenin'e olan değişim gerçekleşmiştir (Şekil 3, ok). Fakat Cx26 sekansının başlangıcında, mutasyondan hemen önceki kısımlarda her iki yönden yapılan analizlerde de 5' Cx26G11E sekansında bir çok farklı değişim olduğu gözlenmektedir. Sekansın geri kalanı mükemmel uyumluluk göstermesine rağmen hazırlanan her iki örnekte de aynı problemle karşılaşılması nedeniyle Cx26G11E mutasyonu için hazırlanan primer'in (5'- tgtgtggatcc atgga ttggggcacg ctgcagacga tctctggAggg tgtgaacaaa -3') sentezlenmesi sırasında bir problem olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmaların yapıldığı sırada, başka bir grup Cx26G11E mutasyonunun transfekte edilen hücrelerde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu/mekanizmasını etkileyerek hücre ölümüne neden olduğunu gösterdiği için, bu mutasyonla planlanan çalışmalara devam edilmemiştir (Terrinoni vd. 2010).



Şekil 3 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26G11E sekansının karşılaştırılması. Cx26G11E sekanslarının normal Cx26 DNA'sıyla karşılaştırılmasında mutasyondan önceki bölgede uyumsuzluklar gözlenmiştir (siyah dikdörtgen). 32'inci nükleotid'de mutasyon bulunduğu (siyah ok) halde elde edilen klonlar fonksiyonel çalışmalar için uygun bulunmamıştır.

4.1.2 Cx26I30N (89T>A) mutasyon sonuçları

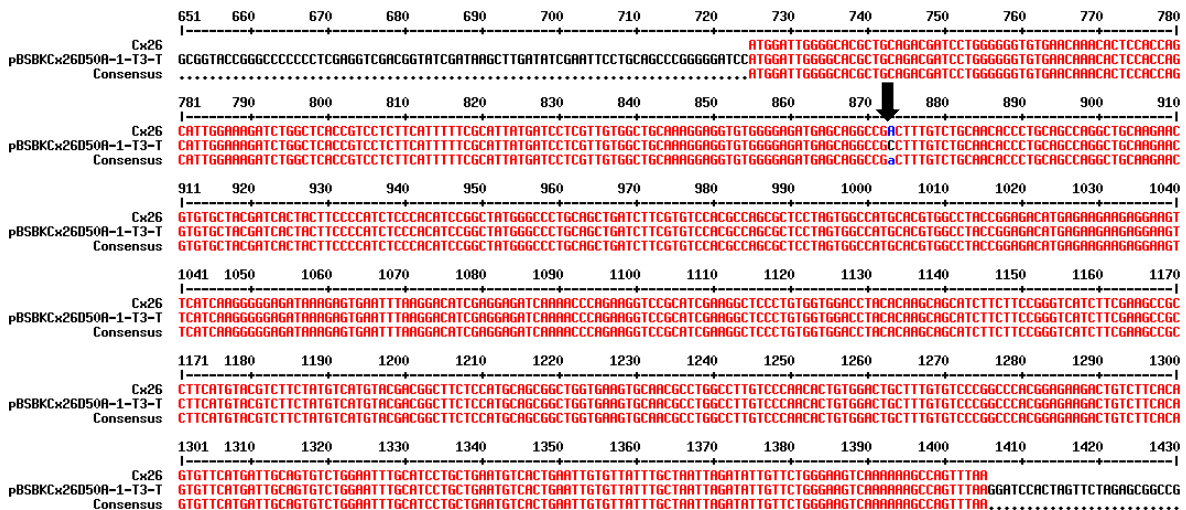
Cx26I30N klonundan alınan sonuçlarda, her iki yönden yapılan dizilim analizinde 89'uncu nükleotidde T to A mutasyonun doğru bir şekilde yapıldığı ve mutasyon dışındaki sekansın tamamının incelenmesiyle sekansta herhangi bir problem olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4, ok).



Şekil 4 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26I30N sekansının karşılaştırılması. 89. Nükleotid'de T'den A'ya dönüşüm gerçekleşmiştir (siyah ok) ve geri kalan bölgeler normal Cx26 geniyle 100% uyumluluk göstermiştir.

4.1.3 Cx26D50A (149A>C) mutasyon sonuçları

Cx26D50A klonundan alınan sonuçlarda, her iki yönden yapılan dizilim analizinde Cx26D50A mutasyonu başlangıçtan itibaren 149'uncu nükleotidde tespit edilmiş ve mutasyon dışındaki sekansın tamamında Cx26WT DNA'sıyla mükemmel uyumluluk gözlenmiştir (Şekil 5, ok).



Şekil 5 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26D50A sekansının karşılaştırılması. 149. Nükleotid'de A'dan C'ye dönüşüm gerçekleşmiştir (siyah ok) ve geri kalan bölgeler normal Cx26 geniyle 100% uyumluluk göstermiştir.

4.1.4 Cx26D50Y (148G>T) mutasyon sonuçları

Cx26D50Y klonundan alınan sonuçlarda, her iki yönden yapılan dizilim analizinde mutasyon başlangıçtan itibaren 148'inci nükleotidde tespit edilmiş ve mutasyon dışında kalan bölgeler normal Cx26 dizilimiyle mükemmel uyumluluk göstermiştir (Şekil 6, ok).



Şekil 6 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26D50Y sekansının karşılaştırılması. 149. Nükleotid'de G'den T'ye dönüşüm gerçekleşmiştir (siyah ok) ve geri kalan bölgeler normal Cx26 geniyile 100% uyumluluk göstermiştir.

4.1.5 Cx26A88V (263C>T) mutasyon sonuçları

Cx26A88V klonundan alınan sonuçlarda ise, her iki yönden yapılan dizilim analizinde mutasyon başlangıçtan itibaren 263'üncü nükleotidde tespit edilmiş ve mutasyon dışındaki sekansın tamamı normal Cx26 geniyile mükemmel uyumluluk göstermiştir (Şekil 7, ok).

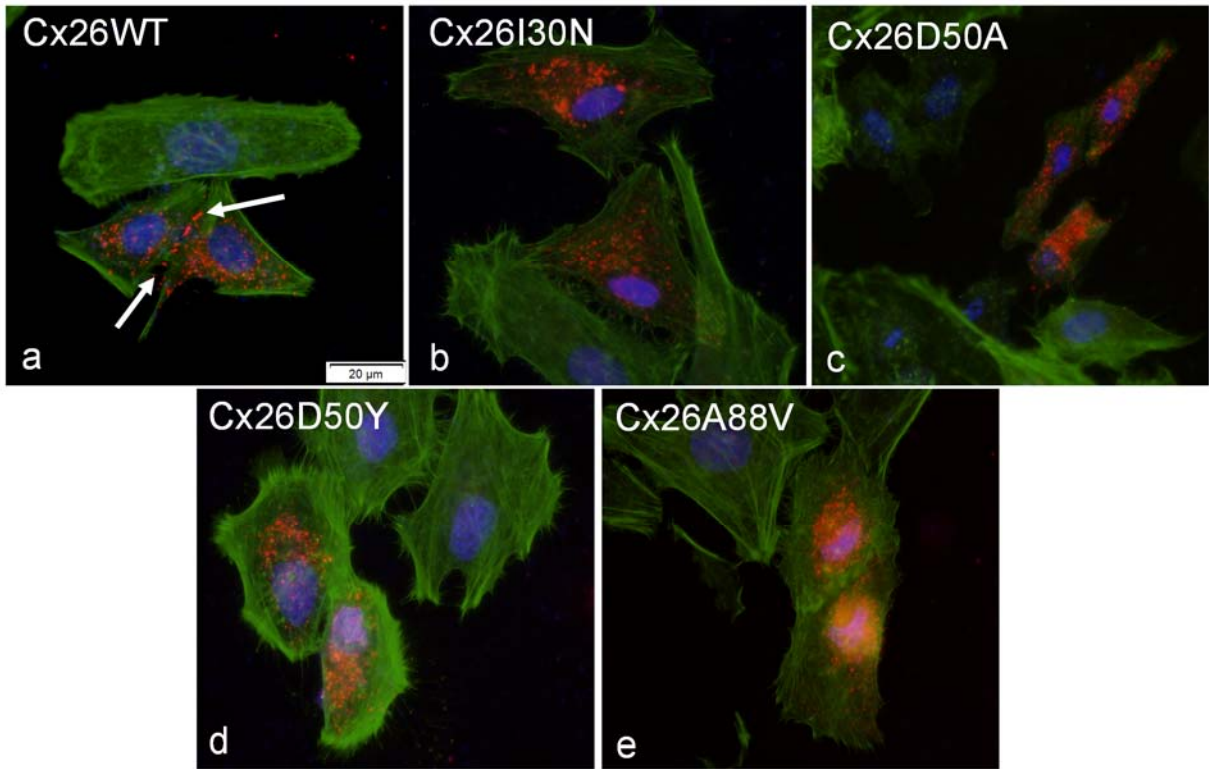


Şekil 7 Normal Cx26 DNA'sı ile Cx26A88V sekansının karşılaştırılması. 263. Nükleotid'de C'den T'ye dönüşüm gerçekleşmiştir (siyah ok) ve geri kalan bölgeler normal Cx26 geniyile 100% uyumluluk göstermiştir.

Çalışma için planlanan bütün mutasyonların doğruluğu sekanslamayla tespit edildikten sonra fonksiyonel analizlerin yapılabilmesi için pBSBK'den kesilen mutant ve normal Cx26 cDNA'ları pIRES2-EGFP2 ve pCS2+ memeli ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır.

4.2 Mutasyonların Cx26'nın hücre içindeki lokalizasyonlarına olan etkileri

KID sendromuna neden olan mutasyonların Cx26'nın hücredeki lokalizasyonlarına olan etkilerinin araştırılması için lamel üzerinde büyütülen HeLa hücreleri normal Cx26 ve Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarını taşıyan pCS2+ vektörleri ile transfekte edilmiştir. Cx26 proteinlerinin hücre içindeki yerleri immunohistokimyasal yöntemlerle Cx26'ya özgü antikolar ve actin için Phalloidin boyası kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 8).



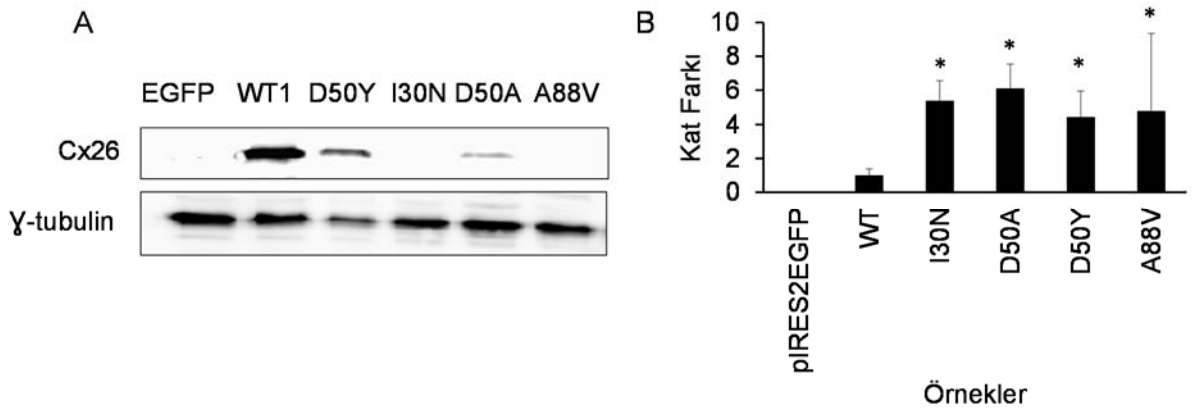
Şekil 8 Mutasyonların Cx26 protein lokalizasyonuna etkileri. Yeşil sinyal actin boyamasını, kırmızı sinyal Cx26 proteinini ve mavi sinyal hücre çekirdeğini göstermektedir. (a) 'da bulunan beyaz oklar komşu hücreler arasındaki gap junction plakalarını işaret etmektedir. Scale bar 0,02mm.

