

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**UVABAİN ARACILIKLI HÜCRESEL CEVAPLARDA
RHO-KİNAZ ENZİMİNİN OLASI ROLÜNÜN
PROTEOMİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Emrah BAYRAM

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mustafa ARK

ANKARA
Şubat 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**UVABAİN ARACILIKLI HÜCRESEL CEVAPLARDA
RHO-KİNAZ ENZİMİNİN OLASI ROLÜNÜN
PROTEOMİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Emrah BAYRAM

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mustafa ARK

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından proje
02/2009-22 numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Şubat 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 11/02/2010

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof. Dr. H. B. BACIOĞLU
Gazi Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi Farmakoloji
Anabilim Dalı
06330 Hipodrum-Ankara

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Doç. Dr. Mustafa Arık
M. Arık

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. H. Bolkan Şimşek
B. Şimşek

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	iv
Resimler	v
Grafikler	vi
Tablolar	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz ve Fonksiyonları	3
2.2. Kardiyak Glikozitler	10
2.2.1. Endojen Uvabain	13
2.3. Küçük G Proteinleri ve Rho/Rho-Kinaz Yolağı	16
2.3.1. Küçük G Proteinleri	16
2.3.2. Rho/Rho-Kinaz Yolağı	18
2.3.2.1. Rho-Kinazların Yapısı	18
2.3.2.2. ROCK Aktivitesinin Düzenlenmesi	20
2.4. Proteomik Yöntemler	23
2.4.1. Proteomik Yöntemlerin Uygulama Alanları	24
2.4.1.1. İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)	26
2.4.1.2. Mass Spektrometresi	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.1.2. Kullanılan Aletler	31
3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	32

3.2. Yöntem	36
3.2.1. Endotel Hücre Kültürü	36
3.2.2. Faz Kontrast Mikroskopisi	38
3.2.3. Kültüre Hücrelerden Hücre Lizatlarının Hazırlanması	38
3.2.4. Protein Miktar Tayini	38
3.2.5. İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)	39
3.2.6. MALDI – MS ve Veritabanı Oluşturma	40
3.2.7. İstatiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. Endotel Hücre Morfolojisi Üzerine Uvabainin Etkileri	43
4.2. Uvabainin HUVEC Protein Ekspresyonları Üzerindeki Etkileri	45
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	57
7. ÖZET	58
8. SUMMARY	60
9. KAYNAKLAR	62
10. TEŞEKKÜRLER	75
11. ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER

Şekil 1: Na^+ / K^+ -ATPaz'ın şematik olarak gösterimi	4
Şekil 2: Na^+ / K^+ pompasının alt üniteleri ve çalışma mekanizması	6
Şekil 3: Na^+ / K^+ -ATPaz sinyalizasyon mekanizması	7
Şekil 4: Uvabainin hücre proliferasyonunu arttırmasını ve Ca^{++} miktarını regüle etmesini gösteren model	9
Şekil 5: Endojen uvabainin hipertansiyona etkisinin gösterimi	14
Şekil 6: Küçük G protein aktivasyonunun gösterimi	17
Şekil 7: ROCK moleküler yapısı	19
Şekil 8: ROCK aktivasyonu ve inaktivasyonunun gösterimi	21
Şekil 9: MALDI (Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu) çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi	29

RESİMLER

Resim 1: Uvabain ve Digoksin kimyasal formülleri	11
Resim 2: Proscilaridin A ve Marinobufagenin kimyasal formülleri	12
Resim 3: İlaç uygulama sonrası hücrelerin faz kontrast görüntüleri	44
Resim 4: İki boyutlu jel elektroforezi uygulandıktan sonra elde edilen jel görüntüleri	47

GRAFİKLER

Grafik 1: Uygulamalar sonrası belirlenen 7 spottaki protein ekspresyonu değişimleri	46
Grafik 2: MALDI-MS uygulaması sonrası elde edilen grafikler	48

TABLÖLER

Tablo 1: Uvabain uygulanmış hücreler üzerinde yapılan 2-DE sonucu seçilen spotların, MALDI-MS ile analizi sonrası, Mascot veritabanı ile karşılaştırılmasında saptanan proteinler	53
--	-----------

1. GİRİŞ

Na^+/K^+ ATPaz (veya sodyum pompası) hücre içi elektrolit ve sıvı dengesini sağlar ve hücre için gerekli olan glukoz ve birçok farklı bileşiğin hücre içine girmesini kolaylaştırır^{1,2,3}.

18. yy'da William Withering'in "digitalis purpurea" bitkisini konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanmaya başlamasından bu yana kardiyak glikozidler bilinmektedir⁴. Na^+/K^+ ATPaz, kardiyak glikozidler için bilinen tek membran reseptörüdür.

Bir kardiyak glikozid olan uvabainin, Na^+/K^+ ATPaz'a bağlanarak enzimin iyon pompalamasını inhibe etmesi dışında küçük dozlarda da enzimin kısmi inhibisyonuna neden olarak çeşitli hücre içi sinyal mekanizmalarını aktive ettiği gösterilmiştir^{5,6,7}.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, uvabain ve benzeri kardiyak glikozidlerin memelilerde endojen olarak bulunduğunu göstermiştir^{8,9}. Uvabain ve benzeri kardiyak glikozidlerin endojen olarak bulunduğunun belirlenmesinden sonra bu maddelerin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolünün aydınlatılması için çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Artmış endojen uvabain düzeylerinin esansiyel hipertansiyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur^{10,11}. Rodentlere kronik uvabain uygulanması ise bu hayvanlarda hipertansiyon gelişimine aracılık etmektedir¹².

Diğer taraftan uvabainin endotel hücresi ve bazı kanser hücre dizilerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir². Ancak bu olayların mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

Hücre içi birçok sinyalleme mekanizmasına aracılık eden küçük G proteini rho'nun memelilerde en az 10 üyesi bulunmaktadır¹³. Rho-kinazlar (ROCK), küçük G proteini olan rho-A'nın en iyi tanımlanmış efektörlerinden birisidir¹⁴.

Rho-kinazın ROCK 1 ve ROCK 2 olarak adlandırılan 2 izoformu bulunmaktadır^{13,14}. Rho-kinazların birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynadıkları gösterilmiştir. Düz kas kasılması, sekretuar aktivitelerin ve endotel hücre permeabilitesinin düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylar ile hipertansiyon, preeklampsi ve kanser gibi çeşitli patolojiler, bu enzimlerin yer aldığı olaylar arasında sayılabilir¹⁵.

Yukarıda belirtildiği gibi uvabain ve rho-kinazların rol oynadığı birçok patolojik olay birbirleri ile örtüşmektedir. Dolayısıyla uvabain aracılıklı bu patolojilerde, bu maddenin etkisine rho-kinaz enziminin aracılık etmesi olasıdır. Biz de bu tez kapsamındaki çalışmalar ile uvabain aracılıklı total protein ekspresyonlarındaki olası değişiklikler üzerinde rho-kinaz yolağının katkısını belirlemeye çalıştık. Bu amaçla endotel hücreleri kronik olarak uvabaine maruz bırakılmış ve total protein ekspresyonları ile rho-kinaz inhibisyonu arasındaki olası ilişki proteomik yöntemler ile belirlenmeye çalışılmıştır.

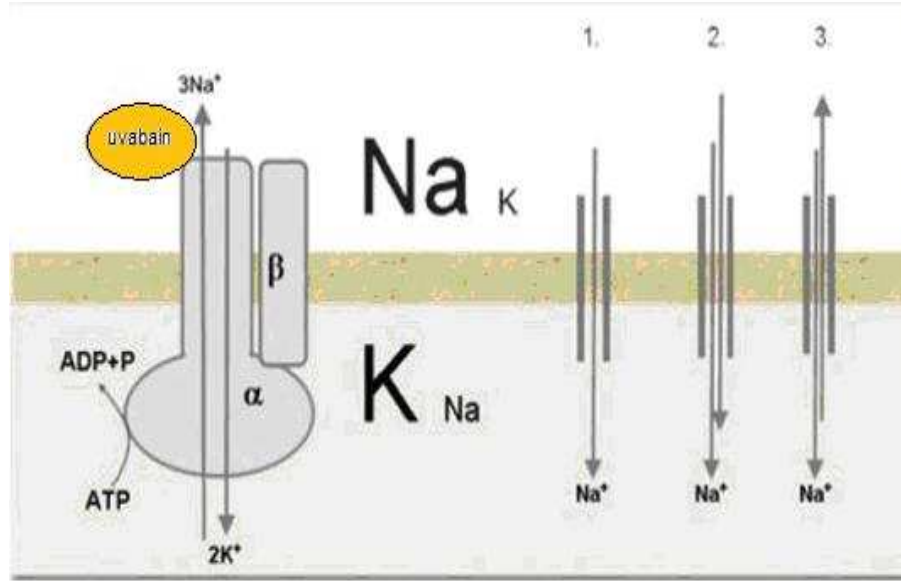
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Na⁺/K⁺-ATPaz ve Fonksiyonları

İlk defa 1957 yılında Skou tarafından keşfedilen P tipi ATPaz ailesinden olan Na⁺/K⁺-ATPaz (veya sodyum pompası) hücre membranında iyonik dengenin korunması ve hücre hacminin sürdürülmesinden sorumludur¹.

Hücre içi elektrolit ve sıvı dengesini sağlamakta olan ve hücre membranında bulunan bu protein üzerinde sodyum ve potasyum iyonları için özel reseptörler bulunmaktadır. Bu pompa aktive edildiğinde 3 sodyum iyonunu hücre dışına, 2 potasyum iyonunu hücre içine pompalamaktadır. Böylece plazma membranında elektrokimyasal bir fark oluşmaktadır. Oluşan bu elektrokimyasal fark, iyonların, aminoasitlerin, glukoz ve birçok farklı bileşiğin sodyum ile çift oluşturarak hücre içine girmesini kolaylaştırır².

Na⁺/K⁺-ATPaz, ATP ile uyarılır. Pompanın primer görevi hücre içinde yüksek K⁺ ve düşük Na⁺ düzeyini sağlamaktır. Bu transfer ATP hidrolizi ile gerçekleşmektedir³.



Şekil 1: Na^+/K^+ -ATPaz'ın şematik olarak gösterimi².

Na^+/K^+ -ATPaz üzerinde katalitik α , düzenleyici β ve fosfolamban (veya FXYD) olarak adlandırılan 3 alt ünite bulunur².

Bu alt ünitelerden α olanın molekül ağırlığı 110 kDa, β alt ünitenin ise 31,5 kDa'dır¹⁶.

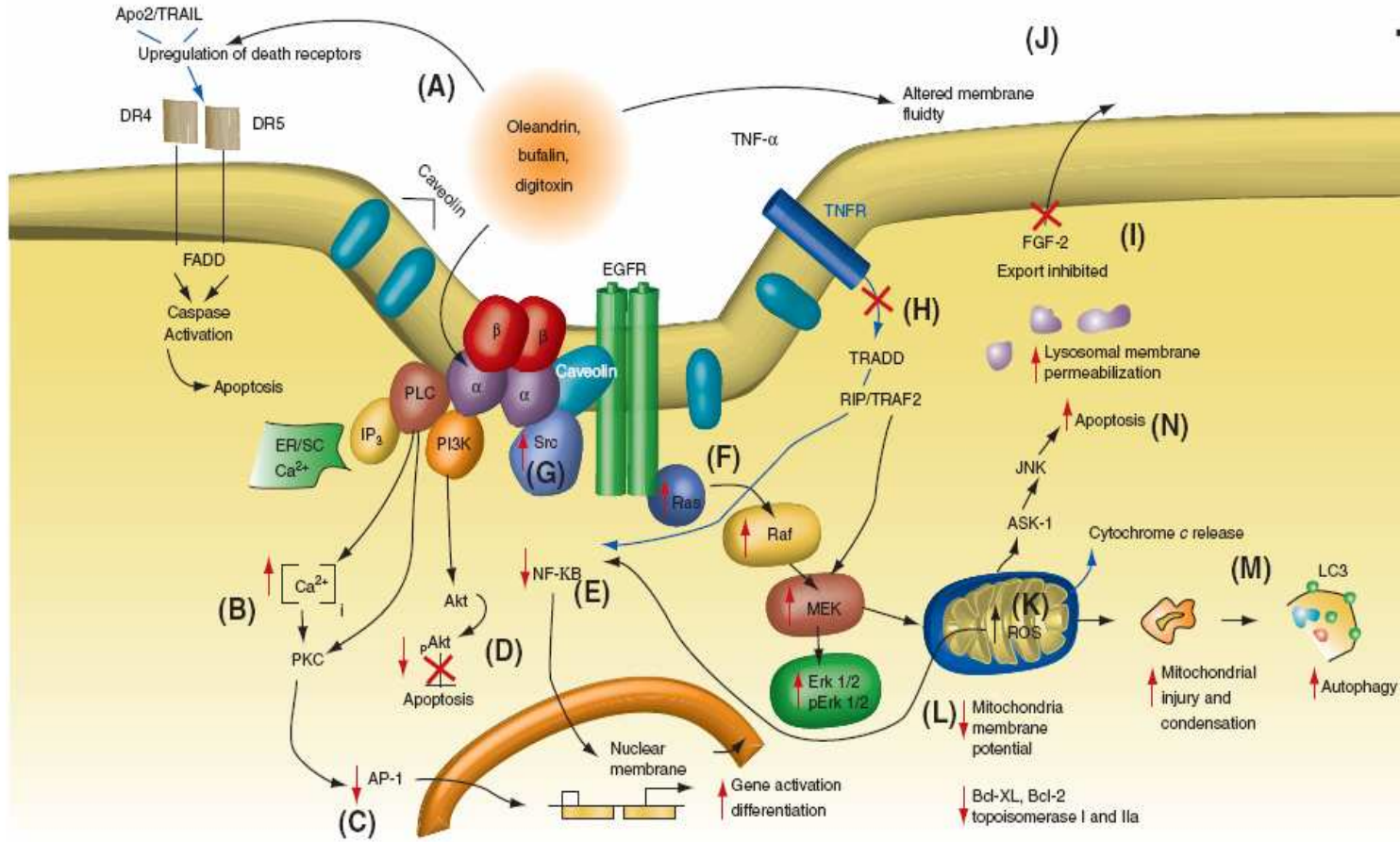
α alt ünitenin üzerinde, hücre dışında Na^+ ve endojen kardiyak glikozitlerin bağlandığı, hücre içinde ise K^+ ve ATP'nin bağlandığı özel bölgeler bulunmaktadır^{17,18,19,20,21}. Bu bölgeler fosfat grubunun bağlanması ve ATP hidrolizi için özeldir²⁰.