Beklenildiği üzere Cx26WT ile transfekte edilen hücrelerde Cx26 proteini üretilmekte ve sentezlenen proteinler hücre zarına giderek birbirlerine komşu olan hücreler arasında gap junction plakaları oluşturmaktadırlar (Şekil 8a, beyaz oklar). Buna karşılık Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonları bulunan hücrelerde mutant Cx26 proteinlerini işaret eden sinyaller gözlenmesine rağmen, bu proteinlerin birbirine komşu olan hücreler arasında gap junction plakalarını oluşturmadıkları gözlenmiştir (Şekil 8b, c, d ve e). Buna göre I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının Cx26 proteinlerinin birbirine komşu olan hücreler arasında gap junction

plakaları oluşturmalarını önledikleri gözlenmiştir. Bu resimlerde sadece actin boyaması (sadece yeşil sinyal) bulunan hücreler transfekte olmamış ve negatif kontrol olarak kabul edilen hücrelerdir. Hücre çekirdeğinde gözlenen pozitif sinyaller de çekirdek üzerinde bulunan sitoplazma ve hücre zarında bulunan moleküllerden kaynaklanmaktadır.

4.3 Mutasyonların Cx26'nın ifade edilmesine etkileri

KID sendromuna neden olan Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının Cx26 mRNA ve protein sentezlerini değiştirerek hücreler arasında oluklu kanal oluşumunu etkileyebilecekleri düşünülmüştür. Bu nedenle, mutasyonların hücrelerde sentezlenen Cx26 protein miktarlarına ve mRNA olan etkileri sırasıyla Western blot ve yarı kantatif RT-PCR analizleriyle kontrol edilmiştir (Figure 9). KID sendromu mutasyonlarının protein miktarına olan etkisinin anlaşılması için N2A hücreleri Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonları içeren vektörlerle transfekte edildikten sonra Cx26 protein seviyelerindeki değişimler Cx26'ya özgü antikorlarla belirlenmiştir. Bu deneyler sırasında gamma-tubulin geni yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 9A). Negatif kontrol olarak kullanılan sadece pIRES2-EGFP2 vektörü içeren hücrelerde herhangi bir Cx26 protein sinyaline rastlanmamıştır. Buna karşılık WT, D50A ve D50Y klonları bulunan hücrelerde Cx26 proteinin ifade edildiği ve D50A ve D50Y'nin protein miktarlarında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra I30N and A88V bulunan hücrelerde Cx26 proteini gözlenmemiştir



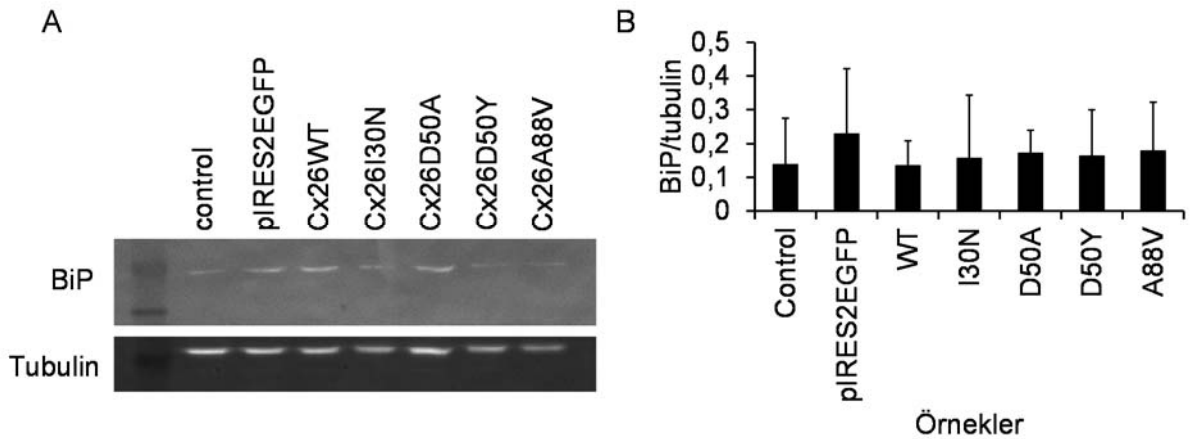
Şekil 9. Mutasyonların Cx26 protein ve mRNA sentezine olan etkileri. A) Western blot analizlerinde pIRESEGFP negatif kontrol ve gamma-tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B) RT-PCR deneyleriyle kontrol edilen mRNA seviyelerinde mutasyonların WT'a göre daha çok mRNA sentezine neden oldukları gözlenmiştir (Student's t-test, $p < 0,05$).

Western blot analizlerinde gözlemlediğimiz azalmaların mRNA seviyesinde de var olup olmadığını tespit etmek için ise, N2A hücreleri Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonları içeren vektörlerle transfekte edildikten sonra Cx26 mRNA seviyeleri Cx26'ya özgü primerler kullanılarak tayin edilmiştir. Bu deneyler sırasında GAPDH geni içsel kontrol olarak kullanılmış, Cx26 mRNA seviyeleri GAPDH miktarına normalize edilerek

karşılaştırılmıştır (Şekil 9B). Negatif kontrol olarak kullanılan sadece pIRES2-EGFP2 vektörü içeren hücrelerde herhangi bir Cx26 mRNA sinyaline rastlanmamıştır. Bunun yanında WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V klonları bulunan hücrelerde Cx26 mRNA'sının üretildiği gözlenmiş ve mutasyonları içeren hücrelerdeki Cx26 mRNA seviyesinin WTCx26 hücrelerindeki mRNA seviyesinden 4-6 kat fazla olduğu gözlenmiştir. Protein seviyelerindeki değişimlerin aksine, KID sendromu mutasyonlarının Cx26 mRNA sentezinde normal Cx26'ya göre daha çok mRNA üretilmesine neden oldukları tespit edilmiştir.

4.4 KID sendromu mutasyonlarının Cx26 protein biyosentez yolağına olan etkileri

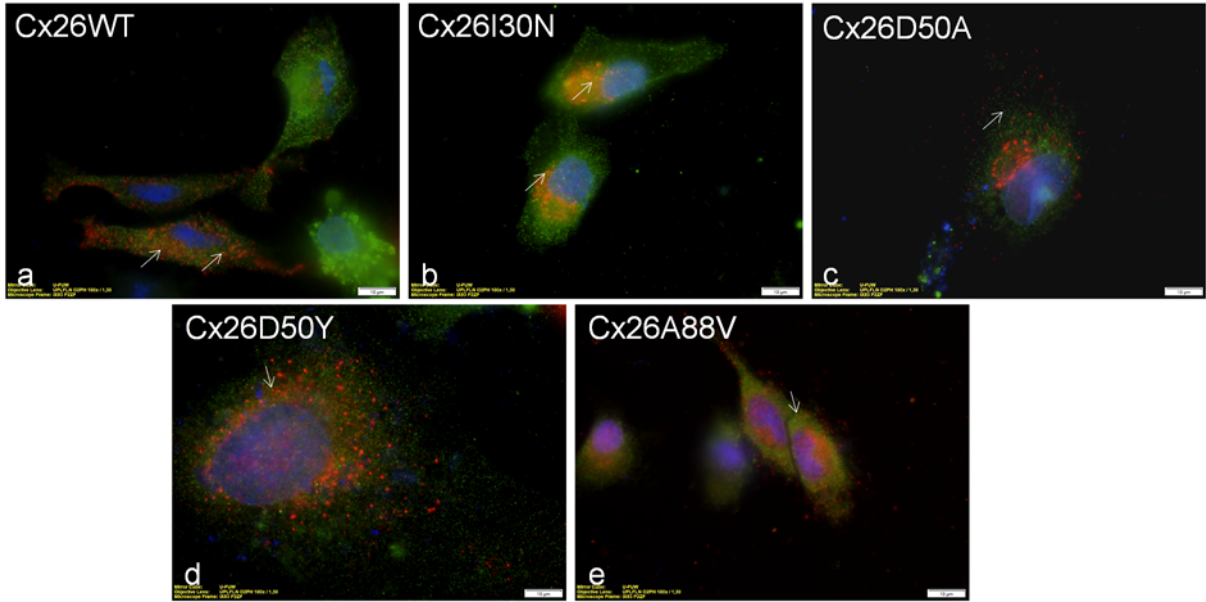
Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının Cx26 proteinin hücre zarında gap junction plakaları oluşturmasını engellediği gözlenmiştir. Mutant proteinlerin hücre zarında gap junction plakaları oluşturamamalarının nedeninin protein biyosentez yolağında meydana gelen problemlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, mutant proteinlerin endoplasmic reticulum'da (ER) birikerek katlanmamış protein cevabı (UPR) sinyal yolağını aktive edebileceği düşünülerek, Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V vektörleriyle transfekte edilen hücrelerdeki UPR belirteç moleküllerinden olan GRP78/BiP (binding protein) protein miktarları Western blot analiziyle belirlenmiştir (Şekil 10). Deneylerde tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmış ve GRP78/BiP sinyali tubulin sinyaline normalize edilmiştir. Örnek jel görüntüsünde gözlemlendiği üzere farklı vektörlerle transfekte edilen hücrelerde BiP miktarlarında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 10A). Üç defa tekrarlanan deneylerdeki BiP/tubulin normalizasyonun ortalamaları alınarak karşılaştırılmış ve mutasyonların GRP78/BiP protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara neden olmadığı gösterilmiştir (Şekil 10B). Bu da KID sendromu mutasyonlarının UPR sinyal yolağının aktive edilmesine yol açmadığına işaret etmektedir.



Şekil 10. Cx26 mutasyonlarının ER stres belirteçlerinden BiP protein sentezine etkileri. A) Mutant proteinlerin N2A hücrelerinde katlanmamış protein cevabı yolak belirteçlerinden olan BiP proteinini sentezinde artışlara neden olmadığı gözlenmiştir. B) Üç tekrarlı yapılan

deneylerde kontrol ve mutant bulunan hücreler arasında BiP üretiminde anlamlı değişimler gözlenmemiştir.

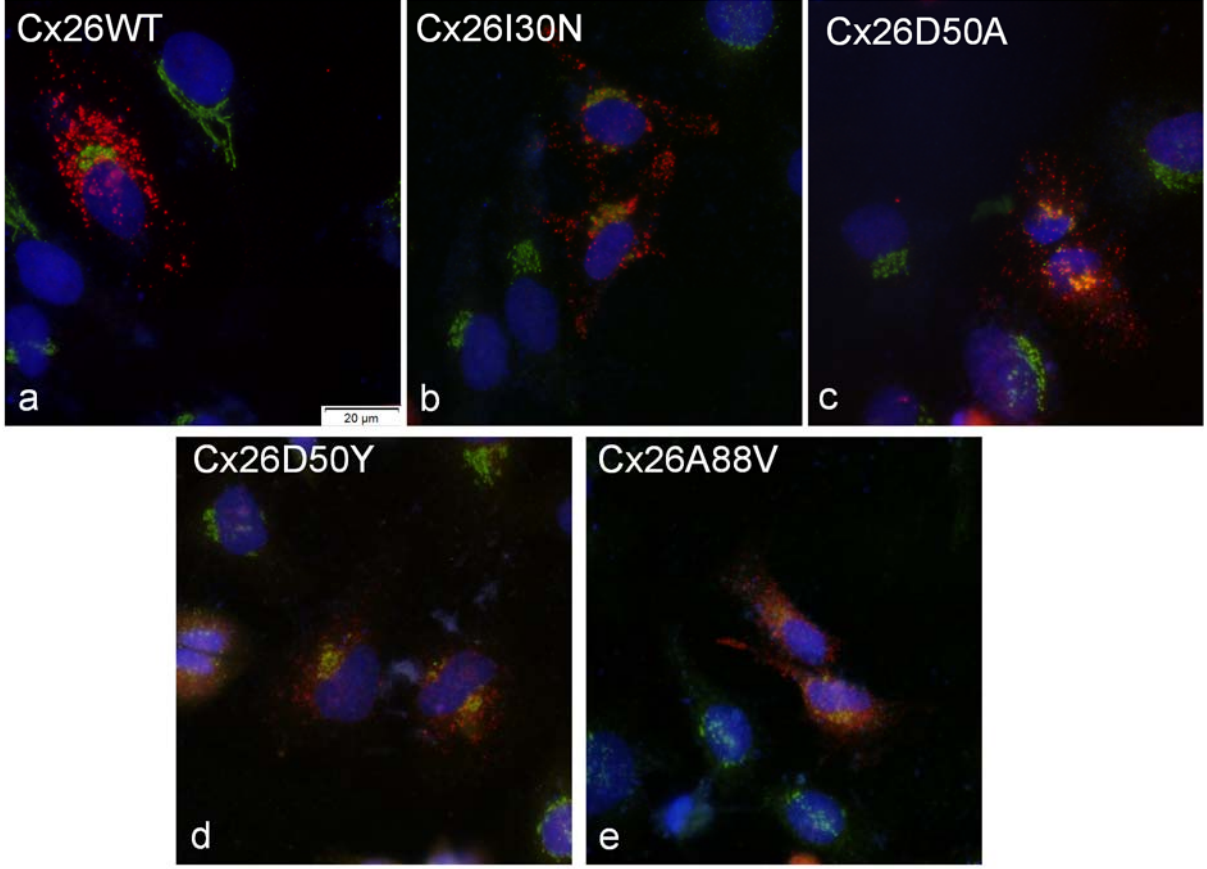
Bunun yanı sıra KID mutasyonlarının, Cx26 proteinin hücre içinde ER ve Golgi aygıtı gibi biyosentetik yolda bulunan organellerde birikebileceği düşünülerek mutant proteinlerle ER ya da Golgi aygıtı belirteç molekülleri için ikili immunohistokimyasal boyamalar yapılmıştır (Şekil 11). Boyalamalar sonucunda çekilen resimler ImageJ programı kullanılarak üst üste bindirilmiş ve Cx26 sinyali ile belirteç molekül sinyalinin aynı bölgelerde olup olmadığı tespit edilmiştir. Mutant proteinlerin ER’da birikip birikmediği Cx26 ve GRP78/BiP ikili boyamasıyla tespit edilmiştir. Bu boyamalarda kırmızı sinyal Cx26 proteinini ve yeşil sinyal ise BiP proteinini göstermektedir. Gösterilen örnek resimlerde yeşil ve kırmızı sinyallerin test edilen bütün durumlar için hücre içinde birbirleriyle bir kaç noktada örtüştüğü gözlenmiştir (beyaz oklar). Cx26 proteinleri ER’da membrana entegre edildikten sonra hücre zarına taşınmaktadır, bu nedenle Cx26-BiP örtüşmesinin az da olsa bütün durumlarda gözlenmesi olasıdır (Şekil 11). Resimlerde sadece yeşil BiP sinyali içeren hücreler (Şekil 11a) transfekte edilmemiş hücreleri göstermektedir.



Şekil 11. Cx26 ve ER belirteci BiP protein lokalizasyonları. pCS2+ vektörüyle transfekte edilen hücreler BiP ve Cx26 antikorlarıyla boyanmıştır. Kırmızı sinyal Cx26 proteinlerini, yeşil sinyal BiP’i ve DAPI hücre çekirdeğini göstermektedir. Scale bar 0,01 mm.

Mutant proteinlerin Golgi aygıtında birikip birikmediği hücrelerdeki Cx26 ve Golgin97 ikili boyamasıyla belirlenmiştir. Burada kırmızı sinyal Cx26 proteinini ve yeşil sinyal ise Golgin97 proteinini göstermektedir (Şekil 12). Şekildeki örnek resimlerde görüleceği üzere Cx26WT bulunan hücrelerde yeşil ve kırmızı sinyal örtüşmemektedir (Şekil 12a). Burada sadece yeşil Golgin sinyali bulunduran hücreler Cx26 ile transfekte olmayan hücrelerdir. Buna karşılık Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonları bulunan hücrelerde Cx26 protein sinyallerinin

Golgin97 sinyalleriyle büyük oranda örtüştüğü gözlenmiştir (Şekil 12b, c, d, e). Bu da KID sendromu mutasyonlarının Cx26 proteinlerinin Golgi aparatında birikmesine neden olduğuna işaret etmektedir.



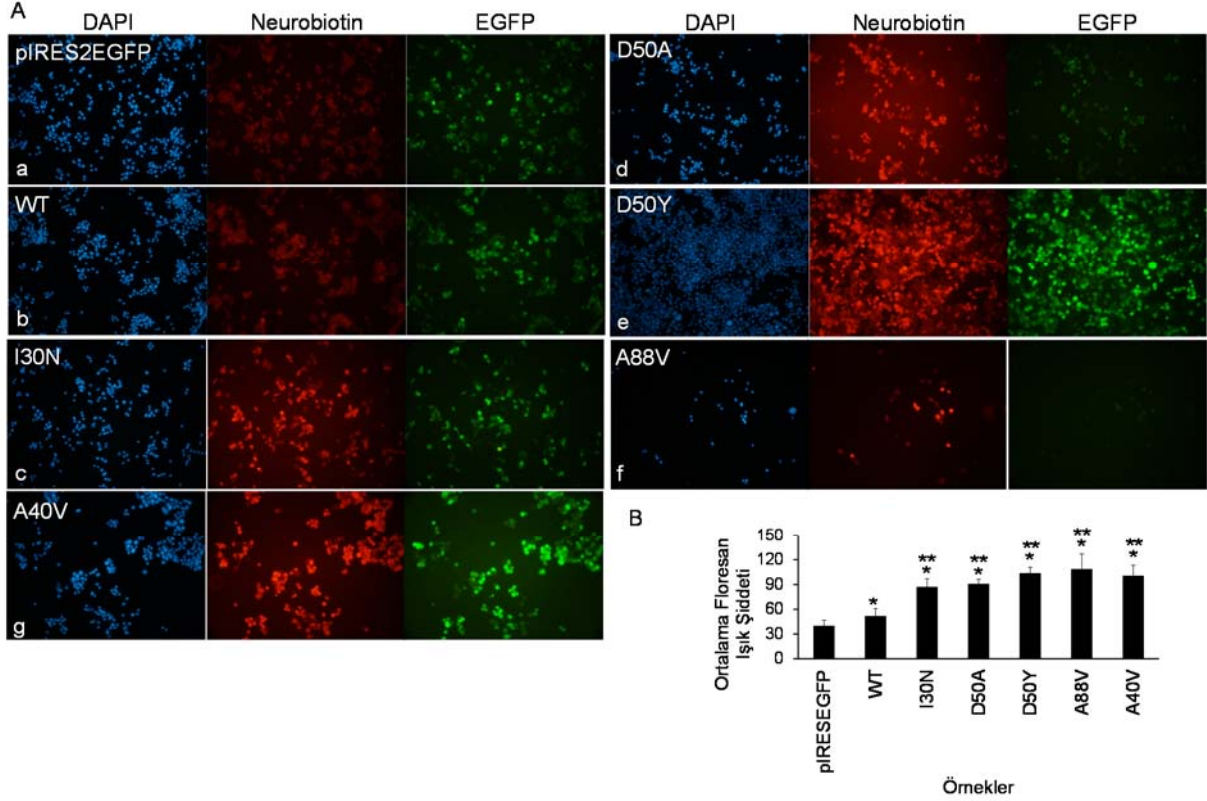
Şekil 12. Cx26 ve Golgi aparatı belirteci Golgin97 lokalizasyonu. pCS2+ vektörüyle transfeke edilen hücreler Golgin97 ve Cx26 antikolarıyla boyanmıştır. Kırmızı sinyal Cx26'yı proteinlerini, yeşil sinyal Golgi aygıtını ve DAPI hücre çekirdeğini göstermektedir.

4.5 KID sendromu mutasyonlarının yarım kanal yapma potansiyelleri

Daha önce yapılan çalışmalarda KID sendromu mutasyonlarının Cx26 proteinin sürekli aktif olan yarım kanallar oluşturmalarına neden olduğu gösterilmiştir (Gerido vd., 2007; Lee vd., 2009; Mese vd., 2010). Bu çalışmada test edilen Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının da benzer şekilde çalışabileceği düşünülerek mutant proteinlerin sürekli açık olan yarım kanal yapma potansiyelleri neurobiotin (NB, 287 MW, -1 charge) ve ethidium bromide (EtBr, 394 MW, +1 charge) floresan boya alım analizleriyle tespit edilmiştir (Şekil 13 ve 14).

Neurobiotin (NB) alım deneylerinde pIRES2-EGFP2 vektörü içeren hücreler negatif kontrol (Şekil 13a) ve daha önce yarım kanal yaptığı gösterilmiş olan Cx26A40V bulunduran hücreler ise pozitif kontrol (Şekil 13g) olarak kullanılmıştır (Montgomery vd., 2004; Gerido vd., 2007). Örnek resimlerde mavi sinyal hücre çekirdek boyamasını, kırmızı NB sinyalini ve yeşil EGFP

sinyalini yani transfekte edilen hücreleri göstermektedir. Negatif kontrol hücrelerinde kırmızı NB sinyali çok zayıf olmasına rağmen Cx26A40V bulunan hücrelerde oldukça yoğun bir kırmızı sinyal gözlenmesi deneyin istenilen şekilde çalıştığını göstermiştir. Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V bulunan hücrelerde kırmızı ışık şiddetinin sadece vektör ve WTCx26 bulunan hücrelerden daha yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 13c, d, e, f ile 13a, b arasında).

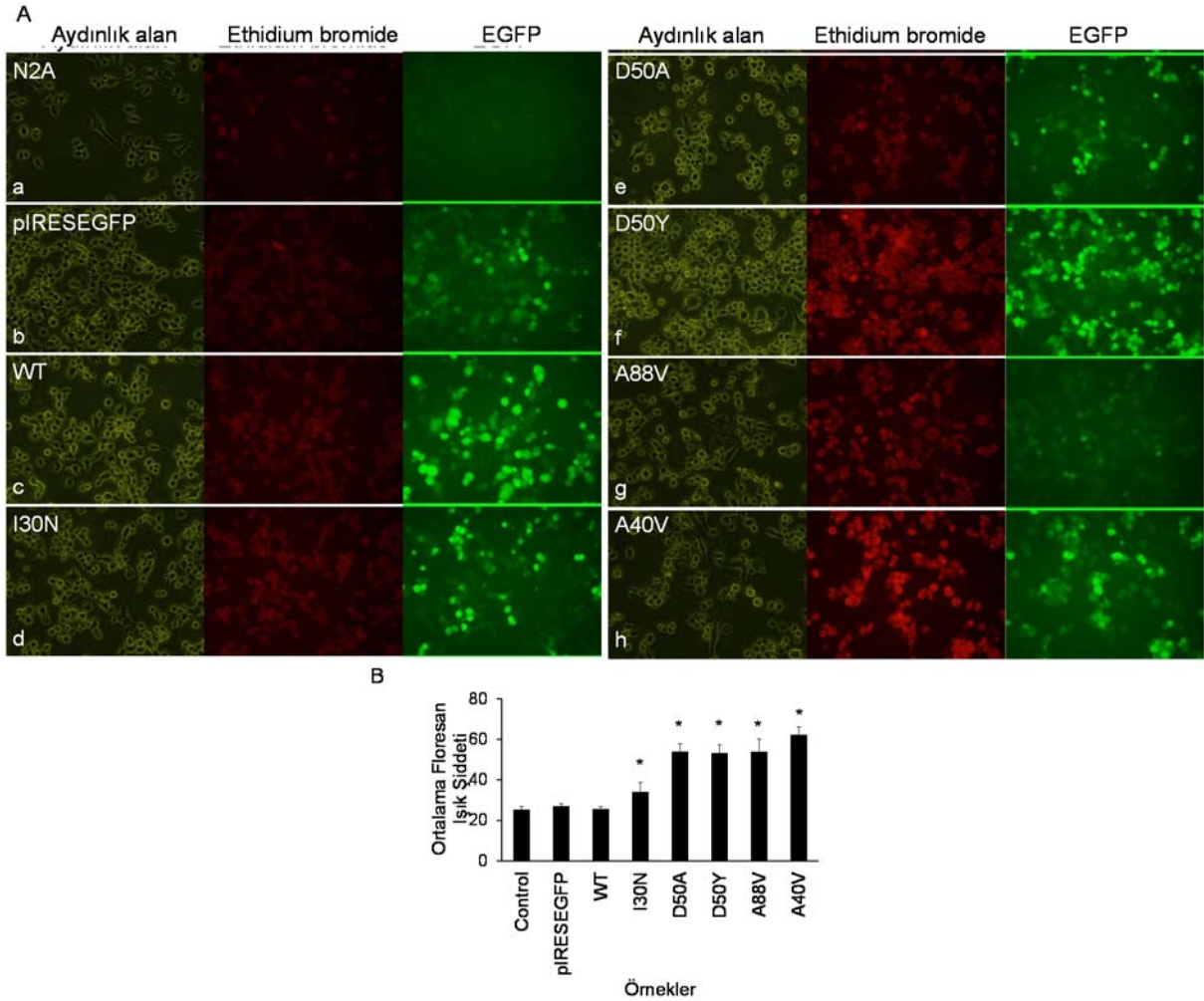


Şekil 13. Neurobiotin boya alım analizleri. A) pIRES2EGFP vektörüyle transfekte edilen hücrelerde yeşil sinyal EGFP'yi, kırmızı sinyal neurobiotin'i ve mavi sinyal DAPI'yi göstermektedir. B) Üç defa tekrarlanan deneyler sonucunda çekilen resimler ImageJ programında analiz edilmişlerdir. * $p<0.05$ WT, I30N, D50A, D50Y, A88V ve A40V'nin pIRESEGF ile karşılaştırılması, ** $p<0.05$, I30N, D50A, D50Y, A88V ve A40V'nin WT ile karşılaştırılmasını göstermektedir.