β alt ünite, Na^+/K^+ -ATPaz'ın aktivitesini kontrol eden tek yönlü membran proteindir¹⁸. Enzimin K^+ ve Na^+ afinitesine karşı modülasyonu ve α alt ünitenin plazma membranından geçişini kolaylaştırmak için stabilizasyonundan sorumludur^{18,22,23}.

FXYP ise, Na^+/K^+ -ATPaz'ın kinetik özelliklerini hücrelerin farklı ve özel ihtiyaçları için düzenlemektedir^{24,25}. FXYP'nin izoformu olan FXYP2, aynı zamanda Na^+/K^+ -ATPaz'ın, molekül ağırlığı yaklaşık 7,3 kDa olan γ alt ünitesi olarak bilinmektedir¹⁸.

G.Blanco, Geering ve Gren'in çalışmalarında, insanlarda α alt ünitenin 4 adet ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$), β alt ünitenin 3 adet ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) ve FXYP'nin 7 adet (FXYP1, FXYP2, FXYP3, FXYP4, FXYP5, FXYP6, FXYP7) izoformu olduğu bulunmuştur^{18,24,26}.

Önceleri α - β kompleksi Na^+/K^+ pompasının fonksiyon dimeri olarak bilinmekteydi ve bu dimerlerin tetramerlerde organize oldukları savunulurdu²⁷. Yakın zamandaki çalışmalarda $\alpha 1/\beta 1$ kompleksinin enzimin major formunu oluşturduğu açıklanmıştır²⁸.



Şekil 3: Na^+/K^+ -ATPaz sinyalizasyon mekanizması³³. A: Hücre yüzeyinde ölü reseptörlerin onarılmasındaki artış ve kaspaz aktivasyonu; B: İntrasellüler ortamda Ca^{++} konsantrasyonunda artış; C: Aktivasyon proteini gibi faktörlerin azalması; D: Fosforilasyonun durdurulması (Apoptoz da durdurulur.); E: NFκB sentezinin inhibisyonu; F: Ras yolağının aktivasyonu; G: Src aktivasyonu; H: TNF (Tümör nekroz faktörü) aktivasyonu; I: Tümör büyüme faktörlerinin ekstrasellüler taşınmasının inhibisyonu; J: Dış doku sıvıları; K: ROS'un mitokondriden ayrılışı; L: Mitokondri membran potansiyelinde ve anti-apoptotik protein miktarında azalma; M: Mitokondri kontrolünde ve fonksiyonunda azalma (hücre ölümü) ; N: Adaptasyon formu

Alberts –Post modeline göre Na^+ iyonları içeriden dışarıya, K^+ iyonları dışarıdan içeriye pompalanmaktadır. Bu pompalanma bir dizi enerji değişimli iyon hareketine bağlıdır. Na^+ ve Mg^{++} varlığında α alt ünite, ATP ile fosforile edilir. Bu olayı 3 sitozolik Na^+ iyonunun bağlanması takip eder. Bu yüksek enerjili enzimin E1P formudur ve Na^+ iyonları ile yüklüdür. Sonra konformasyonel değişiklikler ile daha düşük enerjili E2P formuna dönüşür. Ekstrasellüler membranda Na^+ iyonları koptuğu anda K^+ iyonları, K^+ spesifik bölgelere bağlanır ve E2P formu defosforile olur. Bu olayı K^+ iyonlarının intrasellüler membrana girmesi takip eder. K^+ iyonu, intrasellüler membranda defosforile E2 formunun tekrar E1 formuna dönüşümünde rol alır. E1 formu ATP ile bağlanır ve döngü devam eder^{29,30,31}.

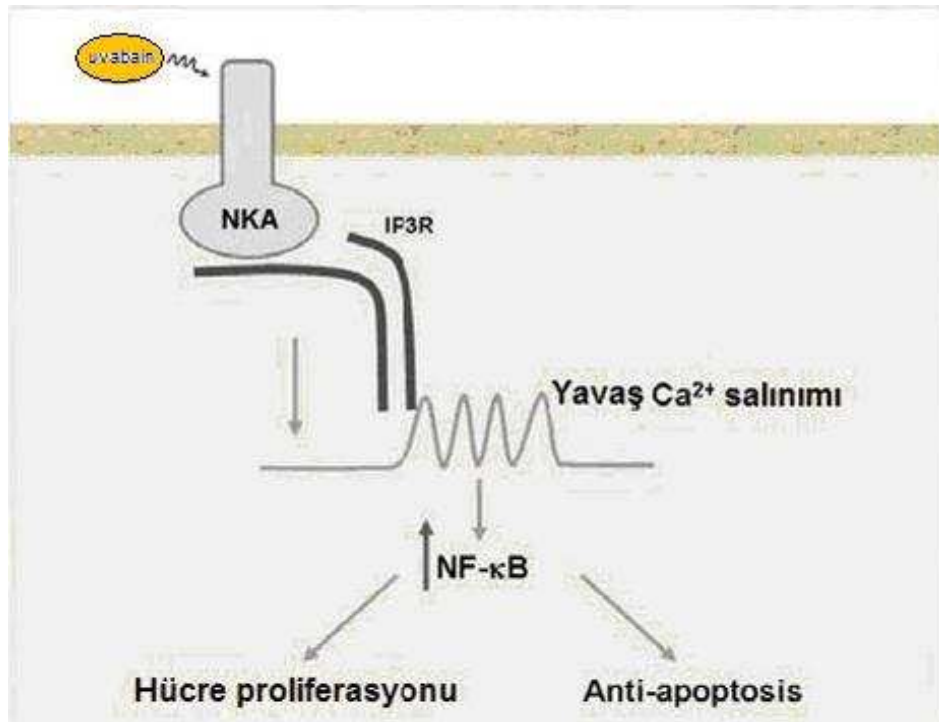
Digital benzeri Na^+/K^+ -ATPaz inhibitörlerinin ve kardiyotonik steroidlerin (CTS) pompanın $\alpha 1$ alt ünitesinin ekstrasellüler kısmında özel bağlanma bölgeleri bulunmaktadır^{5,6,32}.

Na^+/K^+ -ATPaz, iyon pompalama görevi yanında farklı intrasellüler kompartmanlarda sinyal iletimini de sağlamaktadır³³. Bu sinyal iletiminde insanlarda, $\alpha 1$ alt ünitesinde bulunan özel bölgelerin önemli rolü olduğu bilinmektedir^{5,6,7}.

Na^+/K^+ -ATPaz üzerindeki spesifik bağlanma bölgelerine uvabainin bağlanması Src-kinaz/ MAP-kinaz ve PKC (Protein Kinaz C)'yi aktive etmektedir. Src-kinaz'ın aktivitesi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır ve intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunu düzenler³³.

Uvabain bağlanması ile oluşan Ca^{++} salımı, NFkB'yi (Nükleer Faktör-kappaB) aktive eder. Bu faktör, hücre büyümesi ve apoptozise etki etmektedir. NFkB aktivasyonu, uvabainin anti-apoptozis etkisini ortaya çıkarır. Bu anti-apoptoz etki sadece uvabainin Na^+/K^+ -ATPaz'ı inhibe etmeyecek dozlarında gözlenmektedir².

Uvabain'in düşük dozlarda (1-100 nM) Na^+/K^+ -ATPaz'ın $\alpha 2$ alt ünitesini, yüksek dozlarda ise ($\geq 1 \mu\text{M}$) $\alpha 1$ alt ünitesini inhibe ettiği bilinmektedir^{2,34}.



Şekil 4: Uvabain hücre proliferasyonunu artırır, Ca^{++} miktarını regüle eder².

2.2. Kardiyak Glikozidler

Bitkilerden elde edilen kardiyak glikozidlerin tedavide kullanılması 1500 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu glikozidler önceleri emetik, diüretik ve kalp toniği olarak kullanıldılar. Sonrasında bunların kalp üzerinde farmakolojik aktivitelerinin ön plana çıkması ile birçok araştırma yapılmış ve yeni kullanım alanları bulunmuştur.

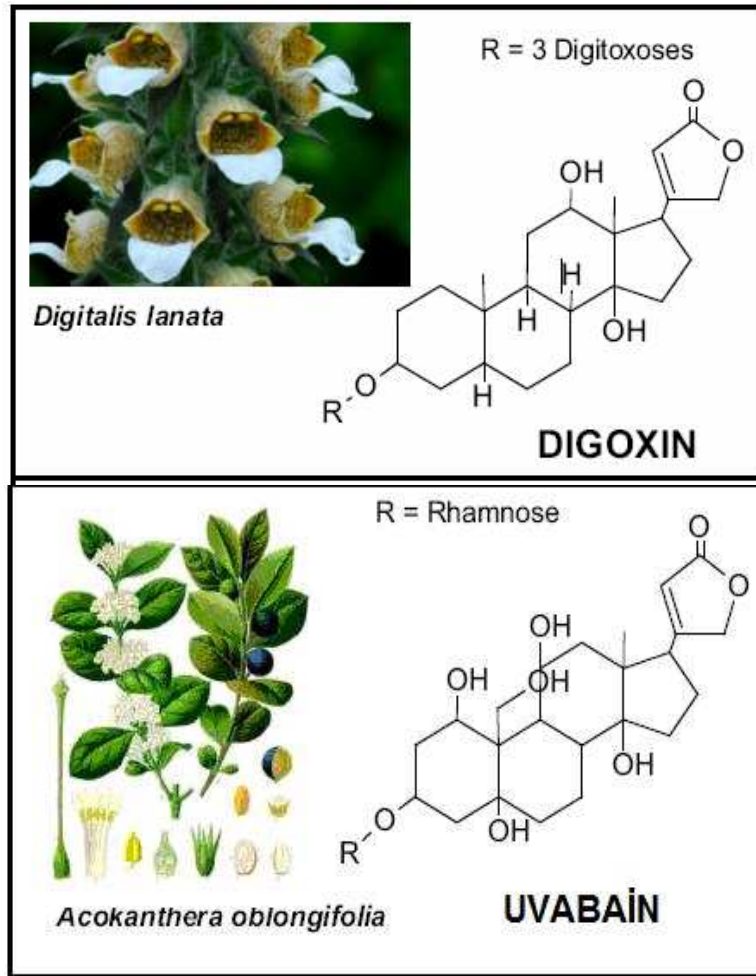
Glikozidlerin kullanılmaya başlanması 1775 yılında William Withering'in araştırmalarına dayanır. Mr. Withering, konjestif kalp hastalığı olan bir hasta üzerinde "digitalis purpurea" bitkisinin ekstresini denemesi ile bu etkiyi fark etmiştir⁴.

Schatzma, 1953 yılında yaptığı çalışmalarda, kardiyak glikozidlerin Na^+/K^+ pompasını inhibe ettiğinin³⁵ ve Skou'nun çalışmalarında plazma membranındaki Na^+/K^+ -ATPaz'ın da spesifik dijital reseptörleri olduğunun bulunması ile etki mekanizması da ortaya çıkmıştır¹.

Memeli kardiyak kasında $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ değiştiricisinin bulunması üzerine kardiyak glikozidlerin Na^+ pompasını inhibe ettikleri ve pozitif inotrop etki ile intrasellüler Ca^{++} miktarındaki artışa neden oldukları açıklanmıştır³⁵.

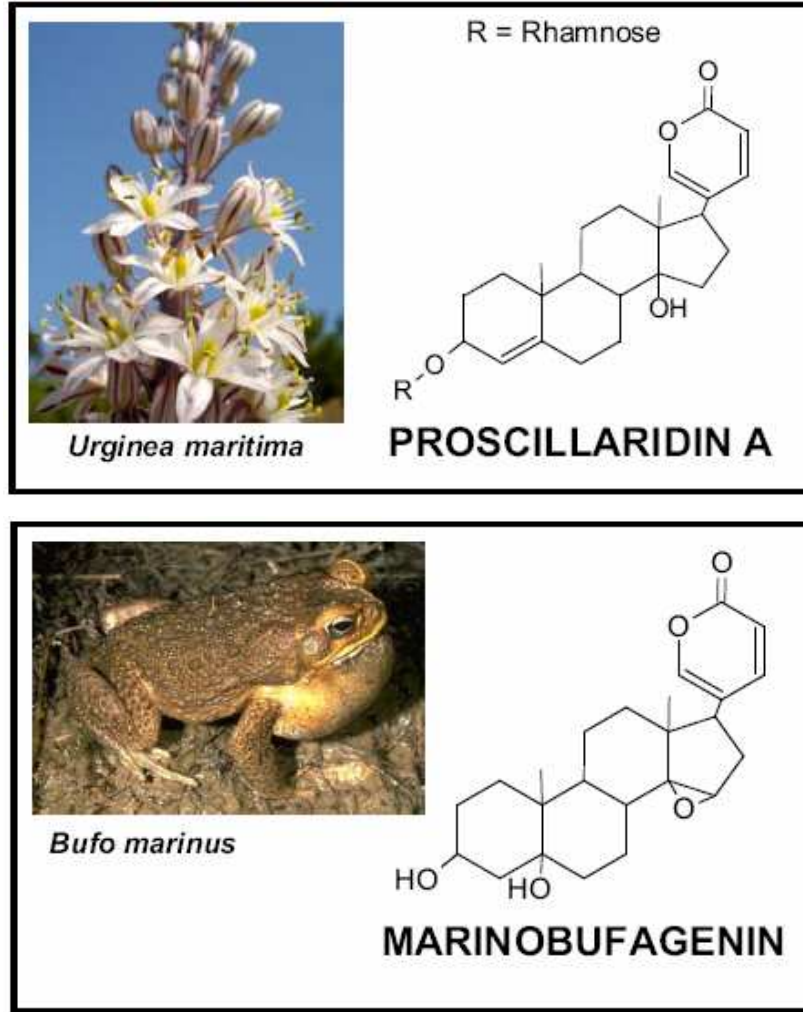
Kardiyak glikozidler, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ değiştirici protein ile Na^+/K^+ -ATPaz'ın α_2 , α_3 alt ünitelerinin inhibisyonu, sitozolik Na^+ konsantrasyonunda ve indirek olarak Ca^{++} konsantrasyonunda değişiklik oluşturur. Böylece endoplazmik retikulumda Ca^{++} sinyal mekanizması düzenlenir. Sonuç olarak kardiyak glikozidlerin pozitif inotropik etkileri ortaya çıkmaktadır³⁹.

Kardiyak glikozidlerden bitki kaynaklılarına kardenolidler (cardenolides) denir. Bunlardan digoksin ve oleandrin kontraktileti artırır, atriyal fibrilasyonun kontrolünde antiaritmik olarak görev alırlar^{36,37}.



Resim 1: Uvabain ve Digoksin kimyasal formülleri^{36,37}.

Vertebra kaynaklı olanlar ise bufadienoller (bufadienolides) olarak adlandırılırlar. Bunlardan bazıları da proscillaridin A ve marinobufagenindir^{36,37}.



Resim 2: Proscillaridin A ve Marinobufagenin kimyasal formülleri^{36,37}.

İnsan plazmasında digoksin, katarakt lenslerinde 19 nor bufalin⁸⁴, insan plasentasında 3 β -hidroksi 14 α 20:21-bufenolit⁷² ve proscillaridin A⁸⁵, akut miyokard infarktüsünden sonra idrarda marinobufagenin⁸⁶ ve son olarak böbrek yetmezliği olan hastaların plazmasında telocinobufagin ⁸⁷ tanımlanmıştır^{36,37}.

Son çalışmalarda, Na⁺ pompasının α 1 alt ünitesi kardiyomiyositlerin plazma membranında dağınık şekilde, α 2 ve α 3'ün ise endoplazmik retikuluma yakın olarak konumlandığı açıklanmıştır^{38,39}.

Ayrıca miyokardik iskemide, diyabette, uyku apnesinde, stres apnesinde ve kanserde de kardiyak glikozitlerin çeşitli etkileri olduğu düşünülmektedir.

2.2.1. Endojen Uvabain

Hamlyn ve ark. memeli plazmasında kardiyotonik glikozidlerden uvabain'i izole etmişlerdir^{8,9}.

O zamandan beri endojen uvabain, sığır adrenal bezlerinden⁴⁰, sığır hipotalamusundan⁴¹ ve rat adrenomedular hücrelerinden⁴² HPLC tekniği ile izole edilmiştir.

NMR ve Mass spektrofotometresi kullanılarak insan endojen uvabaininin, bitkilerden elde edilen uvabain ile benzerlikleri araştırılmıştır^{8,40,41}.

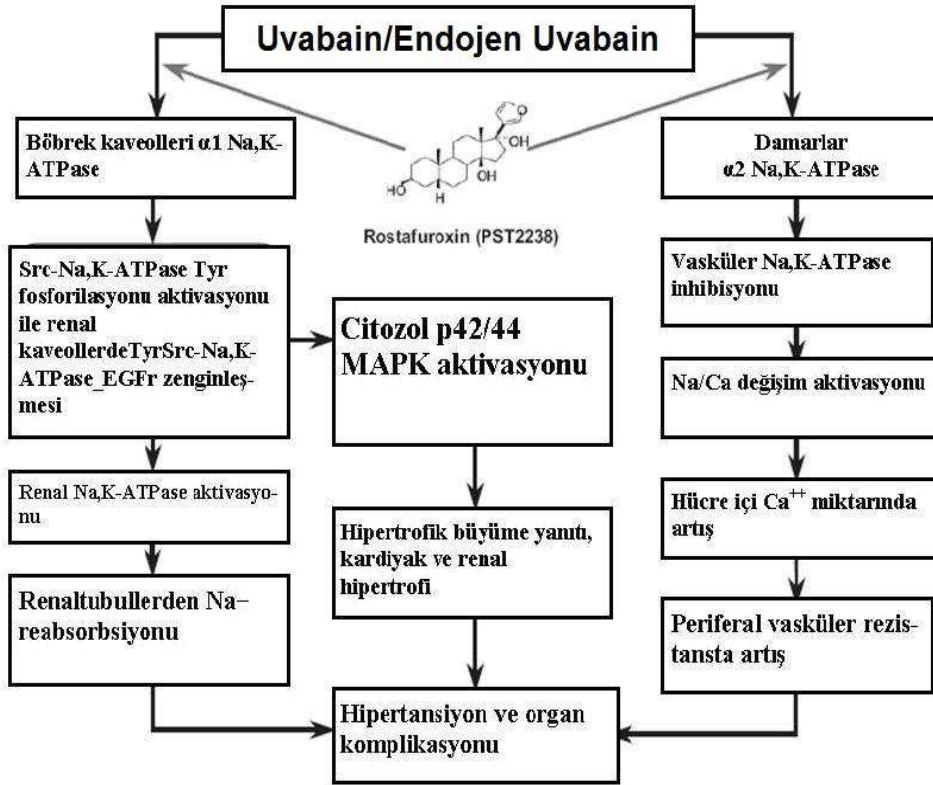
Endojen uvabainin hipotalamus ve adrenal kortekste üretiminin olup olmadığı konusu çok fazla makaleye konu olmuştur^{42,43,44}.

Uvabain benzeri immunoreaktivite, plazma dahil, hemen hemen bütün dokularda bulunmuştur. Ama en yüksek konsantrasyon adrenal kortekste ve hipotalamusta gözlenmiştir⁴⁵. Endojen uvabainin hormonal stimülasyonu sonucu adrenal kortekste sentezlendiği de son çalışmalarla açıklığa kavuşmuştur⁴⁶.

Yine Hamlyn ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda memeli kanında Na^+/K^+ -ATPaz'a bağlanan ve inhibe eden, uvabaine benzer, dijital benzeri bileşiklerin olduğu da ortaya çıkmıştır.

İlk sentezlenen bileşik, uvabainin steroidal izomeridir⁸.

Konjestif kalp yetmezliğinde, kronik böbrek yetmezliğinde ve sodyum dengesizliğinde endojen uvabainin konsantrasyonunda artış gözlenmiştir. Plazmada bulunan uvabain seviyesi, kan basıncı ile doğrudan ilişkilidir ve hipertansiyonda rol oynadığı doğrulanmıştır^{10,11}.



Şekil 5: Endojen uvabainin hipertansiyona etkisi^{10,11}.

1991'de Hamlyn ve arkadaşlarının⁸ açıklamalarından sonra yapılan invitro çalışmalarda (2003) endojen uvabainin, bitkisel uvabainin 11β izomeri olabileceği söylenmiştir¹². Bu varsayım sığır adrenal korteksindeki endojen uvabain ile bitkilerden elde edilen uvabainin HPLC ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır^{47,48}.

Birçok laboratuvarında çeşitli immunoassay formatlarında (ELİSA-enzim linked immunosorbent assay-, EİA-enzim immunoassay-, DELFIA-dissociation enhanced lanthanide fluorescent immunoassay) uvabain benzeri maddelerin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmalarda endojen uvabain benzeri maddeler bulunmuş ama sonuçta plazmadaki endojen uvabainle aynı immunoreaktif etki gözlenememiştir^{49,50,51,52}.

Çok tartışılan başka bir konu uvabainin diyetle bağlantılı olup olmadığıdır. Bu konu bazı bilim adamları tarafından onaylanmış^{53,54}, bazıları tarafından ise reddedilmiştir^{55,56}.

Tamura, spesifik diyetle beslediği farelerin idrarlarının HPLC ile incelemesi sonucunda az miktarda uvabainin bulunduğunu göstermiştir. Diğer çalışmasında spesifik diyetle beslemediği farelerde de yine uvabainin varlığını göstermiştir. Böylece uvabainin diyetle bağlı olmadığı üzerindeki çalışmalarını tamamlamıştır⁵³.

Öte yandan 1999'da Manunta, uvabain gibi birçok kardiyak glikozidin, uzun süreli tuzlu diyetle beslenme sonucunda plazmadaki miktarının arttığını gözlemlemiştir⁵⁷.

Uvabain, sitoplazmada Ca^{++} geçişini ve sinyalizasyonunu da indüklemektedir. Ayrıca Ca^{++} bağımlı NFkB'de aktive olur. Bu faktör aktivasyonu hücre büyümesine etki eder ve böbrekte serum yoksunluğu sonucu indüklenen apoptozisi önlemektedir^{2,58}.

2.3. Küçük G Proteinleri ve Rho/ Rho-Kinaz Yolağı

2.3.1. Küçük G Proteinleri

Son zamanlarda moleküler biyolojide yapılan çalışmalarda küçük GTP (Güanozin trifosfat) bağlayıcı proteinlerin hücre sinyal fonksiyonlarında ne kadar önemli rol oynadığı açıklanmıştır. Bu proteinler GTP-bağılı aktif, GDP-bağılı inaktif durumda bulunurlar.

Bu proteinlerin bazı üyeleri: Rho, Ras, Rab, Sarf/Arf ve Ran ailesidir. Molekül ağırlıkları 25-35 kDa arasında değişmektedir.

Küçük G proteini olan Rho'nun memelilerde en az 10 üyesi bulunmaktadır.

Tanımlanan bazı proteinler şunlardır:

-Ras ailesinden:

- * Rap,
- * Ral,
- * Reb,

-Rho ailesinden:

- * Rho (A'dan E'ye ve G izoformları),
- * Rac (1, 2, 3 izoformları),
- * Cdc42,
- * TC10'dur¹³.

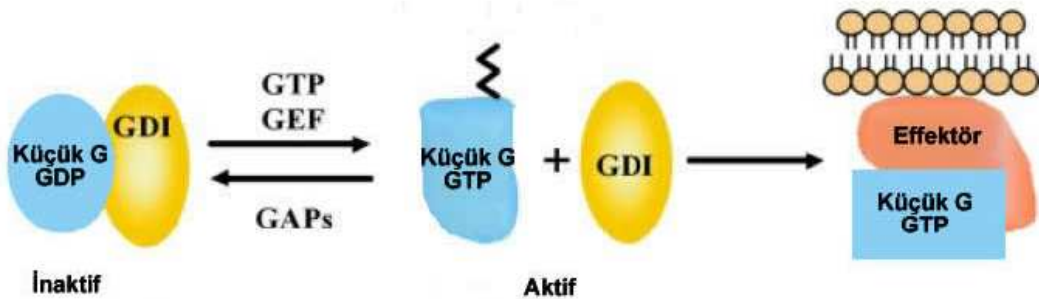
Rho ailesinin, kan basıncı hemeostazı, düz kas kontraksiyonunda Ca^{++} taşınması, hücre proliferasyonu, hücre adezyonu, migrasyonu ve inflamatuvar cevabı da içeren çok sayıda fizyolojik fonksiyonlarda sinyal iletiminde görevli olduğu belirtilmiştir¹³.

Rab, Ran ve Arf ailesi, veziküler ve nükleo-sitoplazmik taşınmanın formasyonu ve hareketini kontrol etmektedir⁵⁹.

Ras ailesi, gen transkripsiyonunda hücre içi sinyalleri regüle etmektedir⁶⁰.

Sinyal stimülasyonu sırasında Rho-bağlı GDP aktif hale geçer ve Rho-bağlı GTP oluşur⁶¹.

İnaktif GDP'nin aktif GTP'ye dönüşüm reaksiyonunu guanin nükleotid değiştirici faktör (GEF) stimüle ederken, aktif GTP'nin inaktif GDP'ye dönüşüm reaksiyonunu guanin nükleotid dissosiasyon inhibitörü (GDI) indüklemektedir⁶².



Şekil 6: Küçük G protein aktivasyonu⁶².

2.3.2. Rho/ Rho-Kinaz Yolağı

Rho-kinazlar (ROCK), küçük G proteini olan rho-A' nın en iyi tanımlanmış efektörlerinden biridir¹⁴.

Rho'lar, rhoA, rhoB ve rhoC olarak bilinirler ve aminoasit yapıları birbirine benzerdir. Bundan dolayı hücre içinde hedefleri de benzerdir⁶³.

Aktin düzenlenmesi etkisine ek olarak temel hücre fonksiyonları olan kasılma, apoptoz ve motilite düzenlenmesinde etkileri bulunmaktadır¹⁴.

RhoA'nın rol oynadığı GDP'nin aktif GTP'ye dönüşümü, hücrel cevabın ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

Rho-kinazlar, diğer rhoB ve rhoC'ye de etki ettikleri için genel olarak rho-efektörleri olarak düşünülmektedir⁶⁴.

2.3.2.1. Rho-Kinazların Yapısı

ROCK, molekül ağırlığı yaklaşık 160kDa olan serin/ treonin kinazdır.

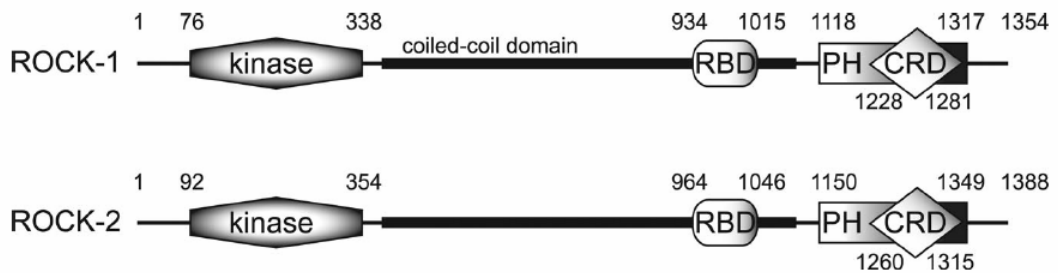
Omurgasızlarda drosophila ve sivrisinekte, omurgalılarda ise tavuk, inek, fare ve insanlarda tanımlanmıştır.

ROCK: ROCK 1/ ROK β ve ROCK 2/ ROK α olarak iki izoforma sahiptir^{65,66}.

İnsanlarda ROCK1 ve ROCK2 sırasıyla kromozom 18 (18q 11,1) ve kromozom 2 (2p24)' de lokalize olurlar⁶⁶.

ROCK, N-terminalde kinaz bölge, ortada kıvrılmış kıvrım (coiled-coil) ve C-terminalde bulunan sisteince zengin plekstrin-homolog (PH) bölgeden oluşan bir yapıya sahiptir. Kıvrılmış-kıvrım bölgesinde Rho bağlanan ana bölge (RBD) bulunur. Bu bölgeye GTP bağlı rho bağlanması ile rho-kinaz aktive olur.