Üç defa tekrarlanan deneylerde 10 farklı bölgeden resimler çekilerek NB ışık şiddetinin tayini için analizler yapılmıştır (Şekil 13B). Buna göre Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V bulunan hücrelerdeki ortalama kırmızı floresan ışık şiddetinin sadece vektör ve WTCx26 bulunan hücrelerdeki ortalama ışık şiddetine oranla %69 ile %111 oranında arttığı gözlenmiştir (Şekil 13B). Bu da KID sendromuna neden olan Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının N2A hücrelerinde sürekli açık olan Cx26 yarım kanalları yaptığına işaret etmektedir.

Mutasyonların sürekli açık olan yarım kanal yapma potansiyelleri NB'den farklı özellikleri olan EtBr boya alım deneyleri ile de teyit edilmiştir. Bu deneylerde transfekte edilmeyen ve pIRES2-EGFP2 vektörü içeren hücreler negatif kontrol (Şekil 14 a ve b) ve Cx26A40V bulunduran

hücreler ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 14 h). Örnek resimlerde aydınlık alan hücreleri, kırmızı EtBr sinyali ve yeşil EGFP sinyaliyle transfekte edilen hücreleri göstermektedir. Negatif kontrol hücrelerinde kırmızı EtBr sinyali oldukça zayıf olmasına rağmen Cx26A40V bulunan hücrelerde yoğun bir kırmızı sinyal gözlenmesi deneyin istenilen şekilde çalıştığını göstermektedir. Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V bulunan hücrelerde kırmızı ışık şiddetinin sadece vektör ve WTCx26 bulunan hücrelerden daha yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 14 d, e, f, g ile 14 a, b, c arasında). Üç defa tekrarlanan deneylerde 10 farklı bölgeden resimler çekilerek EtBr ışık şiddetinin tayini için analizler yapılmıştır (Şekil 14 B). Buna göre Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V bulunan hücrelerdeki ortalama kırmızı floresan ışık şiddetinin sadece negatif kontrol ve WTCX26 bulunan hücrelerdeki ortalama ışık şiddetine oranla %33 ile %111 oranında arttığı gözlenmiştir (Şekil 14 B). Bu da KID sendromuna neden olan Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının N2A hücrelerinde sürekli açık olan Cx26 yarım kanalları yaptığını teyit etmektedir.

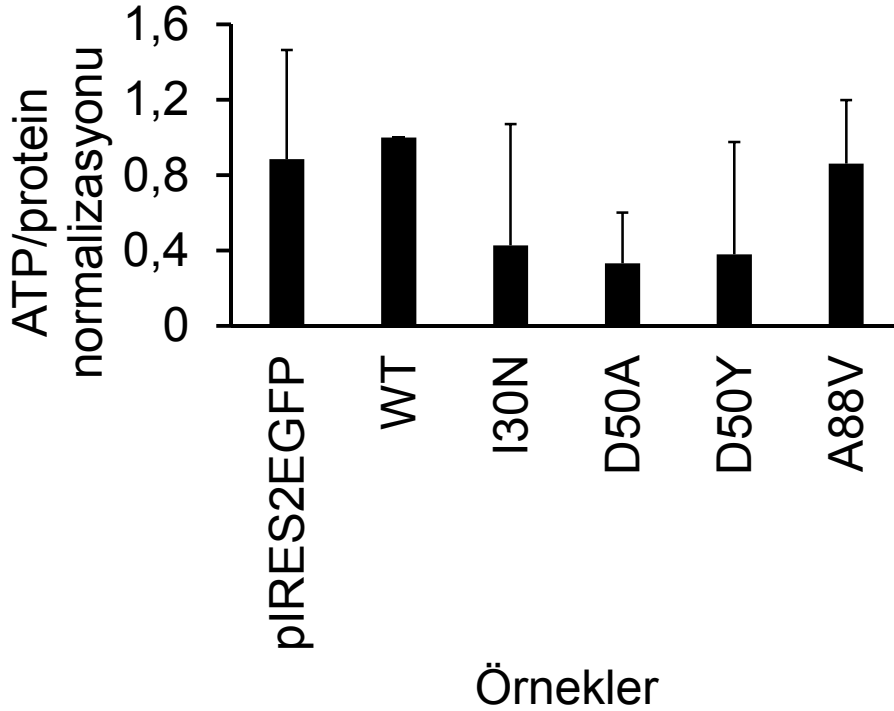


Şekil 14. Ethidium bromide alım analizleri. A) pIRES2EGFP vektörüyle transfekte edilen hücrelerde yeşil sinyal EGFP'yi, kırmızı sinyal ethidium bromide'ı ve aydınlık alan ise hücreleri göstermektedir. B) Üç defa tekrarlanan deneyler sonucunda çekilen resimlerin analizler

ImageJ programında analiz edilmiştir. * $p < 0,05$ I30N, D50A, D50Y, A88V ve A40V'nin Control, pIRESEGFP ve WT ile karşılaştırılması.

4.6 Cx26 mutasyonlarının hücrelerden hücre dışına ATP salınımlarına etkisi

KID sendromuna neden olan Cx26 mutasyonları sürekli aktif kanallar yaparak hücre içinden hücre dışına kontrolsüz molekül salınımına neden olabilirler. Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonu bulunduran hücrelerin hücre dışına ATP salınımı yapıp yapmadıkları Luciferase ışımaya dayalı ATP saptama kitiyle belirlenip karşılaştırılmıştır (Şekil 15). Deneyler sonucunda hücrelerin tutulduğu medyadan ölçülen Luciferase sinyalleri, toplam protein miktarlarına oranlarak normalize edilmiştir. Üçlü olarak tekrarlanan deneyler sonucunda Cx26WT bulunduran hücrelerden salınan ATP miktarlarıyla Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V DNA'sı bulunduran hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Örnekler

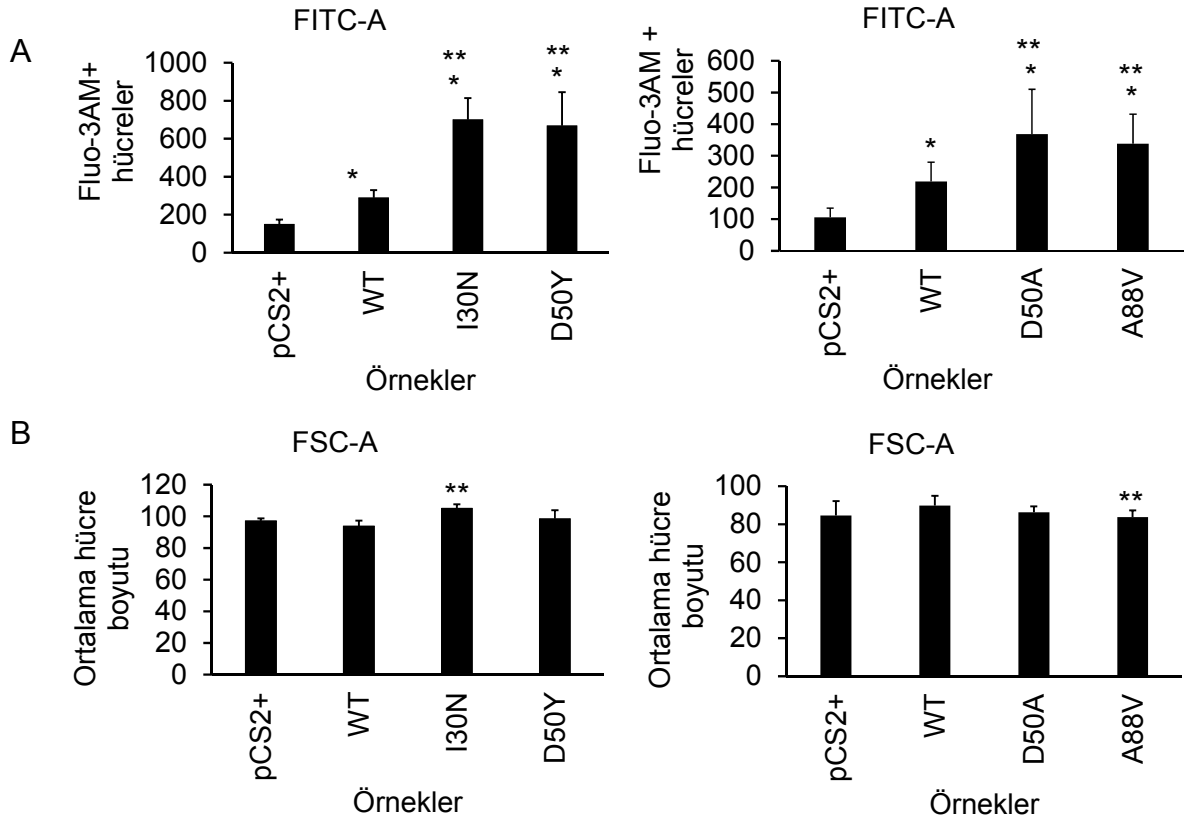
Şekil 15. N2A hücrelerinden hücre dışına ATP salınım miktarları. Hücrelerin hücre dışına saldıkları ATP miktarı ATP belirleme kitiyle saptanmış ve hücre içindeki toplam protein miktarına normalize edilmiştir.

4.7 Cx26 KID sendromu mutasyonlarının hücrelerdeki kalsiyum miktarlarına etkisi

Epidermisteki kalsiyum sinyalleri epiderminin gelişmesi ve devamlılığının sağlanmasında önemli roller oynamaktadır ve kalsiyum sinyallerindeki anormalliklerin farklı türden deri hastalıklarına neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle KID sendromuna neden olan Cx26 mutasyonlarının hücrelerdeki kalsiyum sinyallerine ve/veya regülasyonunu etkileyip

etkilemediği araştırılmıştır. N2A hücrelerindeki kalsiyum miktarları Fluo-3AM boyası ve akış sitometresi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 16A). Buna göre, hücre içindeki kalsiyum miktarlarında I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarını içeren hücrelerde sadece vektör ya da Cx26WT bulunduran hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar (1,5-2,4 kat) gözlenmiştir (Şekil 16A). Bu da mutasyonların N2A hücrelerindeki kalsiyum mekanizmalarında anormalliklere neden olarak hücrelerde fazla kalsiyum birikmesine neden olduğuna işaret etmektedir.

Sürekli açık olarak faaliyet gösteren connexon yarım kanalları hücre dışından hücre içine molekül ve/veya sıvı alımını sağlayarak hücrelerin boyut olarak genişlemelerine neden olabilir. KID sendromu mutasyonlarının N2A hücrelerinin boyutlarına olan etkisi akış sitometresinde ileri saçılım oranlarının belirlenmesiyle tespit edilmiştir (Şekil 14B). Buna göre Cx26I30N bulunan hücrelerin vektör, Cx26WT, D50A ve D50Y bulunduran hücelere göre boyutlarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. Ek olarak, Cx26A88V bulunan hücrelerin vektör, Cx26WT, I30N, D50A ve D50Y bulunduran hücelere göre daha küçük oldukları gözlenmiştir (Şekil 16B). Bu da KID sendromuna neden olan mutasyonların farklı mekanizmalarla hücre fizyolojisine etki edeceğine işaret etmektedir.



Şekil 16. Hücre içindeki kalsiyum miktarlarının ve hücre boyutlarının karşılaştırılması. A) Kalsiyum belirteci olan Fluo-3AM boyasıyla yüklenen N2A hücrelerindeki kalsiyum miktarları akış sitometresiyle ölçülmüştür. * p<0,05 WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V'nin pCS2+ ile

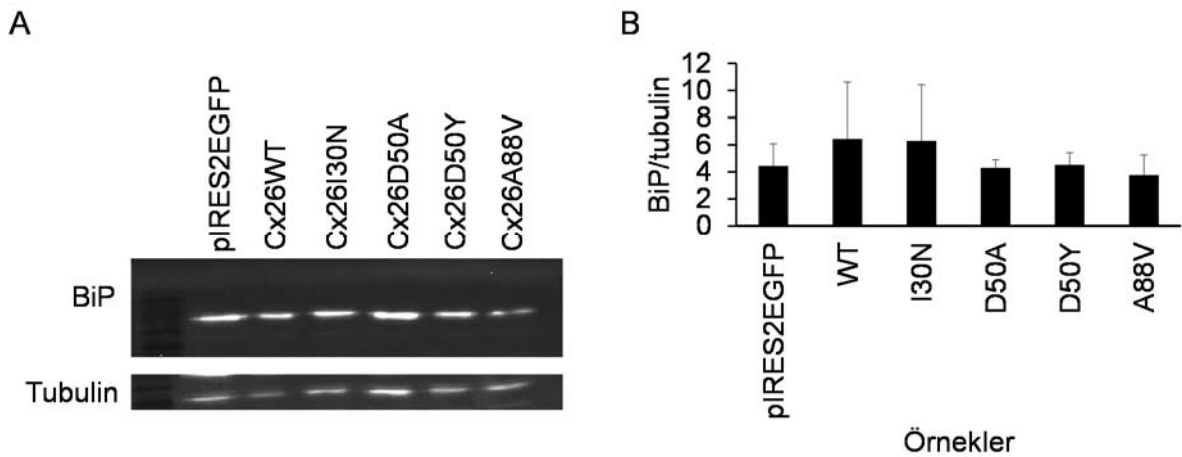
karşılaştırılması, $**p<0,05$, I30N, D50A, D50Y ve A88V'nin WT ile karşılaştırılmasını göstermektedir. B) Hücre boyutları akış sitometresinde ileri saçılım değerlerinin tespit edilmesiyle karşılaştırılmıştır. $**p<0,05$, I30N ve A88V'nin WT ile karşılaştırılmasını göstermektedir.

4.8 Cx26 KID sendromu mutasyonlarının keratinosidler üzerindeki etkileri

Önerilen çalışmada öncelikle KID sendromuna neden olan mutasyonların gap junction bulundurmayan hücrelerdeki özellikleri ortaya konmuştur. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçların keratinosidlerde nasıl etkiler yaptığının araştırılması için Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V keratinosid hücre hattına transfekte edilerek fonksiyonel analizler yapılmıştır. Keratinosid primer hücrelerinde transfeksiyon verimliliği N2A hücrelerine oranla çok düşük olduğu ve bu şekilde beklenen etkilerin gözlenemeyeceği düşünüldüğü için çalışmalara HaCaT keratinosid hücrelerinde devam edilmiştir. Bu hücrelerdeki transfeksiyon verimliliği %60-70 seviyelerinde gözlenmiştir. Bu N2A hücrelerinin transfeksiyon verimliliğinden düşük olmasına rağmen (%90 seviyelerinde), keratinosid hücrelerinde Cx26 mutasyonlarından kaynaklı değişimlerin gözlemleneceğine olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

4.8.1 Cx26 mutasyonlarının keratinosidlerde protein biyosentezine olan etkileri

Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının N2A hücrelerinde Cx26 proteinin hücre zarında gap junction plakaları oluşturmasını engellediği gözlenmiştir. Aynı zamanda Cx26 mutasyonlarının bu hücrelerde katlanmamış protein cevabı yolak belirteçlerinden GRP78/BiP protein sentezini etkilemediği gözlenmiştir. Cx26 mutasyonlarının keratinosidlerde nasıl davrandığını tespit etmek amacıyla WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V ifade edilen HaCaT HaCaT'larda GRP78/BiP protein miktarları Western blot analiziyle karşılaştırılmıştır (Şekil 17).

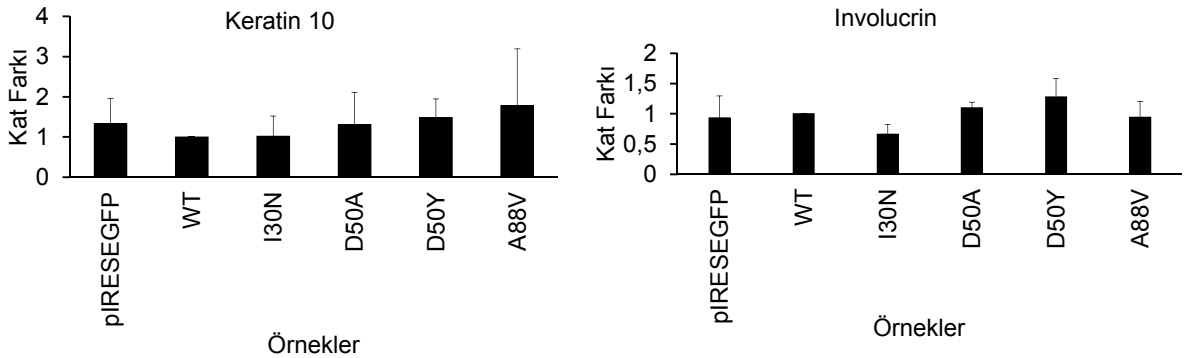


Şekil 17. Cx26 mutasyonlarının ER stres belirteçlerinden BiP protein sentezine etkileri. A) Mutant proteinlerin HaCaT keratinosid hücrelerinde katlanmamış protein cevabı yolak belirteçlerinden olan BiP proteini sentezini etkilemediği gözlenmiştir. B) Üç tekrarlı yapılan deneylerde kontrol ve mutant bulunan hücreler arasında BiP üretiminde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir.

Deneylerde tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmış ve GRP78/BiP sinyali tubulin sinyaline normalize edilmiştir. Örnek jel görüntüsünde gözleendiği üzere farklı vektörlerle transfekte edilen hücrelerde BiP miktarında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 17A). Üç defa tekrarlanan deneylerdeki BiP/tubulin normalizasyonun ortalamaları alınarak gruplar karşılaştırılmış ve mutasyonların GRP78/BiP protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara neden olmadığı gösterilmiştir (Şekil 17B).

4.8.2 KID sendromu mutasyonlarının keratinosid farklılaşma belirteçlerine etkileri

KID sendromuyla ilişkili Cx26 mutasyonlarının hastalarda üst derinin kalınlaşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu kalınlaşmanın keratinosidlerdeki farklılaşma mekanizmalarının bozulmasından kaynaklanmış olduğu düşünülerek Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V bulunan hücrelerin farklılaşma seviyeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 18). Bu amaçla mutant klonları içeren hücrelerdeki farklılaşma oranını belirlemek amacıyla keratin 10 (spinous layer belirteci) ve involucrin (granular layer belirteci) genlerinin ifade edilme oranları tayin edilmiştir. Üç tekrarlı (triplicate) olarak yürütülen deneylerde numune sayısı da üç olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, normal Cx26 bulunan hücrelerdeki mRNA seviyelerine normalize edilerek karşılaştırılmıştır (Şekil 18). Buna göre Cx26 mutasyonlarının keratinosid hücrelerinde epidermal belirteçlerinden keratin10 ve involucrin mRNA miktarlarında anlamlı değişimlere yol açmadığı gözlenmiştir. Bu da Cx26 mutasyonlarının keratinosid hücrelerinin farklılaşma seviyelerinde bir değişime neden olmadığına işaret etmektedir.

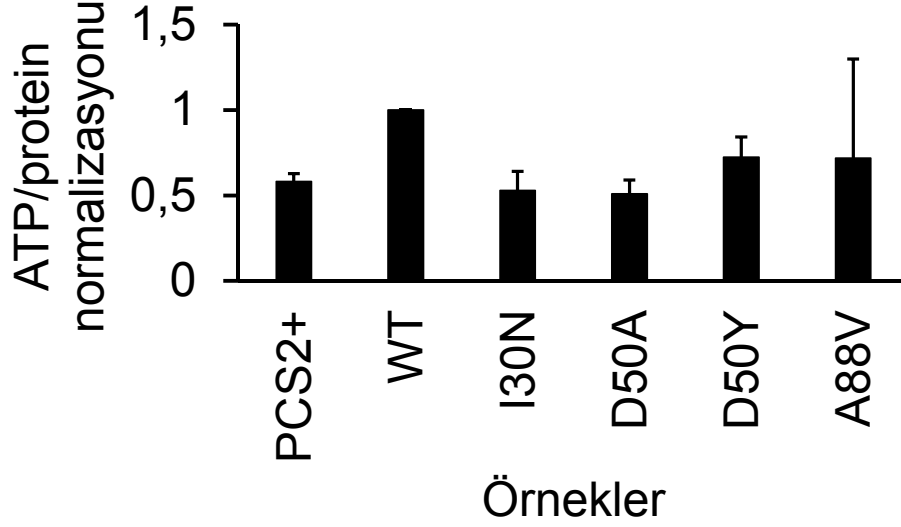


Şekil 18. Mutasyonların HaCaT farklılaşmasına etkileri. Keratin10 ve involucrin farklılaşma belirteçlerinin mRNA seviyeleri RT-PCR ile belirlenip gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

4.8.3 Mutasyonların keratinosidlerin hücre dışına ATP salınımlarına etkileri

KID sendromuna neden olan Cx26 mutasyonları HaCaT hücrelerinde sürekli aktif kanallar yaparak hücre içinden hücre dışına kontrolsüz molekül salınımına neden olabilirler. Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonu bulunduran hücrelerin hücre dışına ATP salınımı yapıp yapmadıkları Luciferase sinyaline dayalı ATP saptama kitiyle belirlenip karşılaştırılmıştır (Şekil 19). Deneyler sonucunda hücrelerin 20 dakika boyunca tutulduğu 1XPBS'den elde edilen

Luciferase sinyalleri, toplam protein miktarlarına oran olarak normalize edilmiştir. Üçlü olarak tekrarlanan deneyler sonucunda Cx26WT bulunduran hücrelerden salınan ATP miktarlarıyla Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V cDNA'sı bulunduran hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 19).



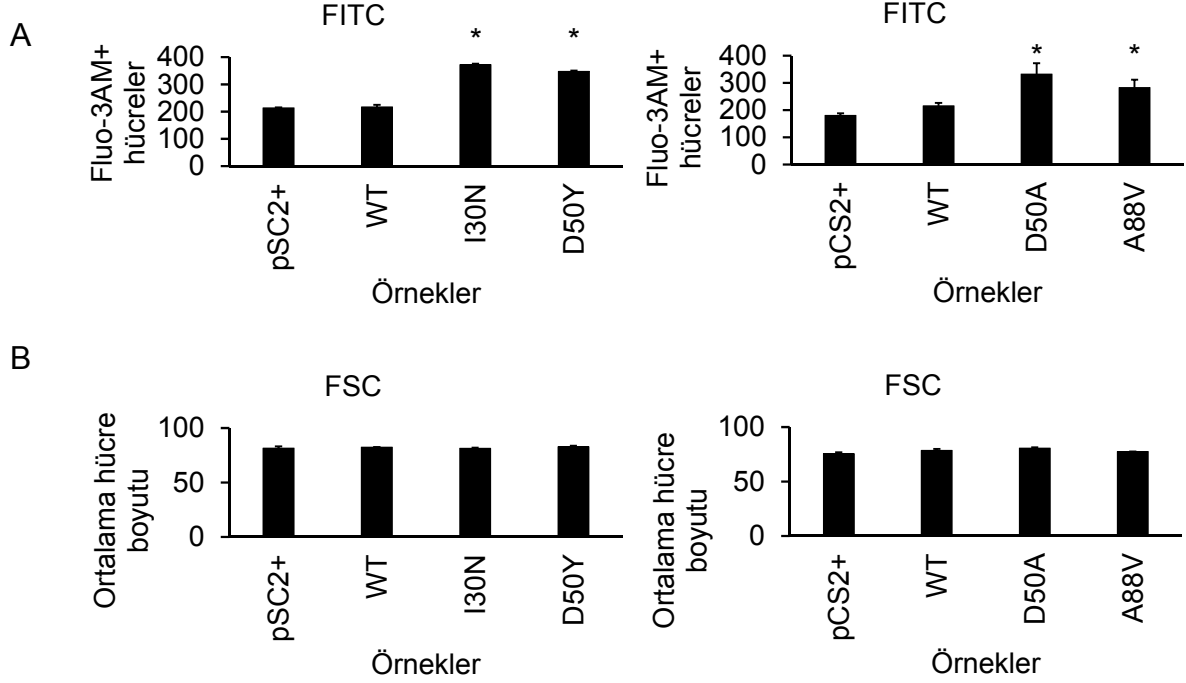
Şekil 19. HaCaT hücrelerinden hücre dışına ATP salınım miktarları. Keratinosidlerin hücre dışına saldıkları ATP miktarı ATP belirleme kitiyle saptanmış ve hücre içindeki toplam protein miktarına normalize edilmiştir.