ROCK 1 ve ROCK 2, N-terminal bölgede %65, RBD'de %58 ve kinaz bölgesinde %92'ye yakın bir oranda birbirinin homologudurlar⁶⁶.



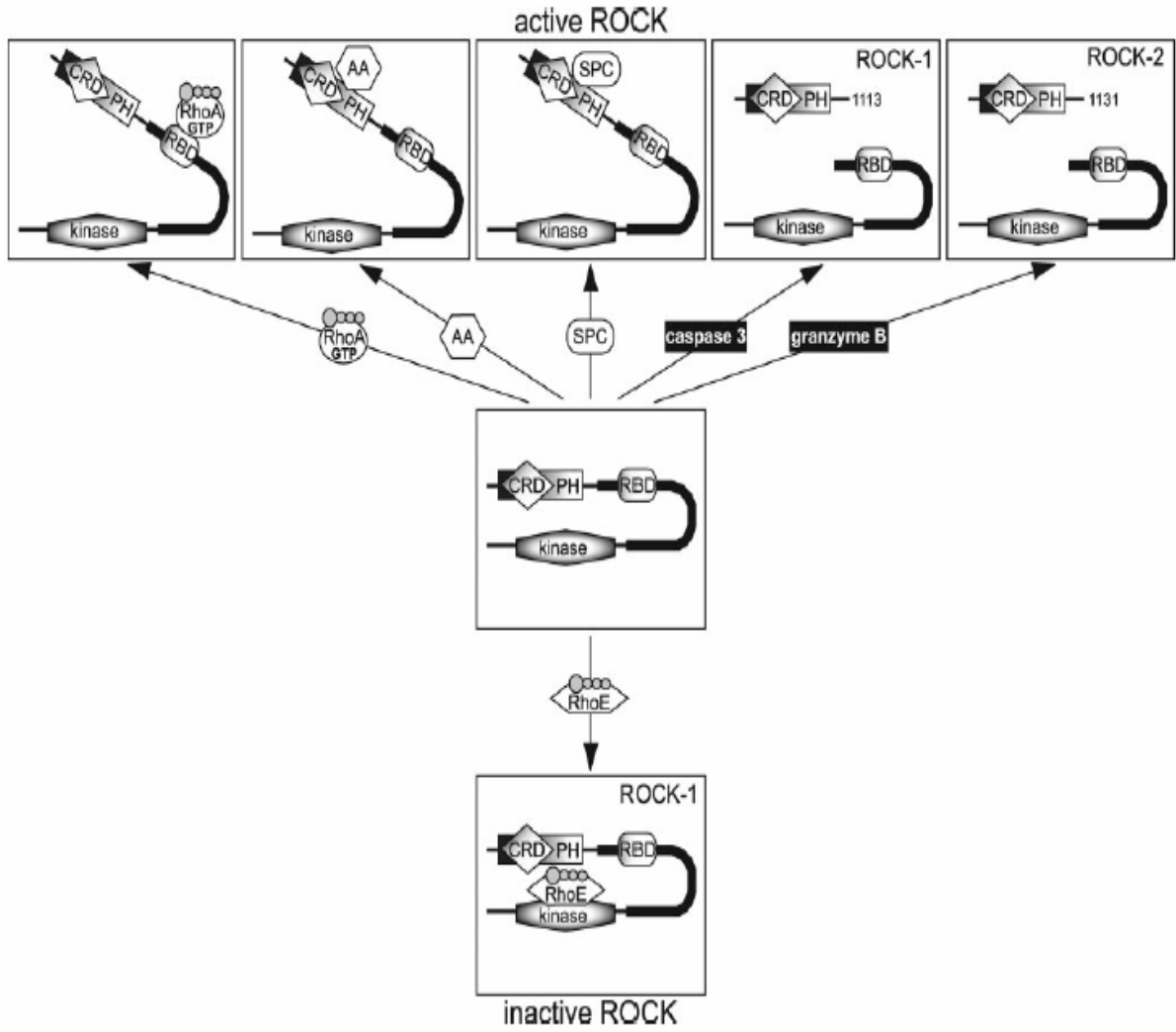
Şekil 7: ROCK moleküler yapısı (CRD: Sisteince zengin C1 bölgesi)⁶⁶.

ROCK ekspresyonunun düzenlenmesi tam olarak açıklanmamıştır. ROCK 1 ve ROCK 2'nin mRNA ve proteinleri, proteinkinaz C ve nükleer faktör kappaB (NFkB) ile düzenlenir. Bu düzenleme anjiyotensin II tip I reseptör stimülasyonu ve interlökin 1 β ile olur⁶⁷.

İnsan koroner vasküler düz kas hücrelerinde anjiyotensin II'nin, ROCK 2 mRNA ekspresyonunu stimüle edici etkisi nikotin ile artarken, östrojen ile antagonize olmaktadır. Bu etkileşim dolayısıyla menopoz sonrası bayanlarda ve sigara içenlerde koroner arter hastalığı görülme oranları yüksektir¹⁵.

2.3.2.2. ROCK Aktivitesinin Düzenlenmesi

ROCK'un kinaz bölgesi, N-terminalde lokalize olur. C-terminal bölgesi bulunmayan kesik ROCK formları temel olarak aktif haldedir. C-terminal bölge ROCK ekspresyonunda hücreler üzerinde baskın olarak negatif etki yapar. C-terminalinin dinlenen hücrelerde bu negatif düzenleyici etkisinden, oto-inhibitör etkinin sorumlu olduğu düşünülmektedir^{68,69}.



Şekil 8: ROCK aktivasyonu ve inaktivasyonu⁶⁹.

Sonuçta bu kişisel yardımlaşma etkileşimi, oligomerizasyon (dimerizasyon), ROCK'un kinaz aktivasyonunu ATP afinitesini düzenleyerek etkilemektedir⁷⁰.

RBD bölgesine aktif GTP-bağlı Rho bağlanması ROCK'un fosfotransferaz aktivitesini stimüle eder. Bunu katalitik ve inhibitör C-terminal arasındaki etkileşimi bozarak yapar⁶⁹.

Buna ek olarak lipid taşıyıcılar (Araşidonik asit: AA, sifingosil fosforilkolin: SPC) yeterli bir şekilde ROCK aktivitesini stimüle ederler. Bu stimülasyon rho-A'dan bağımsız olarak gerçekleşir^{71,72}.

AA ve SPC, ROCK'un negatif düzenleyici bölgesiyle etkileşime girerek ve PH bölgesinde ROCK'un katalitik aktivitesini bozarak inhibitör etki göstermektedir⁶⁹.

ROCK, inhibitör C-terminal bölgenin ayrılması ile de aktive olmaktadır. Kaspaz-3, ROCK 1'i DETD¹¹¹³ bölgesinden parçalayarak apoptoz sırasında aktivasyonu sağlamaktadır. Kaspaz-3, ROCK 2'yi aynı şekilde aktive edememektedir⁷³.

Proapoptotik proteaz GranzimB, ROCK 2'yi C-terminalde IGLD¹¹³¹ bölgesinden parçalar ve aktivasyonu sağlar. GranzimB'nin ROCK1'e etkisi gözlenmemiştir⁷⁴.

Küçük G proteini olan rhoE, ROCK 1'in N-terminal bölgesine bağlanır (aminoasit 1-420). Bu bağlanma ROCK 1 aktivitesini inhibe etmekte ve RBD'ye bağlanmasını engellemektedir. Bu nedenle rhoE, ROCK 1 inhibitörü olarak bilinmektedir⁷⁵.

Diğer iki küçük G proteini olan gem ve rad, ROCK fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Bunlardan gem, ROCK 1 aracılıklı MLC ve MLC-fosfataz'ın fosforilasyonunu, rad ise, ROCK 2'nin indüklediği cevapları inhibe etmektedir⁷⁶.

Sonuç olarak ROCK'un pozitif ve negatif düzenleyicileri tanımlanmıştır.

2.4. Proteomik Yöntemler

Organizma içerisindeki bütün proteinlerin izole edilmesi, ayrıştırılması, tanımlanması ve fonksiyonel olarak nitelendirilmesini içeren, dokulardaki bütün protein dizileri ve proteinlerin ifade düzenlerinin analizidir.

Proteom kelime anlamı olarak, farklı dinamik koşullarda hücre doku ve vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif analiz teknolojisidir. Omik (omic) ise, Yunanca'dan gelir ve tümü-hepsi anlamına gelmektedir. Terim olarak biyoloji ve yaşayan sistemler hakkında nasıl düşündüğümüzün yeniden tanımlanmasını sembolize eder⁷⁷.

Proteinler üzerindeki çalışmalar, kısmen protein yapısını kesin ve kolay bir şekilde tanımlayacak metodların eksikliğinden dolayı her zaman küçük ölçekli olarak yapılmıştır.

Bir protein 400'den fazla kimyasal modifikasyona uğrayabilir ve sonuç olarak fonksiyonunda, lokalizasyonunda ve aktivitesinde değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişiklikleri tayin edebilmek için proteinlerin ekspresyon, lokalizasyon ve içerikleri genomlarla şifrelenmiştir^{78,79,80}.

Genom, bir organizmanın bütün DNA'sı, bir başka deyişle genetik yapısı olarak ifade edilir. Genler, organizmadaki işlevsel moleküller olan proteinleri kodlarlar. Bütün genomun %2'lik kısmındaki dizilim hataları (malnutrasyonlar), organizmalarda yapı ya da işlev bozukluklarına neden olmaktadır.

Yaşayan bir organizmanın tamamlanmış genom şifresi ilk kez 1995'te yayımlanmıştır⁸¹. Daha sonra 2000 yılında 40 genomun analiz ve ayrıştırılması, son olarak 2003'te insan genomunun 5, 16, 19, 21 ve 22. kromozomlarının tanımlanması tamamlanmıştır (wit.integratedgenomicd.com/GOLD/). Bunların dışında aynı süreçte diğer organizmaların da genom dizileri belirlenerek insan genomu ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

2.4.1. Proteomik Yöntemlerin Uygulama Alanları

Proteomik, pratik olarak 4 temel uygulamayı kapsamaktadır.

Bunlar:

- a. Örnekteki tüm proteinlerin analizi (mining)
- b. Protein ekspresyon profili
- c. Protein network haritalanması
- d. Protein modifikasyon haritalanmasıdır.

a. Mining, bir örnekteki proteinlerin tümünün tanımlanabilme çabasıdır. Genlerin ekspresyon verilerinden çıkarılan proteom verileri yerine doğrudan proteomu katologlamaktır.

b. Protein ekspresyon profilinde, organizmanın ya da hücrenin belirli bir durumdaki (gelişme, hastalık vb.) ya da bir ilaç, kimyasal veya fiziksel stimüle edici ile karşılaşmadaki fonksiyonu gibi belirli örneklerdeki proteinlerin tanımlanmasıdır. Bu şekilde sağlıklı ve hasta dokular arasındaki farklar yardımıyla ilaç tedavilerinde yenilikler oluşturulabilmektedir.

c. Protein network haritaları yaşayan sistemlerde hangi proteinlerin birbirleriyle etkileşimde olduklarını belirleyen proteomik yaklaşımlardır.

d. Protein modifikasyonlarının haritalanması, proteinlerin nasıl ve nerede modifiye olduklarının belirlenmesi işidir.

Proteomik analizlerde genel strateji şöyledir:

1. Örneklerin hazırlanması,
2. Gerekli inhibitörlerden (tuz, şeker vs.) saflaştırılması,
3. Total protein eldesi,
4. Proteinlerin en az iki boyutlu olarak ayrılması,
5. Ayrılan proteinlerin enzimatik reaksiyonlarla peptidlere ayrılması,
6. Peptidlerin saptanması,
7. Veri değerlendirme (biyoinformatik).

Proteomik analizlerin en başında hücreden veya organizmadan binlerce proteinin ayrıştırılması ve görüntülenmesi gelmektedir.

Proteomik ayrıştırma için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları şunlardır:

- * Chip-based teknolojik analiz^{82,83}
- * MASS spektrometresi (MS)⁸⁴
- * Afinite kromatografisi^{85,86}
- * Two-Hybrit görüntüleme⁸⁷
- * İki boyutlu jel elektroforezi ve izoelektrik odaklama⁸⁸

Bu yöntemlerden en iyi sonuç alınan iki boyutlu jel elektroforezidir (2-DE).

2.4.1.1. İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)

Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında sıvı bir ortamda yüklü sıvı veya partiküllerin göçüdür.

Jel elektroforezi, küçük ya da orta boydaki proteinler için (≤ 106 kDa) yüksek ayrıştırma gücüne sahiptir.

2-DE'nin ilk tanımı, Smithies and Poulik'in serum proteinlerini ayrıştırmada kağıt ve nişasta jel elektroforezini birleştirerek kullanmalarına dayanmaktadır⁸⁹.

2-DE'de izoelektrik odaklama sistemleri uygulandığı zaman proteinlerde yüklerine göre ilk ayrışma, sonrasında büyüklüklerine göre ikinci ayrışma sağlanır. Birinci basamak, agaroz veya poliakrilamid jel gibi büyük porlu bir ortamda gerçekleştirilir. Bir pH gradiyenti elde etmek için amfolitler eklenir. İkinci boyut için lineer veya gradiyent şekilli bir poliakrilamid sıklıkla kullanılır.

Bu yöntemle kullanılan çözeltiler ve uygulama şekilleri değışiklik gösterebilir. Bu çözeltilerin ve yöntemlerin proteinler üzerine etkileri farklılık gösterir. Mesela üre içeren çözeltiler ısıtılmamalıdır; çünkü proteinlerin yüklerinde farklı sonuçlar çıkartabilirler. Proteaz içerenler soğukta saklanmalıdırlar; bunlar da analizlerde farklı spotlar oluşturabilirler. Ayrıca kokteyl proteaz inhibitörleri de eklenebilir; bunlar da protein yüklerinde değışiklik oluşturabilirler. Yapılan çalışmalarda bütün bu özellikler tek tek incelenmeli ve doğru seçim yapılmalıdır.