4.8.4 Mutasyonların keratinosidlerin hücrelerdeki kalsiyum miktarlarına etkileri

Epidermisteki kalsiyum sinyalleri buradaki hücrelerin gelişmesi ve homeostazilerinin sağlamlığında önemli roller oynamaktadır. Bu amaçla KID sendromuna neden olan Cx26 mutasyonlarının keratinosid hücrelerindeki kalsiyum sinyallerini ve/veya regülasyonunu etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. HaCaT hücrelerindeki kalsiyum miktarları Fluo-3AM boyası ve akış sitometresi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 20A). Buna göre, hücre içindeki kalsiyum miktarlarında I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarını içeren hücrelerde sadece vektör ya da Cx26WT bulunduran hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar (1,3-1,7 kat) gözlenmiştir (Şekil 20A). Bu da mutasyonların keratinosidlerde kalsiyum mekanizmalarında anormalliklere neden olarak hücrelerde kalsiyum birikmesine neden olduğuna işaret etmektedir.

Sürekli açık olarak faaliyet gösteren yarı kanallar hücre dışından hücre içine molekül ve sıvı alımını sağlayarak hücrelerin boyut olarak büyümesine neden olabilir. KID sendromu mutasyonlarının HaCaT hücrelerinin büyüklüğüne olan etkisi akış sitometresiyle tespit edilmiştir (Şekil 20 B). Buna göre Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V bulunduran hücreler arasında boyut olarak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir (Şekil 20 B). Bu da

KID sendromuna neden olan mutasyonların keratinosidlerde N2A hücrelerinden farklı etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir.



Şekil 20. Hücre içindeki kalsiyum miktarlarının ve hücre boyutlarının karşılaştırılması. A) Kalsiyum belirteci olan Fluo-3AM boyasıyla yüklenen HaCaT hücrelerindeki kalsiyum miktarları akış sitometresiyle ölçülmüştür. * $p < 0,05$ I30N, D50A, D50Y ve A88V'nin WT ve pCS2+ ile karşılaştırılması. B) Hücre boyutları akış sitometresinde ileri saçılım değerlerinin tespit edilmesiyle karşılaştırılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

KID sendromuna neden olduğu gösterilmiş yeni Cx26 mutasyonlarının moleküler mekanizmalarının anlaşılmasını amaçlayan bu projede, Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının gap junctional communication bulunmayan N2A ve HeLa hücrelerinde Cx26 proteininin hücredeki lokalizasyonu etkileyerek proteinlerin hücre zarında gap junction plakaları oluşturmalarını engelledikleri gözlenmiştir. Buna karşılık, I30N ve A88V mutant proteinlerinin Western blot analizlerinde tespit edilmediği ve D50A ve D50Y mutasyonlarının Cx26 protein miktarında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra mutasyonları içeren hücrelerde Cx26 mRNA miktarının arttığı belirlenmiştir. Mutasyonların gap junction plakaları oluşturmamaları protein biyosentez yolağında meydana gelen problemlerden kaynaklandığı düşünülerek mutant proteinlerin hücre içinde ER'da birikerek katlanmamış protein cevabını (UPR) tetikleyip tetiklemediği hem Western blot hem de immunohistokimyasal analizlerle araştırılmıştır. Western blot sonucunda UPR belirteçlerinden GRP78/BiP protein seviyelerinde WT ve mutant Cx26 bulunduran N2A veya HaCaT

hücrelerinde farklılık gözlenmemiştir. İmmunokimyasal boyamalar sonucunda da Cx26 ve BiP proteinlerinin hücre içinde çok az miktarda örtüştükleri gözlenmiştir. Aynı doğrultuda mutasyonların Golgi aparatında birikip birikmediği immunohistokimyasal olarak araştırılmış buna göre KID sendromu mutasyonlarının Cx26 proteinin Golgi aparatında birikmesine neden olduğu gösterilmiştir.

Daha önce analizi yapılan KID sendromu mutasyonlarının (A40V, G45E gibi) kurbağa yumurtalarında ve memeli hücrelerinde sürekli olarak açık bulunan yarım kanallar oluşturdukları gösterilmiştir (Montgomery vd., 2004; Gerido vd., 2007; Lee vd., 2009). Aynı şekilde I30N, D50A, D50Y ve A88V mutant proteinlerinin hücre zarında sürekli olarak açık olan kanallar yapıp yapmadıkları floresan boya alım deneyleriyle test edilmiş ve mutant Cx26 içeren hücrelerin kontrol ve Cx26WT içeren hücelere oranla %33 ile %110 arasında değişen miktarlarda daha çok neurobiotin ve ethidium bromide boyası alımını sağladıkları gözlenmiştir. Bu da KID sendromuna neden olan Cx26 mutasyonlarının benzer şekillerde çalışarak proteinlerin sürekli aktif olan yarım kanallar yapmalarına neden olduğuna işaret etmektedir. Daha sonra, bu yarım kanallardan N2A ya da HaCaT hücrelerinde hücre dışına ATP salınımının olup olmadığı araştırılmıştır. ATP salınım miktarlarında mutant ve WTCx26 bulunduran hücreler arasında anlamlı farklılıklar gözlenmemesine rağmen, mutant protein bulunduran hücrelerde WT ve kontrol hücelere oranla hücre içindeki kalsiyum miktarlarında 1,5-2,4 kat (N2A hücreleri) ile 1,3-1.7 kat (HaCaT) oranlarında artışlar gözlenmiştir. Bunun yanı sıra I30N bulunan N2A hücrelerinin boyutlarında WT ve diğer mutasyonları bulunduran hücelere göre %12 oranında artma ve A88V mutasyonu bulunduran hücrelerin normal ve diğer mutasyonları bulunduran hücelere oranla boyutlarında %7 oranında küçülme olduğu gözlenmiştir. HaCaT hücrelerinde, N2A hücrelerinden farklı olarak mutasyonlar hücrelerin boyutlarında bir değişime neden olmamıştır.

A88V ve I30N ile transfekte edilen hücrelerde Western blot ile Cx26 proteini belirlenememiştir. A88V hücrelerinde transfeksiyondan sonra büyük oranlarda hücre ölümleri gerçekleşmekte, bu da protein elde etmek için kullanılan transfekte edilmiş hücre sayısında önemli oranda azalmaya neden olmaktadır. Bu durumda yeterince Cx26A88V proteini elde edilememekte ve bunun da Western blot analizlerinde Cx26 proteinin gözlenmesini etkilediği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, I30N mutasyonu protein stabilitesini D50A ve D50Y mutasyonlarına göre daha fazla etkileyerek izolasyon sırasında yeterince protein elde edilmesini engelleyerek, Cx26 proteinini gözlemlememizi etkileyebilir. Buna karşılık mRNA miktarlarında 4-6 kat artış gözlenmesi, mutasyonların protein biyosentezinde problemlere neden olduğuna işaret etmektedir. Hücreler mutant Cx26 cDNA'larından eşit miktarlarda protein yapmak amacıyla daha fazla miktarda mRNA yapmakta fakat bunların bir kısmının proteine dönüşmediği düşünülmektedir. Bunun yanında, mutasyonları bulunduran hücreler, hücre zarına giden



protein oranını artırmak amacıyla da mRNA üretim miktarında artmalara neden olabilir. Son olarak, mutasyonların proteinlerin yarı ömürlerini ya da stabilitelerini etkileyerek daha az proteinin gözlenmesine neden oldukları düşünülmekte, bundan sonraki aşamalarda Cx26 protein ve kanal yıkım yollarının araştırılması planlanmaktadır.

Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının hücre zarında gap junction plakaları oluşturmamaları her ne kadar mutant proteinlerin hücre zarına taşınmalarında bir problem olduğunu işaret etse de mutant proteinlerin biyosentetik yolda bulunan organellerden olan ER'da birikmediği fakat Golgi aygıtında bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca floresan boya alım deneyleri göstermektedir ki proteinler hücre zarına gidip fonksiyonel kanallar yapmaktadır. Bu mutant proteinlerin hücre zarında Cx26 yarım kanalları yapmakta olduğuna ve de proteinlerin hücre zarına gittiklerine işaret etmektedir. İmmunokimyasal analizlerde Cx26WT, I30N, D50A, D50Y ve A88V sinyallerinin hücre çeperinin (actin boyamasıyla gösterilen) bazı bölgelerinde bulunduğu gözlenmiştir. Proteinlerin hücre zarındaki lokalizasyonları için konfokal mikroskopla görüntüleme ya da immunohistokimyasal boyama sırasında hücre zarının floresan boyalarla boyanması gerekli gözlemlerin yapılmasına olanak tanıyacaktır.

Cx26 proteinlerinin ER'dan hücre zarına taşınma mekanizmalarında Golgi aygıtını bypas ederek gittiği gösterilmiştir (Qu vd., 2009). Fakat, çalışmalarımızda Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarını taşıyan proteinlerin önemli miktarda Golgi aparatı belirteci Golgin97 ile örtüştüğü gözlenmiştir. Benzer bir gözlem sendromik olmayan sağırlığa neden olan Cx26R184Q mutasyonu için de yapılmıştır (Su vd., 2010). Belirtilen mutasyonların hücre zarına giderken nasıl olup da normal Cx26'dan farklı bir yol izlediği bilinmemektedir. Mutasyonların protein yapısında meydana getirdiği değişimler proteinlerin Golgi aygıtında birikmesine ya da proteinlerin alternatif transport mekanizmaları kullanmalarına neden olabileceği düşünülmektedir.

Cx26WT yarım kanallarının ATP (507 MW ve -4 yük) molekülüne geçirgen olduğu gösterilmiştir (Huckstepp vd., 2010; Fiori vd., 2014). Bu nedenle sürekli açık bulunan yarım kanallar yaptıkları gösterilen I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının hücrelerden dış ortama WT'dan daha çok oranda ATP salınımı yapacakları düşünülmüştür. Fakat hem N2A hem de HaCaT hücrelerinden hücre dışına salınan ATP miktarlarında WT ve mutasyonlar arasında bir fark gözlenmemiştir. Mutasyonların yarım kanalların yapısında meydana getirdikleri değişimler ATP'den daha küçük olan neurobiotin (NB, 287 MW) ve ethidium bromide (EtBr, 264 MW) gibi floresan boya geçişinde artmalara neden oldukları öngörülmektedir. Benzer şekilde, ATP ile NB ve EtBr arasındaki yük farkı da mutant yarım kanallardan ATP geçişini limitleyici bir faktör olarak düşünülmektedir. Alternatif olarak mutasyonlar bilinmeyen mekanizmalarla hücre içindeki ATP miktarında önemli ölçüde azalmalara neden olabilir, bu da mutant yarım



kanallardan hücre dışına salınan ATP miktarını etkileyebilir. Bu amaçla WT ve mutant hücrelerdeki ATP konsantrasyonlarının karşılaştırılması önerilmektedir.

Mutasyonlar ATP salınım oranlarında bir değişime neden olmamakla beraber, N2A ve HaCaT'larda hücre içindeki kalsiyum seviyelerinde WT'a göre 1,3 ile 2,4 kat artışa neden olmuştur. Bu da mutasyonların kalsiyum mekanizmalarını etkileyerek hücre içinde kalsiyum miktarının artmasına neden olduğuna işaret etmektedir. Sürekli açık kalan kanallardan hücre dışına salgılanan moleküller (kalsiyum, ikincil metabolitler gibi) parakrin sinyallerle hücrelerdeki kalsiyum sinyallerini değiştirebilirler. Parakrin sinyal olarak görev yapan bu moleküllerden biri de ATP olmasına rağmen, proje çerçevesinde hücre içinden dışına salınan ATP miktarlarında anlamlı değişimler gözlenmemesi, kalsiyum sinyallerinin aktivasyonunda farklı moleküllerin rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Bu moleküllerin tayin edilmesi hücrelerde yarım kanalların hangi mekanizmalarla kalsiyum sinyallerinin aktivasyonunu sağladığına ışık tutacaktır. Kalsiyum miktarlarının korunması epidermisin devamlılığı ve fonksiyonları için önemli etkenlerden biridir ve kalsiyum miktarlarında meydana gelebilecek herhangi bir değişim epidermal hastalıkların veya problemlerin ortaya çıkmasına neden olabilir (Pani ve Singh, 2008). Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının hücre içindeki kalsiyum sinyallerinin artmasına neden olduğunun gösterilmesi, mutasyonların epidermiste yaptığı değişimlerin anlaşılmasına bir ölçüde katkı sunmaktadır. Hücre içindeki kalsiyum sinyallerindeki artışlar keratinosidlerin farklılaşma mekanizmalarını tetikleyerek hücrelerin yapılarını etkileyebilir. Keratinosid farklılaşması için RT-PCR ile farklılaşma belirteçlerine (Keratin 10 ve involucrin) bakılmış fakat gruplar arasında anlamlı değişimler gözlenmemiştir. Buna karşılık, kalsiyum sinyalleri hücrelerin çoğalma mekanizmalarını etkileyerek normalden daha çok hücrenin bölünmesine ve böylece üst derinin normalden daha kalın olmasına neden olabilir. HaCaT'larda transfeksiyon verimliliğinin istenilen düzeyde olmaması ve kalıcı transfeksiyon elde etme denemelerinin başarısız olması nedeniyle mutasyonların hücre çoğalmasına etkileri gözlenmemiştir. Ayrıca, transfeksiyondan sonra hücrelerdeki açık yarım kanalların kapatılması için eklenen kalsiyum klorür de hücrelerin çoğalma mekanizmalarının araştırılmasına katkı sağlamıştır. Şöyle ki, diğer KID sendromu mutasyonlarında olduğu gibi, hücrelerin mutantlarla transfeksiyonundan sonra kalsiyum eklenmediği takdirde transfekte edilmiş hücrelerin önemli bir oranının 24 saat içinde öldüğü gözlenmektedir (Gerido vd., 2007; Lee vd., 2009; Terrinoni vd., 2010). Bu da planlanan deneyler için kullanılacak hücre sayısının yetersiz olmasına neden olmaktadır.

Cx26I30N ve A88V mutasyonlarının hücrelerin boyutlarında değişimlere neden oldukları gözlenmiştir. Cx26I30N mutasyonu N2A hücrelerinin boyutlarının artmasına ve A88V hücrelerinin boyut olarak küçülmesine neden olmuştur. Cx26A88V ile transfekte edilen hücrelerde diğer mutasyonlara oranla daha çok ölü hücre gözlenmiştir (mikroskopik gözlem,

data gösterilmemiştir). Benzer şekilde, A88V mutasyonunun diğer mutasyonlara göre ölümcül olduğu bilinmektedir (Koppelhus vd., 2010). Bu gözlemler A88V'nin test edilen diğer mutasyonlara göre daha ağır sonuçları olduğuna işaret etmektedir. A88V mutasyonunu bulunduran hücrelerin boyutlarının küçülme nedeninin, ölüme giden hücrelerin yüzeyden kalkıp daha yuvarlak bir şekil almalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşılık I30N mutasyonu N2A hücrelerindeki actin iskelet yapısını etkileyerek hücrelerin genişlemesine yol açabilir. Benzer bir durumun HaCaT'larda gözlenmemiş olması bu hücrelerdeki kapsamlı keratin intermediate filament ağlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Özetle bu çalışma sonucunda daha önceki çalışmalarda analiz edilen KID sendromu mutasyonları gibi, Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının da hücrelerde sürekli açık olan yarım kanallar oluşturdukları gözlenmiştir. Bunun yanında mutasyonlar hem N2A hem de keratinosidlerde hücre içindeki kalsiyum miktarının artmasına neden olmuştur. Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının sürekli aktif olan yarım kanallarla hücrelerdeki kalsiyum sinyallerini etkileyerek hangi mekanizmalarla hücrelerin yaşamlarını, farklılaşmalarını veya ölümlerini etkiledikleri ve bu değişimlerin KID sendromu hastalarında görülen semptomlarla ilişkisinin araştırılması hedeflerimiz arasında bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Abrams C. K., Bennett M. V., Verselis V. K., Bargiello T. A. 2002. "Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with x-linked charcot-marie-tooth disease", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6): 3980-4.

Bakirtzis G., Choudhry R., Aasen T., Shore L., Brown K., Bryson S., vd. 2003. "Targeted epidermal expression of mutant connexin 26(d66h) mimics true vohwinkel syndrome and provides a model for the pathogenesis of dominant connexin disorders", *Hum Mol Genet*, 12(14): 1737-44.

Beltramello M., Piazza V., Bukauskas F. F., Pozzan T., Mammano F. 2005. "Impaired permeability to ins(1,4,5)p3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness", *Nat Cell Biol*, 7(1): 63-9.

Berger A. C., Kelly J. J., Lajoie P., Shao Q., Laird D. W. 2014. "Mutations in cx30 that are linked to skin disease and non-syndromic hearing loss exhibit several distinct cellular pathologies", *J Cell Sci*, 127(Pt 8): 1751-64.

Bergoffen J., Scherer S. S., Wang S., Scott M. O., Bone L. J., Paul D. L., vd. 1993. "Connexin mutations in x-linked charcot-marie-tooth disease", *Science*, 262(5142): 2039-42.

Beyer E. C., Davis L. M., Saffitz J. E., Veenstra R. D. 1995. "Cardiac intercellular communication: Consequences of connexin distribution and diversity", *Braz J Med Biol Res*, 28(4): 415-25.

Birkenhager R., Prera N., Aschendorff A., Laszig R., Arndt S. 2014. "A novel homozygous mutation in the ec1/ec2 interaction domain of the gap junction complex connexon 26 leads to profound hearing impairment", *BioMed research international*, 2014: 307976.



- Blanpain C., Fuchs E. 2006. "Epidermal stem cells of the skin", *Annual review of cell and developmental biology*, 22: 339-73.
- Bruzzone R., Cohen-Salmon M. 2005. "Hearing the messenger: Ins(1,4,5)p3 and deafness", *Nat Cell Biol*, 7(1): 14-6.
- Bruzzone R., Veronesi V., Gomes D., Bicego M., Duval N., Marlin S., vd. 2003. "Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness", *FEBS Lett*, 533(1-3): 79-88.
- Bruzzone R., White T. W., Paul D. L. 1996. "Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling", *Eur J Biochem*, 238(1): 1-27.
- Bukauskas F. F., Kreuzberg M. M., Rackauskas M., Bukauskiene A., Bennett M. V., Verselis V. K., vd. 2006. "Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: Implications for atrioventricular conduction in the heart", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(25): 9726-31.
- Coutinho P., Qiu C., Frank S., Tamber K., Becker D. 2003. "Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process", *Cell Biol Int*, 27(7): 525-41.
- Das Sarma J., Wang F., Koval M. 2002. "Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization", *J Biol Chem*, 277(23): 20911-8.
- Di W. L., Monypenny J., Common J. E., Kennedy C. T., Holland K. A., Leigh I. M., vd. 2002. "Defective trafficking and cell death is characteristic of skin disease-associated connexin 31 mutations", *Hum Mol Genet*, 11(17): 2005-14.
- Dinkova-Kostova A. T., Fahey J. W., Wade K. L., Jenkins S. N., Shapiro T. A., Fuchs E. J., vd. 2007. "Induction of the phase 2 response in mouse and human skin by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(4): 847-51.
- Djalilian A. R., McGaughey D., Patel S., Seo E. Y., Yang C., Cheng J., vd. 2006. "Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response", *J Clin Invest*, 116(5): 1243-53.
- Dobrowolski R., Sommershof A., Willecke K. 2007. "Some oculodentodigital dysplasia-associated cx43 mutations cause increased hemichannel activity in addition to deficient gap junction channels", *J Membr Biol*, 219(1-3): 9-17.
- Essenfelder G. M., Bruzzone R., Lamartine J., Charollais A., Blanchet-Bardon C., Barbe M. T., vd. 2004. "Connexin30 mutations responsible for hidrotic ectodermal dysplasia cause abnormal hemichannel activity", *Hum Mol Genet*, 13(16): 1703-14.
- Evans W. H., De Vuyst E., Leybaert L. 2006. "The gap junction cellular internet: Connexin hemichannels enter the signalling limelight", *Biochem J*, 397(1): 1-14.
- Evans W. H., Martin P. E. 2002. "Gap junctions: Structure and function (review)", *Mol Membr Biol*, 19(2): 121-36.
- Fiori M. C., Figueroa V., Zoghbi M. E., Saez J. C., Reuss L., Altenberg G. A. 2012. "Permeation of calcium through purified connexin 26 hemichannels", *J Biol Chem*, 287(48): 40826-34.
- Fuchs E. 1990. "Epidermal differentiation", *Current opinion in cell biology*, 2(6): 1028-35.
- Fuchs E. 2007. "Scratching the surface of skin development", *Nature*, 445(7130): 834-42.



- Gerido D. A., DeRosa A. M., Richard G., White T. W. 2007. "Aberrant hemichannel properties of cx26 mutations causing skin disease and deafness", *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(1): C337-45.
- Gerido D. A., White T. W. 2004. "Connexin disorders of the ear, skin, and lens", *Biochim Biophys Acta*, 1662(1-2): 159-70.
- Goodenough D. A. 1974. "Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin", *J Cell Biol*, 61(2): 557-63.
- Goodenough D. A., Paul D. L. 2003. "Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels", *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(4): 285-94.
- Guttman J. A., Lin A. E., Li Y., Bechberger J., Naus C. C., Vogl A. W., vd. 2010. "Gap junction hemichannels contribute to the generation of diarrhoea during infectious enteric disease", *Gut*, 59(2): 218-26.
- Harris A. L. 2001. "Emerging issues of connexin channels: Biophysics fills the gap", *Quarterly reviews of biophysics*, 34(3): 325-472.
- Huckstepp R. T., id Bihi R., Eason R., Spyer K. M., Dicke N., Willecke K., vd. 2010. "Connexin hemichannel-mediated co2-dependent release of atp in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity", *J Physiol*, 588(Pt 20): 3901-20.
- Jonard L., Feldmann D., Parsy C., Freitag S., Sinico M., Koval C., vd. 2008. "A familial case of keratitis-ichthyosis-deafness (kid) syndrome with the gjb2 mutation g45e", *Eur J Med Genet*, 51(1): 35-43.
- Kanno Y., Loewenstein W. R. 1964. "Low-resistance coupling between gland cells. Some observations on intercellular contact membranes and intercellular space", *Nature*, 201: 194-5.
- Kelly J. J., Simek J., Laird D. W. 2014. "Mechanisms linking connexin mutations to human diseases", *Cell Tissue Res*.
- Kelsell D. P., Dunlop J., Stevens H. P., Lench N. J., Liang J. N., Parry G., vd. 1997. "Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness", *Nature*, 387(6628): 80-3.
- Kelsell D. P., Wilgoss A. L., Richard G., Stevens H. P., Munro C. S., Leigh I. M. 2000. "Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family", *Eur J Hum Genet*, 8(6): 469-72.
- King T. J., Lampe P. D. 2005. "Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues", *Biochim Biophys Acta*, 1719(1-2): 24-35.
- Koppelhus U., Tranebjaerg L., Esberg G., Ramsing M., Lodahl M., Rendtorff N. D., vd. 2011. "A novel mutation in the connexin 26 gene (gjb2) in a child with clinical and histological features of keratitis-ichthyosis-deafness (kid) syndrome", *Clin Exp Dermatol*, 36(2): 142-8.
- Kretz M., Euwens C., Hombach S., Eckardt D., Teubner B., Traub O., vd. 2003. "Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice", *J Cell Sci*, 116(Pt 16): 3443-52.
- Kudo T., Ikeda K., Kure S., Matsubara Y., Oshima T., Watanabe K., vd. 2000. "Novel mutations in the connexin 26 gene (gjb2) responsible for childhood deafness in the japanese population", *Am J Med Genet*, 90(2): 141-5.
- Labarthe M. P., Bosco D., Saurat J. H., Meda P., Salomon D. 1998. "Upregulation of connexin 26 between keratinocytes of psoriatic lesions", *J Invest Dermatol*, 111(1): 72-6.
- Laird D. W. 2006. "Life cycle of connexins in health and disease", *Biochem J*, 394(Pt 3): 527-43.