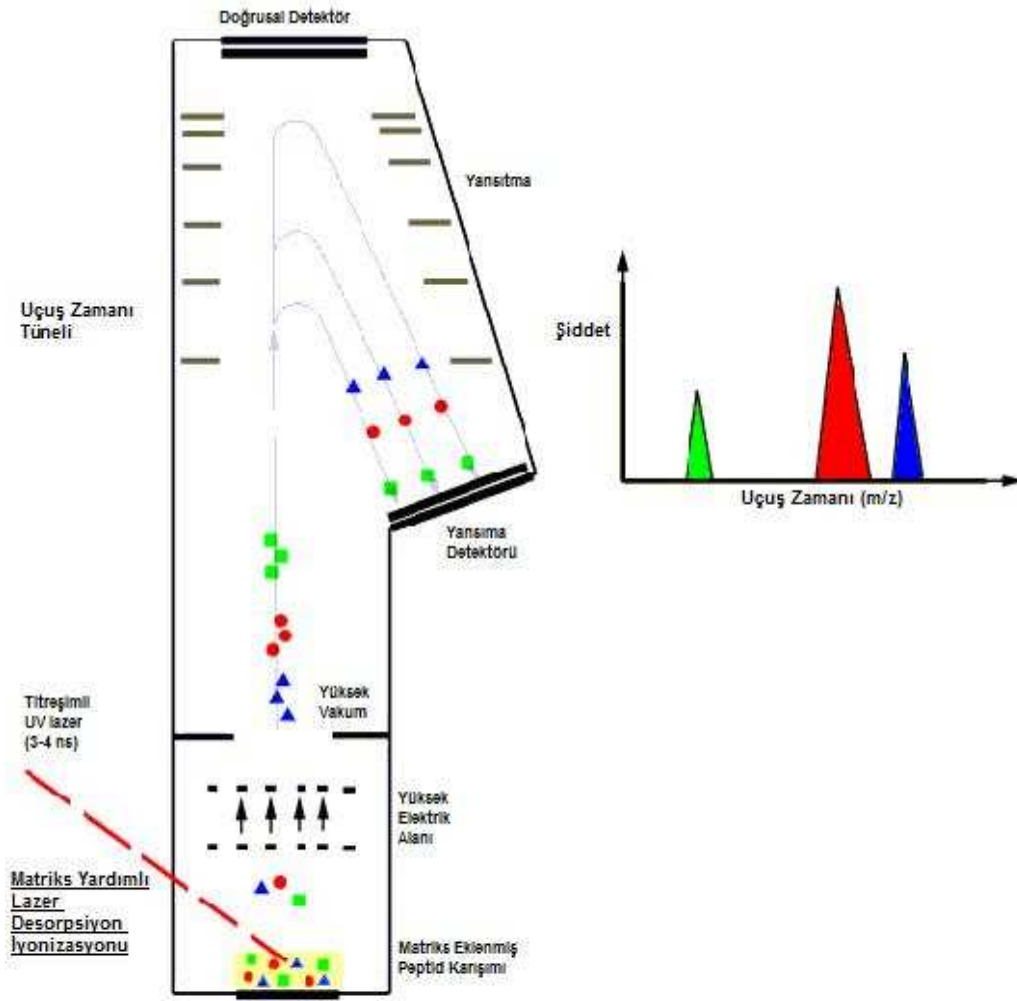
O'Farrell'in 2 boyutlu elektroforez metodu en çok kullanılan elektroforez metodudur⁹⁰.

Proteomik'te kullanılan bir başka yöntem ise kütle spektrometresidir (MASS Spektrometresi-MS).

2.4.1.2. Mass Spektrometresi (MS)

Mass spektrometresi, gelişmekte olan proteomik teknolojileri içinde önemli bir yere sahiptir. Bir proteinin kütlesinin tam ve hassas olarak bulunabilmesi MS ile yapılabilir ve bu özellik veritabanı oluşturmada önemli yer tutmaktadır. Fakat sadece MS ile kütle hesaplaması yeterli değildir. MS ile yapılan biyopolimerlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin analizi, beraberinde ‘soft iyonizasyon’ metodları olan ESI (elektrospray) ve MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization - Matriks yardımlı lazer desorpsiyon iyonizasyonu) kullanılması ile geliştirilmiştir. Bu metodlara ‘soft’ denmesinin sebebi yöntem boyunca molekülleri parçalamadan analiz yapmalarıdır. Böylelikle büyük moleküllerin analizi de sağlanmaktadır^{91,92}.

MALDI-MS: Analiz edilecek moleküller MALDI ile iyonize edilir ve kütle-yük (m/z) oranları, uçuş zamanı tespiti ile hesaplanır. İyon ne kadar küçük olursa o kadar hızlı hareket edecektir ve m/z oranı hesaplanıp kalibre edilebilecektir.



Şekil 9: MALDI (Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu) çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi

2-DE ve MALDI-MS birlikte kullanıldığında protein analizlerinde birçok sonuç elde edilebilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Y27632 (Tocris)

Ouabain (Sigma)

PBS (Gibco)

Fetal Sığır Serum Gold (PAA)

Kollejenaz Type II (Gibco)

Medium199 Earles 10X (Gibco)

Glukoz (Sigma)

HEPES (Gibco)

NaHCO₃ (%7,5 w/v) (Merck)

Penisilin- Streptomisin (Gibco)

1 N NaOH

L-Glutamin 200mM (Sigma)

8 M Urea (İnvitrogen)

%2 CHAPS (Sigma)

%0.5 ZOOM Carrier Ampholytes pH 3-10 (İnvitrogen)

Proteaz Kokteyli (Roche)

Bisinkoninik Asit (Pierce)

Bromofenol Mavisi (Sigma)

NuPAGE Sample Reducing Agent 10X (İnvitrogen)

NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (İnvitrogen)

NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X (İnvitrogen)

Agaroz

Mark 12 MW Unstained Standart (İnvitrogen)

Simply Blue Safestain Boya (İnvitrogen)

Sodyum Azit (Sigma)
HPLC Water
100 mM NH_4HCO_3 (Sigma)
ACN (CH_3CN) (Sigma)
DTT (Molekula)
İyodoasetamid (Sigma)
Trypsin (Promega)
Formik Asit (Riedal-De-Häen)
CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinamik acid) (Aldrich)
HCl %37 (Sigma)
 NH_4OH (Sigma)
%0.1 TFA (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Hassas Terazı (Shimadzu)
Karıştırıcı (FALC)
Mikropipet (Eppendorf)
Vorteks (Firlabo)
Süpersonik Homojenizatör (SONICS)
Santrifüj (NÜVE)
Su Banyosu (NÜVE)
 CO_2 Etüvü (Sanyo)
Etüv (Memmert)
Mikrodalga Fırını (Samsung)
Laminar Akımlı Kabin (Holten)
Faz Kontrast Mikroskobu (Leica)
Mikroskop Kamerası (Leica)
Çalkalayıcı (IKA)
Plak Okuyucu (Plate reader)
Elektroforez Tankı (Invitrogen)

ZOOM IPGRunner Kaset (İnvitrogen)
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM Jel (İnvitrogen)
XCell Surelock Mini-Cell (İnvitrogen)
ZOOM Strip pH 3-10 Non-Linear (İnvitrogen)
Güç Kaynağı (İnvitrogen)
Versa Doc İmaging System Kamera (Biorad)
The Proteom Works Spot Cutter (Biorad)
Micromass Maldi (Waters)
Maldi Tabakası (Waters)

3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Kreps Çözeltisi (1 litre için):

NaCl	6.95g
NaHCO ₃	2.1g
KCl	0.34g
MgCl ₂ .2H ₂ O	0.25g
KH ₂ PO ₄	0.16g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.27g
Monohidrat Glukoz	2.17g

Homojenizasyon Çözeltisi

8M Urea	12g
%2 CHAPS	0.5g
%0.5 ZOOM Carrier Ampholytes	125µl

Çözelti distile H₂O ile 25ml'ye tamamlanır. Çözelti 2 ml'lik hacimlere bölünür ve -20 °C'de saklanır. Homojenizasyon öncesi 1tb/ 500 µl şeklinde hazırlanmış proteaz kokteyl çözeltisinden %1 oranında bu çözeltiye eklenir.

Yürütücü Tampon Sistemi (Running Buffer)

MOPS SDS Running Buffer (20X)	50ml
Distile H ₂ O	950ml

1X PBS Çözeltisi

PBS 10X	100ml
Steril Distile H ₂ O	900ml
Glukoz	2g

Çözelti laminar akımlı kabin içinde 0.2 µm filtreden geçirilip falkonlara bölünür ve -20 °C' de saklanır.

Kollajenaz Tip II

0.2 g kollajenaz tartılıp 100ml PBS'de oda ısısında çözülür. Alüminyum folyoya sarılıp 1 N NaOH ile pH 7.4'e ayarlanır. Elde edilen %0.2'lik çözelti laminar akımlı kabin içinde 0.2 µm filtreden geçirilir ve 10 ml'lik falkonlara bölünüp -20 °C'de saklanır.

Medium199 Earles 10X (Stok Kültür Ortamı)

M199 10X 10ml

Steril Distile H₂O 90ml

Çözelti laminar akımlı kabin içinde hazırlanır, 50'lik falkon tüplerine bölünür. +4 °C' de saklanır. Hazırlanan 1X zelti 'tam besiyeri' hazırlamada kullanılır.

Tam M199

Glutamin 0.2 M 1ml

HEPES 1M 1.5ml

NaHCO₃ %7.5 w/v 1.8ml

Penisilin-Streptomisin 1ml

Fetal sığır serumu 10ml

Maddeler steril behere konur üzerine 100 ml'ye tamamlanacak kadar M199 stok eklenir, 50 ml'lik falkon tüplerine bölünüp 1 haftaya kadar +4 °C'de saklanabilir.

Dengeleme (Equilibration) Tamponu

NuPAGE LDS Sample Buffer(4X) 3.5 ml

Distile H₂O 10.5 ml

NuPAGE Sample Reducing Agent 1.5 ml

Çözelti 5 ml'lik hacimlere ayrılır. Kullanım sırasında taze olarak hazırlanır.

DTT-NH₄HCO₃ Karışımı

DTT 12.32 mg

50 mM NH₄HCO₃ ile 8 ml'ye tamamlanır.

Ekstraksiyon Tamponu

Formik asit 50 µl

ACN (Asetonitril) 100 µl

HPLC suyu 4.85 ml

MALDI Matriksi Rekristalizasyonu

- 100 mg CHCA, 1 ml ACN içinde çözülür. Vortekslenir ve ardından 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.

- ACN atılarak çökelti üzerine 10 ml HPLC suyu eklenir.

- Ultrasonik banyoda 1 dakika sonike edildikten sonra 50 µl NH₄OH ilave edilir. 30 saniye ultrasonik banyoda sonike edilir. 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilir.

- Süpernatant temiz tüpe alınarak üzerine 2 damla %37'lik HCl damlatılır. 1000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır.

- Pellet üzerine iki defa 10 ml 0.1 N HCl eklenerek 1000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısımları atılır. En son pellet üzerine 5 ml ACN ilave edilip çözülür.

- Çözünme işleminden sonra 250 µl'lik darası alınmış eppendorflarda alikuatlara ayrılarak ağzı açık bir biçimde 60-80 °C'deki etüve konur ve tamamen buharlaşınca kadar beklenir.

Matriks ve Örnek Solventi

ACN	25 µl
HPLC suyu	25 µl
TFA (Trifloroasetik asit) (%10)	0.5 µl

3.2. Yöntem

3.2.1. Endotel Hücre Kültürü

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri(HUVEC), insan umbilikal kord veninden izole edilmiş ve “Tam M199 besiyeri” ile flasklarda kültüre edilmiştir. Çalışmalarda primer hücre kültürü kullanılmıştır.

İzolasyon için: Doğumdan sonra alınan insan göbek kordonu steril koşullarda hazırlanan Krebs-Henseleit çözeltisine alınmıştır ve taşıma esnasında bu çözelti içerisinde muhafaza edilmiştir. Laminar akımlı kabin içerisinde steril 6 numara beslenme katateri umbilikal ven içine yavaşça yerleştirilir. Önceden su banyosunda 37 °C'ye getirilen 1x PBS enjektöre çekilir ve kanül yardımıyla damar yıkanır. Böylece venden kırmızı kan hücreleri temizlenmiş olur. Sonrasında ven içine 37 °C'deki %0.2'lik kollajenaz verilir. Kollajenaz diğer taraftan akmaya başladığında damarın alt ucu klipslenir. Ven iyice kollajenaz ile şişirildikten sonra kanülün takılı olduğu uçta klipslenir. Kord petri kabında inkübatöre konulur ve 15 dakika bekletilir.

Kollajenazla inkübasyondan sonra 37 °C'de PBS ve Tam M199 besiyeri 1:1 oranında karıştırılarak laminar akımlı kabin altında damardan geçirilir. Elde edilen içerik 50 ml'lik falkona toplanır. Toplanan içerik 15 ml'lik falkonlara eşit şekilde bölünerek oda ısısında 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir. Santrifüj sonrası laminar akımlı kabin içerisinde üst fazları atılır. Falkonlardaki pelletler Tam M199 besiyeri ile resüspande edilir. T-25 flasklara her birinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde ekilir ve kapağı gevşetilerek inkübatöre konulur (37 °C, %95 hava, %5 CO₂).

Bir günlük inkübasyon süresinden sonra besiyeri değiştirilir. Değiştirme işlemi, besiyeri çekildikten sonra 37 °C'deki 5 ml PBS ile yıkanıp, ardından 37 °C'deki taze besiyeri konarak yapılır. Bu şekilde flaska yapışmayan hücreler uzaklaştırılmış olur. Besiyeri değiştirildikten sonra hücrelerin yüzeye yapışıp yapışmadıkları mikroskop altında kontrol edilir.

Besiyerinin renk ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğunu gözlemek için kültürler günlük olarak kontrol edilirler. Hücreler yüzeyi tam olarak kaplayana kadar, iki günde bir, tam M199 besiyeri ile besiyeri değiştirilir.

Dokudan izole edilen endotel hücreleri kabın yüzeyini %100 kapladıktan sonra deneye alınmıştır. Hücreler belli dozlarda uavabain ve rho-kinaz inhibitörü olan Y27632 ile inkübe edilmiş ve iki boyutlu jel elektroforezi ile proteomik analiz yapılmıştır.