- Lampe P. D., Lau A. F. 2004. "The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication", *Int J Biochem Cell Biol*, 36(7): 1171-86.
- Lawrence T. S., Beers W. H., Gilula N. B. 1978. "Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication", *Nature*, 272(5653): 501-6.
- Lee J. R., Derosa A. M., White T. W. 2009. "Connexin mutations causing skin disease and deafness increase hemichannel activity and cell death when expressed in xenopus oocytes", *J Invest Dermatol*, 129(4): 870-8.
- Lee J. R., White T. W. 2009. "Connexin-26 mutations in deafness and skin disease", *Expert Rev Mol Med*, 11: e35.
- Macari F., Landau M., Cousin P., Mevorah B., Brenner S., Panizzon R., vd. 2000. "Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis", *Am J Hum Genet*, 67(5): 1296-301.
- Maestrini E., Korge B. P., Ocana-Sierra J., Calzolari E., Cambiaghi S., Scudder P. M., vd. 1999. "A missense mutation in connexin26, d66h, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (vohwinkel's syndrome) in three unrelated families", *Hum Mol Genet*, 8(7): 1237-43.
- Marziano N. K., Casalotti S. O., Portelli A. E., Becker D. L., Forge A. 2003. "Mutations in the gene for connexin 26 (gjb2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30", *Hum Mol Genet*, 12(8): 805-12.
- Mese G., Richard G., White T. W. 2007. "Gap junctions: Basic structure and function", *J Invest Dermatol*, 127(11): 2516-24.
- Mese G., Sellitto C., Li L., Wang H. Z., Valiunas V., Richard G., vd. 2011. "The cx26-g45e mutation displays increased hemichannel activity in a mouse model of the lethal form of keratitis-ichthyosis-deafness syndrome", *Mol Biol Cell*, 22(24): 4776-86.
- Mese G., Valiunas V., Brink P. R., White T. W. 2008. "Connexin26 deafness associated mutations show altered permeability to large cationic molecules", *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(4): C966-74.
- Montgomery J. R., White T. W., Martin B. L., Turner M. L., Holland S. M. 2004. "A novel connexin 26 gene mutation associated with features of the keratitis-ichthyosis-deafness syndrome and the follicular occlusion triad", *J Am Acad Dermatol*, 51(3): 377-82.
- Morell R. J., Kim H. J., Hood L. J., Goforth L., Friderici K., Fisher R., vd. 1998. "Mutations in the connexin 26 gene (gjb2) among ashkenazi jews with nonsyndromic recessive deafness", *N Engl J Med*, 339(21): 1500-5.
- Morley S. M., White M. I., Rogers M., Wasserman D., Ratajczak P., McLean W. H., vd. 2005. "A new, recurrent mutation of gjb3 (cx31) in erythrokeratoderma variabilis", *Br J Dermatol*, 152(6): 1143-8.
- Musil L. S., Goodenough D. A. 1993. "Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the er", *Cell*, 74(6): 1065-77.
- Musil L. S., Le A. C., VanSlyke J. K., Roberts L. M. 2000. "Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function", *J Biol Chem*, 275(33): 25207-15.
- Pani B., Singh B. B. 2008. "Darier's disease: A calcium-signaling perspective", *Cell Mol Life Sci*, 65(2): 205-11.



- Pearson R. A., Dale N., Llaudet E., Mobbs P. 2005. "Atp released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation", *Neuron*, 46(5): 731-44.
- Proksch E., Brandner J. M., Jensen J. M. 2008. "The skin: An indispensable barrier", *Exp Dermatol*, 17(12): 1063-72.
- Qu C., Gardner P., Schrijver I. 2009. "The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by connexin 30", *Exp Cell Res*, 315(10): 1683-92.
- Revel J. P., Karnovsky M. J. 1967. "Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver", *J Cell Biol*, 33(3): C7-C12.
- Richard G., Brown N., Ishida-Yamamoto A., Krol A. 2004. "Expanding the phenotypic spectrum of cx26 disorders: Bart-pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in gjb2", *J Invest Dermatol*, 123(5): 856-63.
- Richard G., Rouan F., Willoughby C. E., Brown N., Chung P., Ryyanen M., vd. 2002. "Missense mutations in gjb2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome", *Am J Hum Genet*, 70(5): 1341-8.
- Richard G., Smith L. E., Bailey R. A., Itin P., Hohl D., Epstein E. H., Jr., vd. 1998a. "Mutations in the human connexin gene gjb3 cause erythrokeratoderma variabilis", *Nat Genet*, 20(4): 366-9.
- Richard G., White T. W., Smith L. E., Bailey R. A., Compton J. G., Paul D. L., vd. 1998b. "Functional defects of cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma", *Hum Genet*, 103(4): 393-9.
- Robertson J. D. 1963. "The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains", *J Cell Biol*, 19: 201-21.
- Rouan F., White T. W., Brown N., Taylor A. M., Lucke T. W., Paul D. L., vd. 2001. "Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: Implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation", *J Cell Sci*, 114(Pt 11): 2105-13.
- Saez J. C., Retamal M. A., Basilio D., Bukauskas F. F., Bennett M. V. 2005. "Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms", *Biochim Biophys Acta*, 1711(2): 215-24.
- Saez J. C., Schalper K. A., Retamal M. A., Orellana J. A., Shoji K. F., Bennett M. V. 2010. "Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells", *Exp Cell Res*, 316(15): 2377-89.
- Salomon D., Masgrau E., Vischer S., Ullrich S., Dupont E., Sappino P., vd. 1994. "Topography of mammalian connexins in human skin", *J Invest Dermatol*, 103(2): 240-7.
- Sanchez H. A., Mese G., Srinivas M., White T. W., Verselis V. K. 2010. "Differentially altered ca²⁺ regulation and ca²⁺ permeability in cx26 hemichannels formed by the a40v and g45e mutations that cause keratitis ichthyosis deafness syndrome", *J Gen Physiol*, 136(1): 47-62.
- Stong B. C., Chang Q., Ahmad S., Lin X. 2006. "A novel mechanism for connexin 26 mutation linked deafness: Cell death caused by leaky gap junction hemichannels", *Laryngoscope*, 116(12): 2205-10.
- Su C. C., Li S. Y., Su M. C., Chen W. C., Yang J. J. 2010. "Mutation r184q of connexin 26 in hearing loss patients has a dominant-negative effect on connexin 26 and connexin 30", *Eur J Hum Genet*.
- Terrinoni A., Codispoti A., Serra V., Didona B., Bruno E., Nistico R., vd. 2010. "Connexin 26 (gjb2) mutations, causing kid syndrome, are associated with cell death due to calcium gating deregulation", *Biochem Biophys Res Commun*, 394(4): 909-14.



- Thomas T., Telford D., Laird D. W. 2004. "Functional domain mapping and selective trans-dominant effects exhibited by cx26 disease-causing mutations", *J Biol Chem*, 279(18): 19157-68.
- Tran Van Nhieu G., Clair C., Bruzzone R., Mesnil M., Sansonetti P., Combettes L. 2003. "Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of shigella in epithelial cells", *Nat Cell Biol*, 5(8): 720-6.
- Tsutsumi M., Inoue K., Denda S., Ikeyama K., Goto M., Denda M. 2009. "Mechanical-stimulation-evoked calcium waves in proliferating and differentiated human keratinocytes", *Cell Tissue Res*, 338(1): 99-106.
- Valiunas V., Polosina Y. Y., Miller H., Potapova I. A., Valiuniene L., Doronin S., vd. 2005. "Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering rna by gap junctions", *J Physiol*, 568(Pt 2): 459-68.
- van Steensel M. A., van Geel M., Nahuys M., Smitt J. H., Steijlen P. M. 2002. "A novel connexin 26 mutation in a patient diagnosed with keratitis-ichthyosis-deafness syndrome", *J Invest Dermatol*, 118(4): 724-7.
- Vinken M., Vanhaecke T., Papeleu P., Snykers S., Henkens T., Rogiers V. 2006. "Connexins and their channels in cell growth and cell death", *Cell Signal*, 18(5): 592-600.
- Wei C. J., Xu X., Lo C. W. 2004. "Connexins and cell signaling in development and disease", *Annual review of cell and developmental biology*, 20: 811-38.
- White T. W. 2000. "Functional analysis of human cx26 mutations associated with deafness", *Brain Res Brain Res Rev*, 32(1): 181-3.
- White T. W., Paul D. L. 1999. "Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions", *Annu Rev Physiol*, 61: 283-310.
- Wiszniewski L., Limat A., Saurat J. H., Meda P., Salomon D. 2000. "Differential expression of connexins during stratification of human keratinocytes", *J Invest Dermatol*, 115(2): 278-85.
- Zelante L., Gasparini P., Estivill X., Melchionda S., D'Agruma L., Govea N., vd. 1997. "Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (dfnb1) in mediterraneans", *Hum Mol Genet*, 6(9): 1605-9.
- Zoidl G., Dermietzel R. 2010. "Gap junctions in inherited human disease", *Pflugers Arch*, 460(2): 451-66.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. GÜLİSTAN MEŞE ÖZÇİVİCİ
Proje No:	210T035
Proje Başlığı:	Anormal Çalışan Yarım Kanalların Oluşmasına Yol Açan Cx26 Mutasyonları Epidermisteki Keratinosidlerin Kalsiyum İyon Dengesini Değiştirerek Bu Hücrelerin Farklılaşma Mekanizmalarını Etkiler
Proje Türü:	Kariyer
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2011 - 01/10/2014
Onaylanan Bütçe:	203100.0
Harcanan Bütçe:	163236.06
Öz:	<p>Connexin'lerin oluşturduğu gap junction'lar ve yarım kanallar insan vücudundaki deri gibi bir çok doku ve organın normal olarak faaliyetlerini devam ettirmesinde önemli görevler üstlenirler. Connexin26 (Cx26) mutasyonları hem sendromik olmayan sağırlığa hem de keratitis-ichthyosis-deafness (KID) sendromu gibi deri hastalıklarıyla bağlantılı sendromik sağırlığa neden olmaktadır. Sendromik sağırlığa neden olan mutasyonlar Cx26'nın yeni fonksiyonlar kazanmasına neden olmakta bunun da epidermal hücrelerin fizyolojisini nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir. Bu projede, KID sendromuna neden olduğu gösterilmiş Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının, gap junction iletişimi bulunmayan N2A ve HeLa hücreleriyle, iletişim bulunan HaCaT insan keratinosid hücrelerinde Western blot ile proteinin yapısına, immunohistokimyasal yöntemlerle protein lokalizasyonuna, floresan boya alım deneyleriyle yarım kanal fonksiyonlarına, hücre dışındaki ATP miktarının belirlenmesiyle kanallardan hücre dışına molekül salınım kapasitelerine ve Fluo-3AM boyası ve akış sitometresiyle de kalsiyum sinyallerine olan etkileri araştırılmıştır. Buna göre mutasyonların, Cx26 protein üretimini etkilemediği fakat mutant proteinlerin daha çok hücre içinde biriktikleri ve hücre zarında gap junction plakaları oluşturmadıkları gözlenmiştir. Ayrıca hücre içinde biriken diğer mutasyonlardan farklı olarak, Cx26I30N mutasyonunun hücre içinde çoğunlukla Golgi aygıtında biriktiği gözlenmiştir. Mutant Cx26 proteinleri bulunan hücrelerin Cx26WT bulunduran hücrelere oranla daha çok neurobiotin ve ethidium bromide alımına neden oldukları gözlenmiştir. Mutasyonların hem N2A hem de HaCaT hücrelerinde hücre dışına ATP salınım miktarlarına bir etkisi olmadığı, buna karşılık her iki hücre tipinde hücre içindeki kalsiyum miktarında WTCx26'ya göre 1,3 ile 2,4 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, Cx26I30N, D50A, D50Y ve A88V mutasyonlarının diğer KID sendromu mutasyonları gibi hücrelerde sürekli aktif olan yarım kanallar yaptıkları ve hücrelerdeki kalsiyum mekanizmalarını etkiledikleri gözlenmiştir. Cx26 mutasyonları epidermiste sürekli açık bulunan yarım kanallar oluşturarak, hücre dışına saldıkları moleküllerle kalsiyum sinyallerini otokrin/parakrin sinyallerle etkileyerek keratinosidlerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarında değişimlere yol açabilirler. Bu şekilde, KID sendromu hastalarında gözlenen fenotiplerden biri olan epidermin normalden fazla kalınlaşmasına neden olabilir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Cx26, oluklu bağlantılar, yarım kanallar, epidermis, KID sendromu, keratinosid, kalsiyum regülasyonu
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Projeden Yapılan Yayınlar:	<p>1- Functional analysis of Gap Junction Beta 2 (Connexin26) mutations causing Keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>2- CHARACTERIZATION OF CONNEXIN 26 MUTATIONS CAUSING HEREDITARY SKIN DISORDERS (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>3- The Effect of Connexin 26 Mutations Associated with Keratitis-Ichthyosis Deafness (KID) Syndrome on the Protein Localization and Cellular Ca²⁺ Content (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>4- DETERMINATION OF CELLULAR LOCALIZATION OF CONNEXIN 26 MUTATIONS ASSOCIATED WITH KERATITIS-ICHTHYOSIS DEAFNESS (KID) SYNDROME (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>5- Understanding the Mechanisms of Connexin26 Mutations Leading to Keratitis-Ichthyosis Deafness (KID) Syndrome (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>6- Characterization of Connexin 26 Mutations Causing Hereditary Skin Disorders (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p>
----------------------------	--

TÜBİTAK