Flasklarda kültüre edilen endotel hücrelerine ilaç uygulaması sonucu faz kontrast mikroskopunda hücreler morfolojik olarak incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.2. Faz Kontrast Mikroskopisi

T-25 flasklara ekilen hücrelere yüzeyi tamamen kapladıktan sonra ilaç uygulanmış ve hücrelerin, ilaç inkübasyon süresinden sonra en az üç farklı alanda fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3. Kültüre Hücrelerden Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Uvabain ve Y27632 uygulanan hücreler flasktan 3 ml Tam M199 besiyeri ile kazınır. İçerik 2 ml'lik eppendorflara alınır ve 1500 rpm'de, +4 °C'de, 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant atılır ve pellet 100'er µl 8 M UREA, %2 CHAPS, %0.5 ZOOM Carrier Ampholyte ve 1tb/ 500 µl proteaz kokteyli içeren tamponda, 2 tur ultrasonik homojenizatör kullanılarak, homojenizasyon işlemi yapılır. İçerik 1500 rpm'de 10 dakika +4 °C 'de santrifüj edilir. Bu 10 dakika sonunda süpernatantlar alınarak -20 °C'de saklanır.

3.2.4. Protein Miktar Tayini

Santrifüj sonrası homojenatların total protein konsantrasyonu, "Bisinkoninik Asit" yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Örnekler 1:7 oranında dilüe edildikten sonra plakanın her kuyucuğuna 20 µl olmak üzere 2'şerli olarak konulmuştur. Üzerine 1:50 oranında karıştırılmış %4 bakır sülfat ve bisinkoninik asit karışımı ilave edilmiştir. Plak 37 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra 562 nm'de okutulmuştur. Sığır serum albümini standartlarına karşı okutulan değerlerden hareketle örneklerin protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5. İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)

-20 °C'de saklanan örnekler eşit miktarlarda protein içerecek şekilde rehidratasyon tamponu ile 155 µl 'ye tamamlanır. ZOOM IPGRunner Kaset (Invitrogen)'e yüklenir. İçerisine ZOOM pH 3-10 Non-Linear stripler (Invitrogen) yerleştirilir. Çukurların üzeri invitrogen etiketleri ile hava almayacak şekilde kapatılır. Kasetler gece boyu oda ısısında beklemeye bırakılır. Ertesi gün etiketlerle beraber alttaki plastik tabaka çıkartılır. Invitrogen'e özel filtreler çıkartılan yerlere yerleştirilir ve distile H₂O ile ıslatılır. Fazla H₂O filtre kâğıdı ile alınır. Daha sonra bu kaset tanka yerleştirilip diğer tarafına boş kaset konulur. Sadece dış kısmı distile H₂O ile doldurularak aşağıdaki gibi, elektroforez tankının içerisinde, izoelektrik odaklama (IEF) uygulanır.

200V-----	20 dakika
450V-----	15 dakika
750V-----	15 dakika
200V-----	30 dakika

Bu sürüklenme süresinden sonra stripler alınarak hazırlanan dengeleme tamponu içine jel tarafı üstte kalacak şekilde yerleştirilir ve 15 dakika beklenir.

Hazırlanan yürütücü tampondan 10 ml alınarak üzerine 0.05mg agaroz konulur ve mikrodalga fırında 2-3 saniye 3-4 kez kaynatılır.

NuPAGE 4-12 %Bis-Tris 1mm jeller çıkartılır, tırnakları atılır ve çukurları düzeltilerek ısınması için oda ısısında bekletilir.

pH 3-10 stripler “+” ucu işaretleyici (marker) kuyucuğu tarafında kalacak şekilde NuPAGE 4-12 %Bis-Tris 1mm jelle yerleştirilir. Isıtılan agaroz çukura yavaşca işaretleyici tarafına geçmeyecek şekilde doldurulur. Jelleşme için yaklaşık 15-30 dakika beklenir ve Mark12 Unstained Standard işaretleyici kuyucuğuna yerleştirilir.

Jeller ikişerli olarak tanka yerleştirilir. İçi ve dışı yürütücü tampon ile doldurularak 200 V’da 1 saat elektroforez uygulanır.

Elektroforez bitince kasetler tanktan çıkarılır ve yürütücü tampon içerisinde, jelin kurumamasına dikkat edilerek kasetler kırılıp jeller ayrı bir kaba alınır. Alınan jeller üzerine yavaşca “Invitrogen Simple Blue Safestain” boya konulur. Gece boyu çalkalayıcıda üzeri kapatılarak boyamaya bırakılır. Yeterli boyamadan sonra jeller sodyum azit içerisine alınarak +4 °C’de muhafaza edilir.

3.2.6. MALDI-MS ve Veritabanı Oluşturma

Sodyum azit içerisinde saklanan jellerin Versa-Doc Imaging System yardımı ile görüntüleri alınır. Bu görüntüler, PDQuest programına aktarılarak analizleri yapılır. Analiz işleminde bir jel master jel olarak seçilir ve diğer jeller bu jele göre eşleştirilir.

Eşleştirme sonrasında belirlenen spotlar “The Proteom Works Spot Cutter” ile kesilir. Kesilen spotlar plate içerisine alınır ve MALDI uygulaması için tripsinizasyon işlemi yapılır.

Tripsinizasyon işleminde, her bir kuyucuğa 50'şer μl 37°C 'deki $100\text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ ve ACN (Asetonitril = Metilsiyanür) ilave edilir. 10 dakika inkübe edilir. (Bu yöntemde yapılan bütün inkübasyonlar 37°C 'de uygulanmaktadır.) Konulan solüsyonlar pipet yardımı ile geri çekilir ve aynı işlem tekrar uygulanır. Sonra $50\text{ }\mu\text{l}$ ACN kuyucuğa ilave edilir, 5 dakika inkübe edilir. ACN geri alınır, 10 dakika daha inkübe edilir. Üzeride $50\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM DTT ve $50\text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ çözeltisi eklenir, 30 dakika inkübe edilir. Kuyucuğa $50\text{ }\mu\text{l}$ 55 mM iyodoasetamid ve $50\text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ eklenir ve tekrar 20 dakika inkübe edilir. $100\text{ }\mu\text{l}$ ACN kuyucuğa ilave edilir, 5 dakika inkübe edilir ve tüm sıvı geri alınır. Sonra $50\text{ }\mu\text{l}$ $100\text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ kuyucuğa konur ve 10 dakika inkübe edilir. Üzerine $50\text{ }\mu\text{l}$ ACN eklenir ve 5 dakika daha inkübe edilir. Pipet ile sıvıların hepsi geri alınır. Tekrar $50\text{ }\mu\text{l}$ ACN kuyucuğa eklenir, 5 dakika inkübe edilir ve geri çekilir. Plate 15 dakika oda ısısında bekletilir. $5\text{ ng}/\mu\text{l}$ tripsin olacak şekilde $50\text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ çözeltisi içerisinde hazırlanmış çözüldiden her bir kuyucuğa $30\text{ }\mu\text{l}$ dilüe tripsin eklenir, 30 dakika daha oda ısısında beklenir. Daha sonra plate üzeri streç film ile kaplanarak gece boyu 37°C 'de bekletilir.

Ertesi gün plate çıkartılır ve soğuması için 15-30 dakika bekletilir. Kuyucuğa $30\text{ }\mu\text{l}$ ekstraksiyon tamponu eklenir. Üzeri kapalı bir şekilde 30 dakika oda ısısında bekletilir. Kısa süreli bir santrifüj yapılır. Sıvı faz temiz PCR Plate'e alınır. İlk plate, $12\text{ }\mu\text{l}$ ekstraksiyon tamponu ve $12\text{ }\mu\text{l}$ ACN ile yıkanır, 30 dakika daha beklenir ve sıvı faz tekrar temiz PCR Plate'e eklenir. 2-3 saat kurutma yapılır.

Kurutma işleminden sonra MALDI'ye yüklenecek örnek üzerine $5\text{ }\mu\text{l}$ örnek solventi eklenir.

Önceden tartımı yapılmış matriks üzerine mg başına $50\text{ }\mu\text{l}$ olacak şekilde solvent ilave edilir.

HPLC su ve ACN ile MALDİ plate kuyucukları yıkanır. Kuyucuklardan birine kalibrasyon için bilinen bir protein (5-peptit) yüklenir. Diğer kuyucuklara hazırlanan örneklerden 2'şerli olarak yükleme yapılır. MALDİ Plate'i kuruması için çeker ocak altında bekletilir. Kuruma sonrası MALDİ 'de okutulur.

Okunan sonuçlar Mascot Veri Tabanı'ndaki veriler ile karşılaştırılarak analiz edilir.

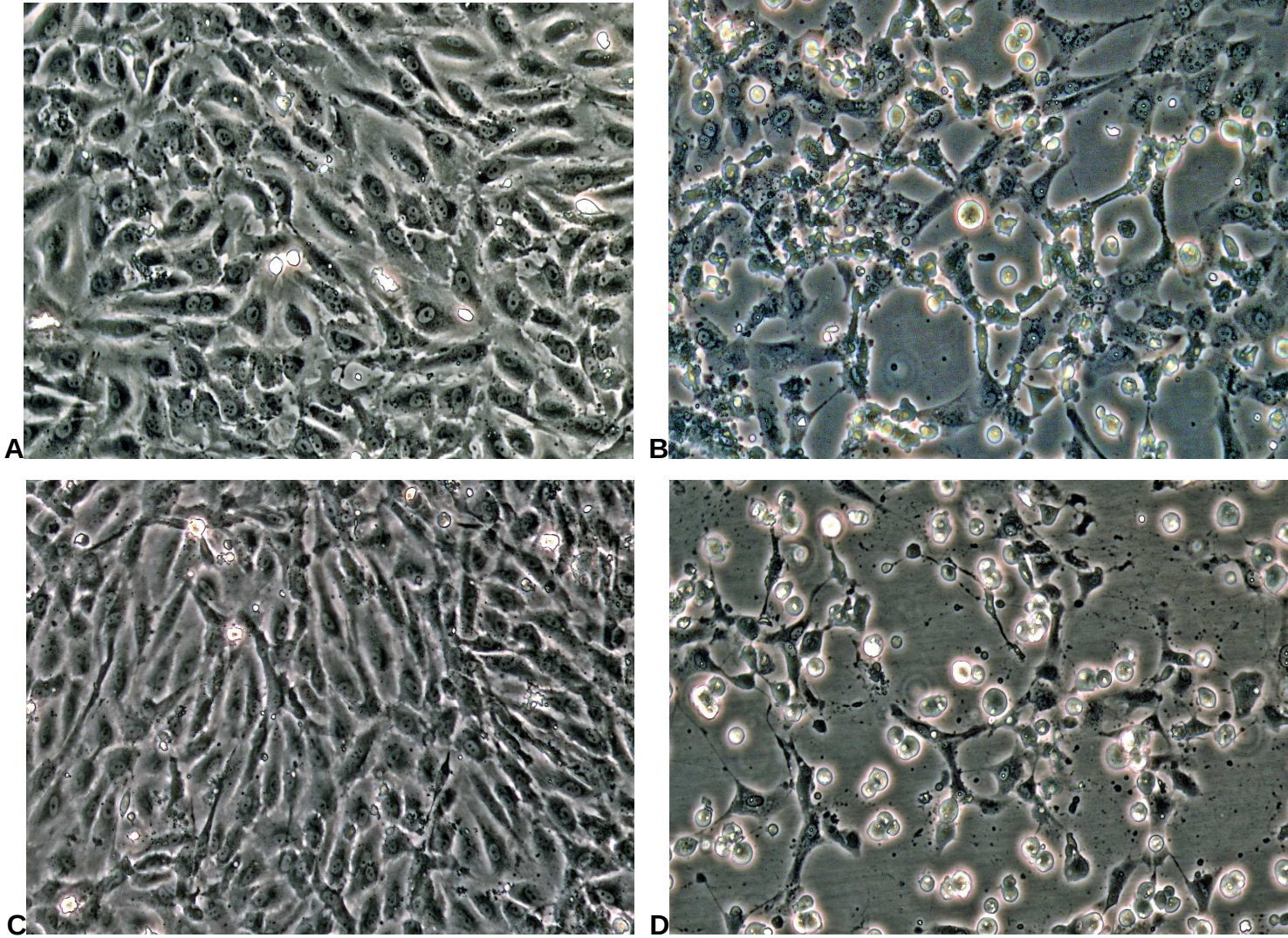
3.2.7. İstatiksel Analiz

Hücre lizatlarındaki protein ekspresyonlarının karşılaştırılmasında tek yönlü Varyans (ANOVA) analizi kullanılmıştır. $p < 0.05$ düzeyi istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Endotel Hücre Morfolojisi Üzerine Uvabainin Etkileri

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerine (HUVEC) 16 saat süre ile 10 μ M uvabain uygulaması, hücrelerin büyük bölümünün zeminden ayrılmasına ve apoptozisin göstergesi olan tomurcuk oluşumuna neden olmuştur. Uvabain aracılıklı bu etkiler üzerinde ROCK'un olası etkilerini saptayabilmek için hücrelere spesifik bir ROCK inhibitörü olan Y27632, uvabain uygulamasından 30 dakika önce, 10 μ M olarak uygulanmış ve bu uygulama tomurcuk oluşumunu inhibe etmiştir. Bu durum, uvabain ile indüklenen tomurcuk oluşumunda ROCK'un etkili olduğunu düşündürmektedir. Endotel hücrelerine ayrıca yalnız Y27632 uygulanmış ve bu uygulamanın hücre morfolojisinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür (Resim 3).

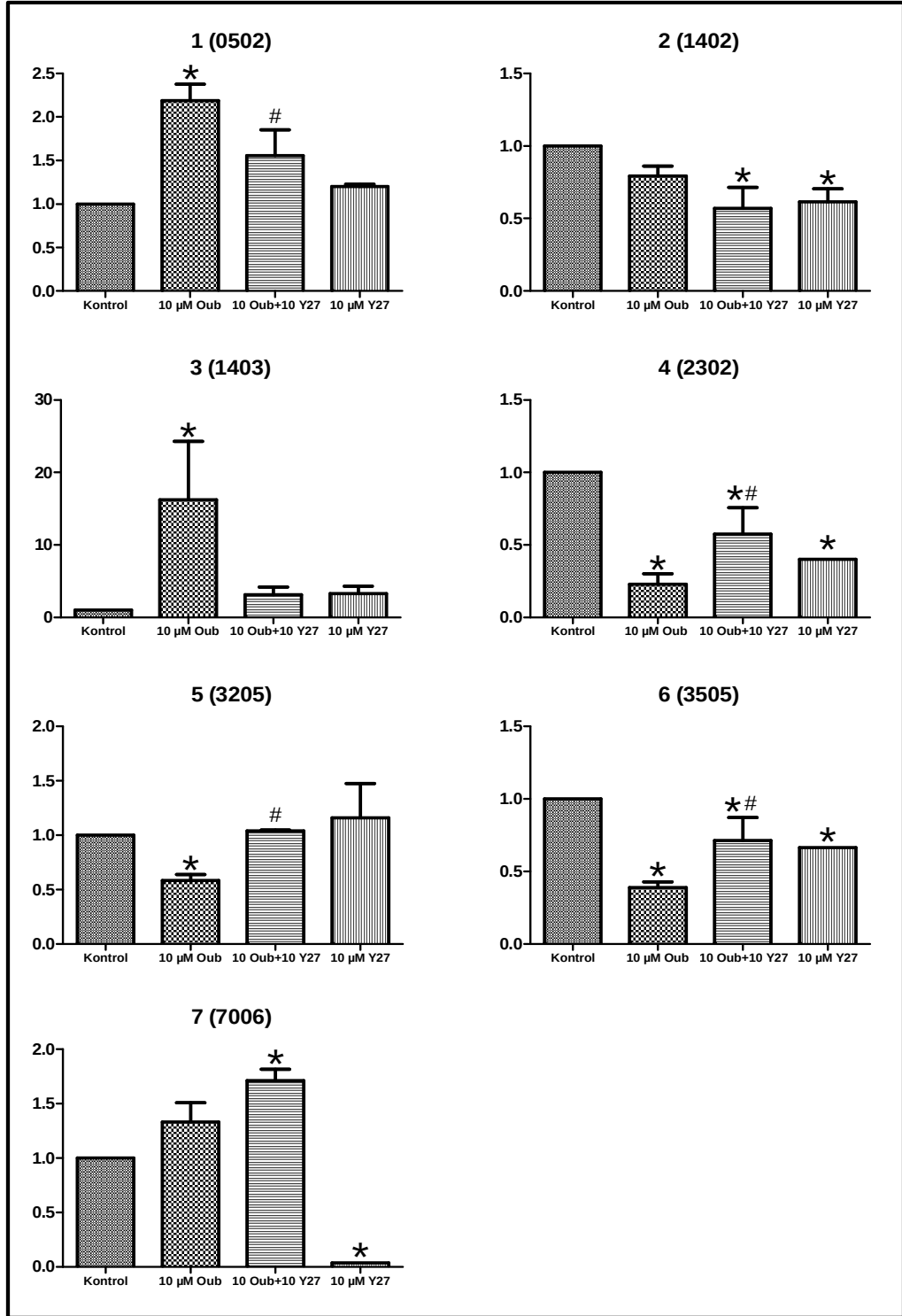


Resim 3: İlaç uygulama sonrası hücrelerin faz kontrast görüntüleri. A: Kontrol, B: 10 µM uvabain, C: 10 µM Y27632, D: 10 µM uvabain + 10 µM Y27632 ön uygulama. 10 µM uvabain uygulaması apoptotik membran tomucuklanması oluştururken, 10 µM Y27632 ön uygulaması ile bu etki inhibe olmuştur. 10 µM Y27632 tek başına uygulandığında hücre morfolojisinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir (Fotoğraflar X100 büyütme ile çekilmiştir).

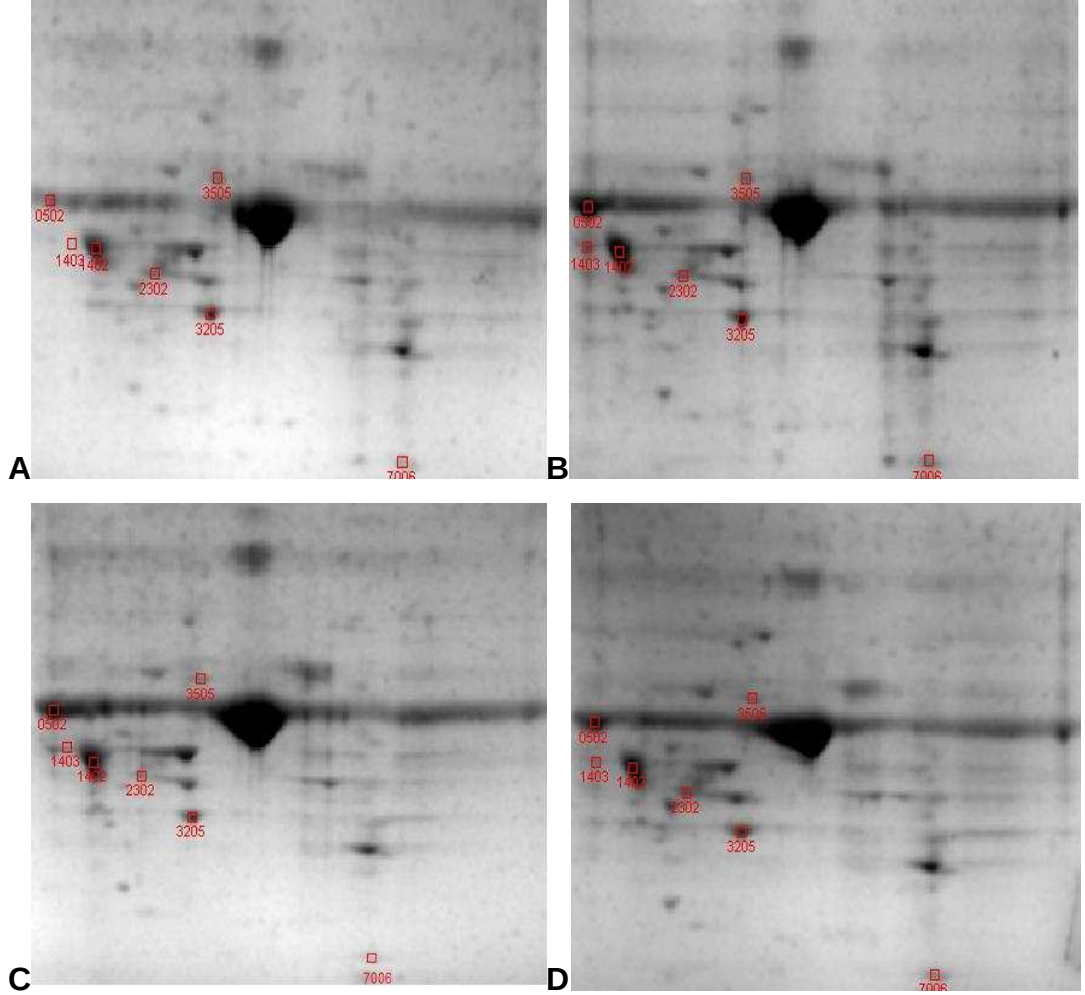
4.2. Uvabainin HUVEC Protein Ekspresyonları Üzerindeki Etkileri

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerine uvabain uygulamasının neden olduğu protein ekspresyonlarındaki olası değişikliklerin belirlenmesi için iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ve kütle spektrometresi (MALDI MS) yöntemleri uygulanmıştır. Bu amaçla hücrelere 16 saat 10 μ M uvabain, 16 saat 10 μ M Y27632 ön uygulamalı 10 μ M uvabain ve yine 16 saat 10 μ M Y27632 uygulanmıştır. Ayrıca bir kontrol grubu seçilmiştir.

Uvabain uygulaması sonucu iki boyutlu jel elektroforezinde PD-Quest programı yardımı ile 204 spot belirlenmiştir. Bu spotların uygulama gruplarımız arasında eşleştirilmesi sonucu protein ekspresyonlarında artış ve azalışlar saptanmıştır (Resim 4). Eşleştirme sonrası kontrole göre, uvabain uygulamasında, 54 spotun ekspresyonlarının değiştiği tespit edilmiştir. Uvabain + Y27632 uygulamasında anlamlı olarak 1.5 kat artmış veya 0.25 kat azalmış olan 7 spot, MALDI-TOF MS'de tanımlanmak üzere seçilmişlerdir (Grafik 1).



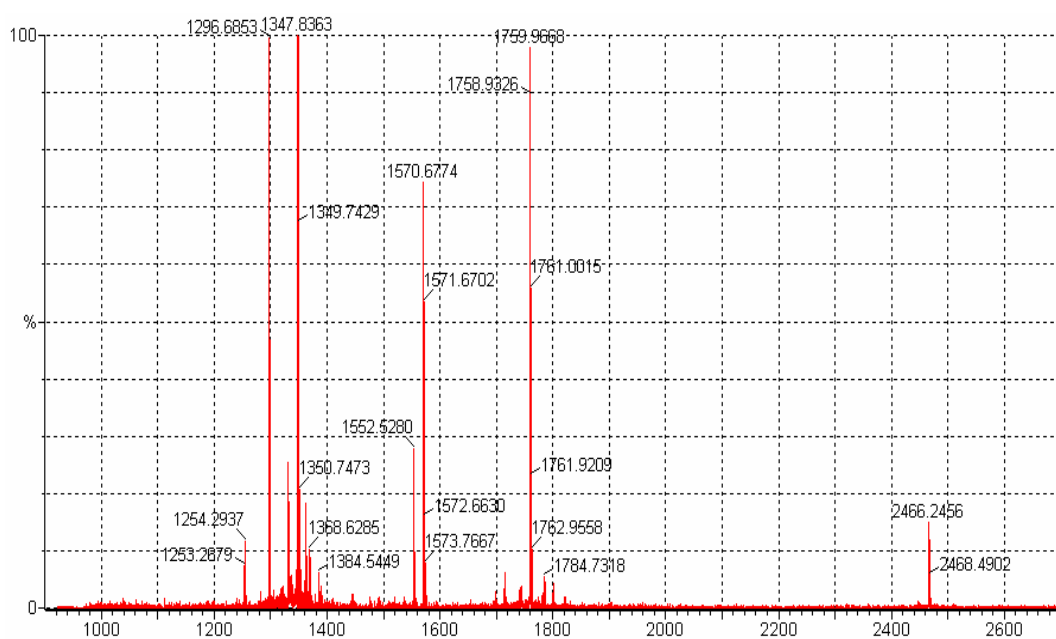
Grafik 1: Uygulamalar sonrası belirlenen 7 spottaki protein ekspresyonu değişimleri ($p < 0.05$). * Uygulamalar ve kontrol gruplar arasında, # 10 µM uvabain uygulanmış ve 10 µM uvabain + 10 µM Y27632 uygulanmış gruplar arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$, y eksenı protein ekspresyonlarının kat artışlarını göstermektedir.)



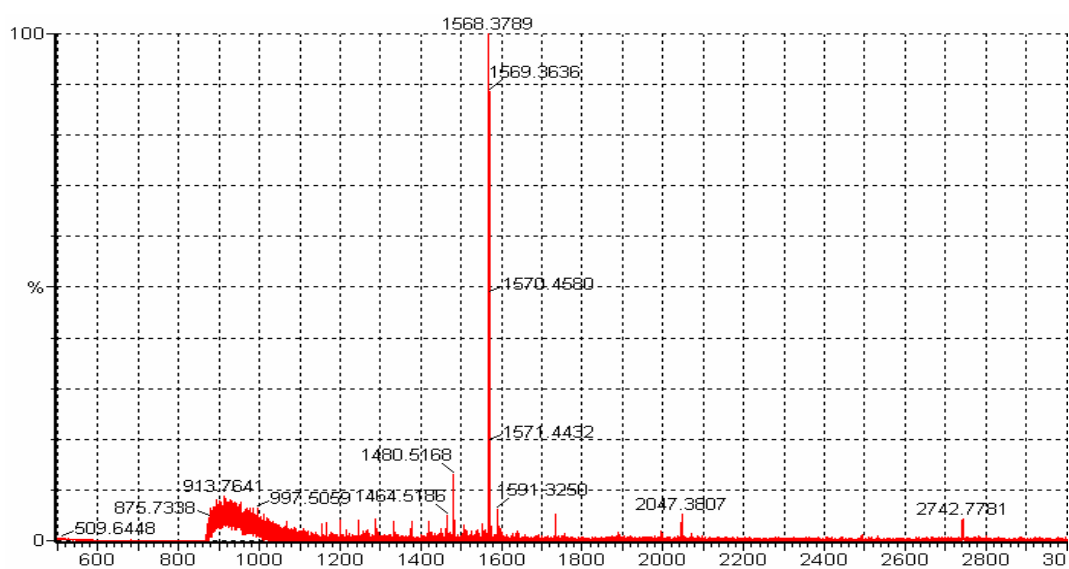
Resim 4: İki boyutlu jel elektroforezi uygulandıktan sonra elde edilen jellerin fotoğraf görüntüleri. Görüntülerde kırmızı ile işaretli olan 7 adet spot, uvabain uygulamasından sonra, protein ekspresyonları 1.5 kat artmış veya 0.25 kat azalmış olduğu için analizleri yapılmak üzere seçilmiştir. A: Kontrol, B: 10 µM uvabain uygulaması, C: 10 µM Y27632 uygulaması, D: 10 µM uvabain + 10 µM Y27632 uygulaması.

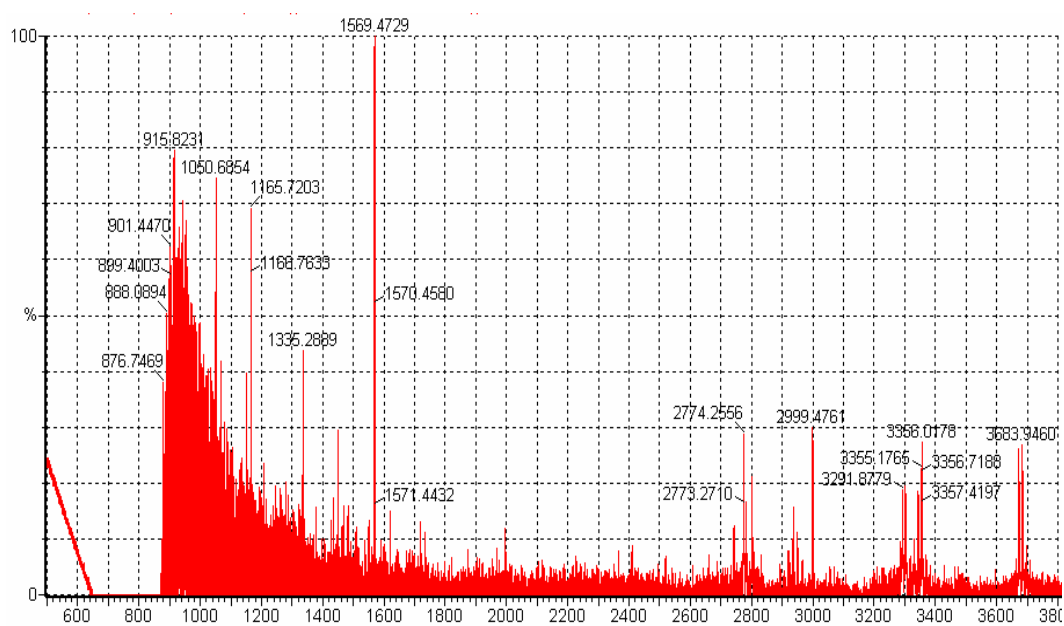
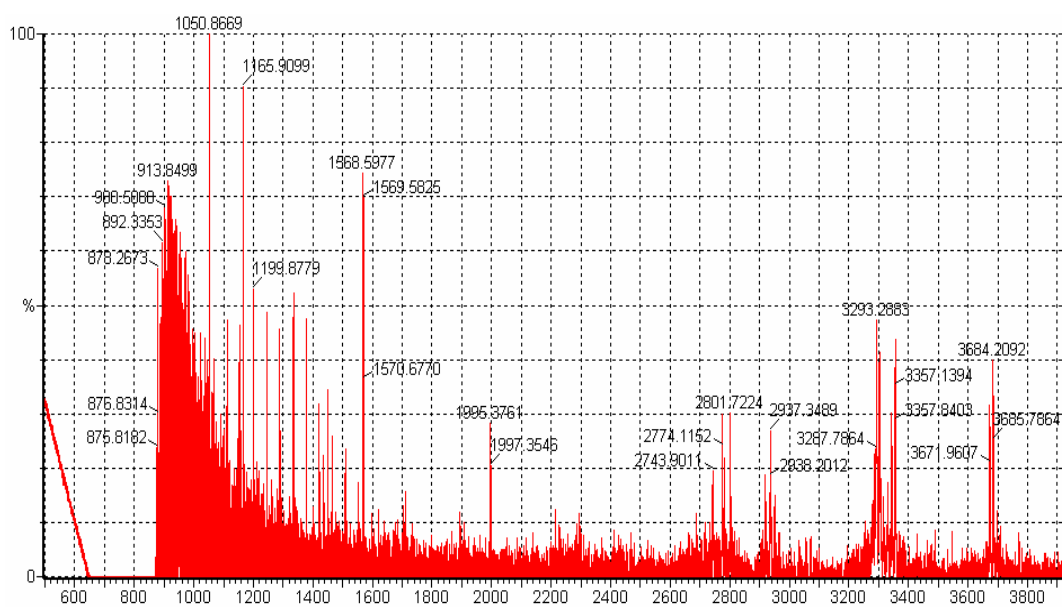
Saptanan bu spotların MALDI (Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu) kütle spektrometresi ile analizleri yapılmıştır (Grafik 2).

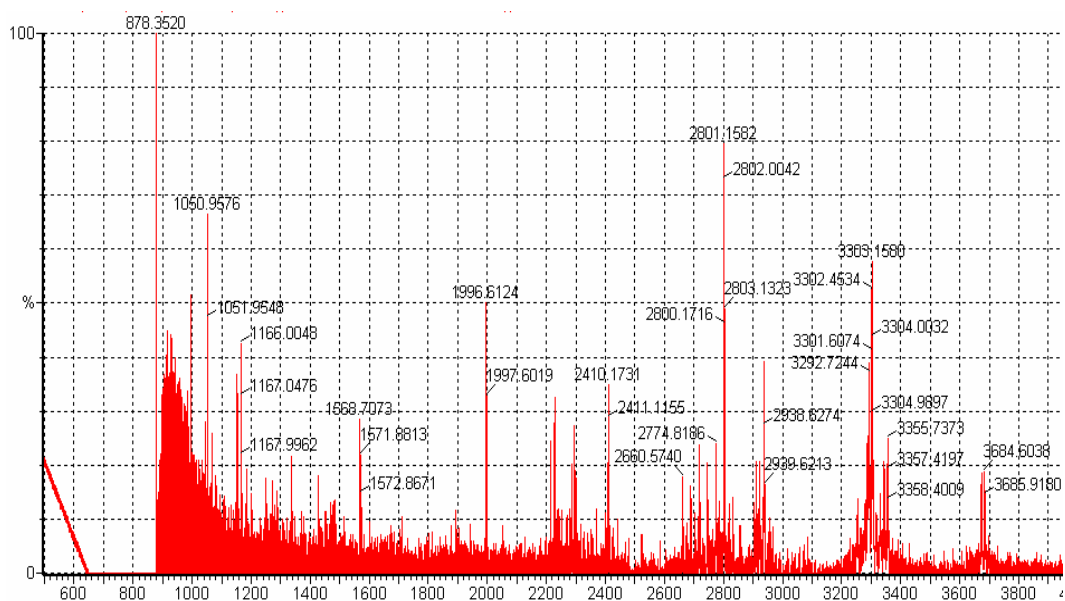
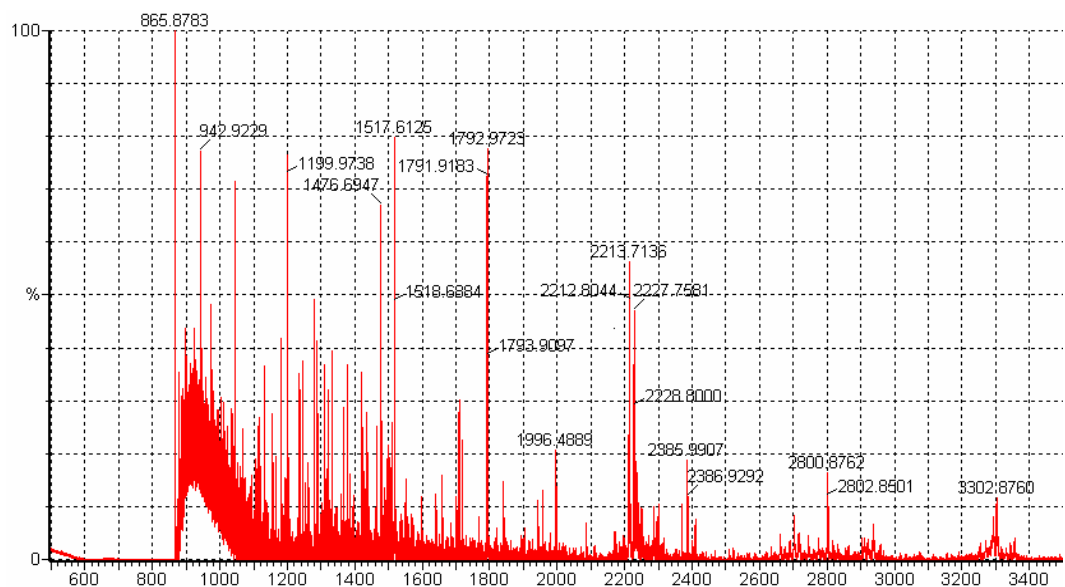
A

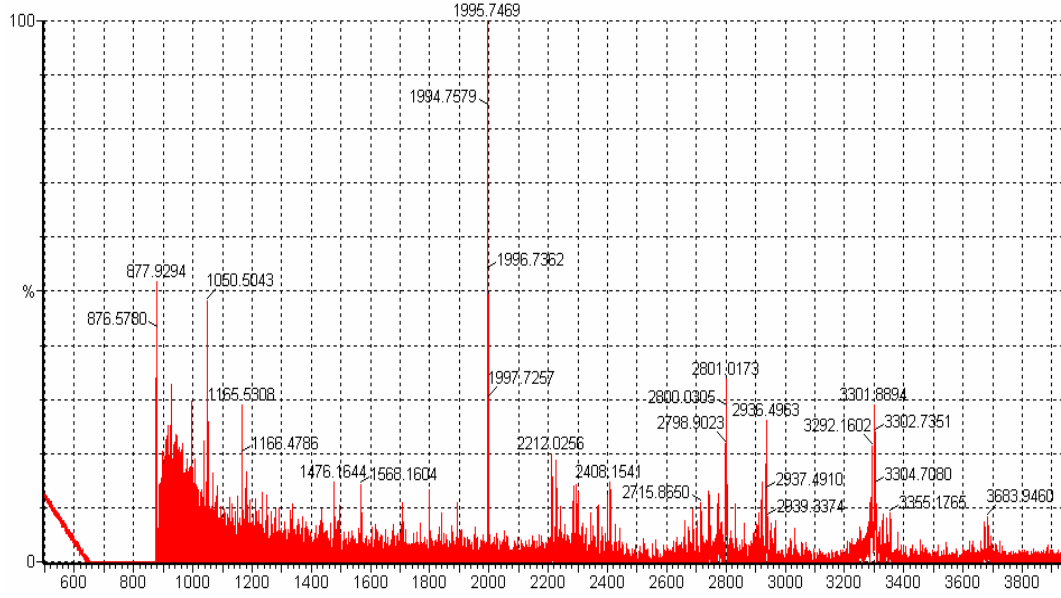
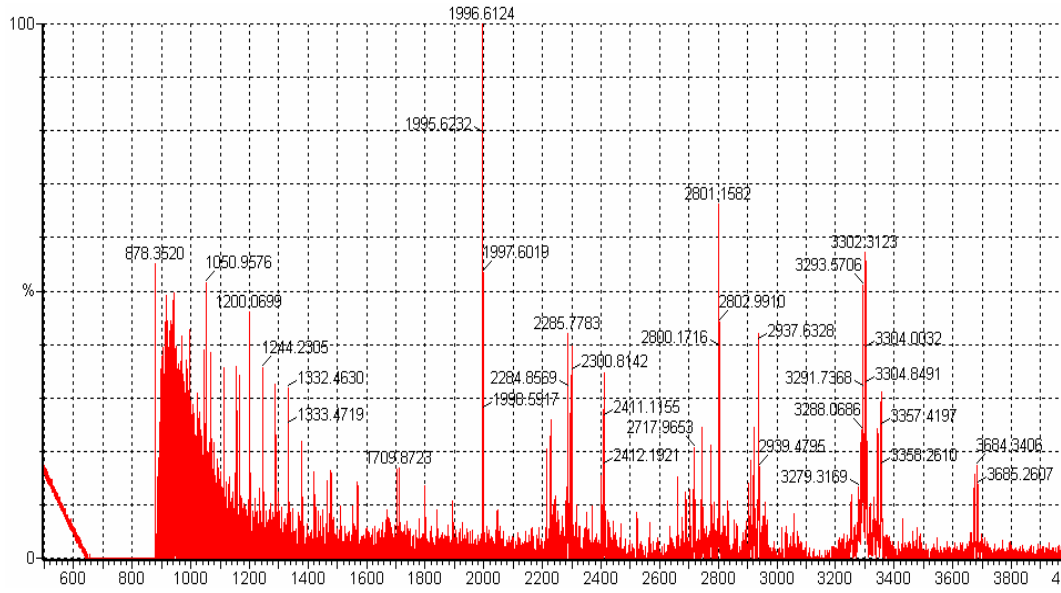


B



C**D**

E**F**

G**H**

Grafik 2: MALDI-MS uygulaması sonrası elde edilen grafikler. Grafiklerde x koordinatı, m/z (kütle/yük) oranını, y koordinatı pikin şiddetini temsil etmektedir. A: 5-peptit (Angiotensin: 1296.6853, Substance P: 1347.7360, Glu Fib: 1570.6774, Renin-14 peptid: 1758.9326, ACTH-18.39: 2465.1989), B-H: Jellerden alınan spotların analizleri, B: 1 nolu spot (0502) , C: 2 nolu spot (1402) , D: 3 nolu spot (1403) , E: 4 nolu spot (2302) , F: 5 nolu spot (3205) , G: 6 nolu spot (3505) ve H: 7 nolu spot (7006).

MALDI sonrasında elde edilen spektrumlar internet üzerinden Mascot veritabanı ile karşılaştırılmış ve tablo 1'deki sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar olasılık yüzdelerine göre sıralanmıştır. Bu sonuçlara göre 1 nolu spotta saptanan "Caspase-7", uvabain uygulaması sonucu yaklaşık 2 kat artmıştır. Y27632 ön uygulaması, bu artışı engellemiştir ve yalnız Y27632 uygulaması ise herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır. 2 nolu spotta belirlenen "Glycoprotein 25L", uvabain uygulaması sonucu yaklaşık 0.25 kat azalmıştır. Y27632 ön uygulaması ve yalnız Y27632 uygulaması ise uvabain uygulamasına göre protein ekspresyonunu azaltmıştır. 3 nolu spotta belirlenen "Protein unc-119 homolog B", uvabain uygulaması ile yüksek bir oranda artmış ve Y27632 ön uygulaması, bu artışı engellemiştir. Yalnız Y27632 uygulaması sonucunda herhangi bir değişiklik görülmemiştir. 4 nolu spotta belirlenen "Neurensin-2", uvabain uygulaması sonucu 0.7 kat azalmış ve Y27632 ön uygulaması bu azalışı inhibe etmiştir. Yalnız Y27632 uygulaması sonucunda bu proteinin ekspresyonunda herhangi bir değişiklik görülmemiştir. 5 nolu spotta saptanan "C-type lectin domain family 2 member D", uvabain uygulaması ile 0.25 kat azalmış ve Y27632 ön uygulaması ile bu artış engellenmiştir. Yalnız Y27632 uygulaması sonucunda herhangi bir değişiklik görülmemiştir. 6 nolu spotta belirlenen "Putative FERM domain-containing protein FKSG43"un ekspresyonu, uvabain uygulaması ile 0.6 kat azalmıştır. Y27632 ön uygulaması bu azalışı engellemiştir. Yalnız Y27632 uygulaması protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. 7 nolu spotta belirlenmiş olan "Cyclin-dependent kinases regulatory subunit-2" ise uvabain uygulaması ile 1.5 kat artmıştır. Y27632 ön uygulaması, uvabain ile gözlenen bu artışın daha da yükselmesine neden olmuştur. Yalnız Y27632 uygulaması sonucu, bu proteinin ekspresyonunda azalma görülmüştür.

Tablo 1: Uvabain uygulanmış hücreler üzerinde yapılan 2-DE sonucu seçilen spotların, MALDI-MS ile analizi sonrası, Mascot veritabanı ile karşılaştırılmasında saptanan proteinler. Proteinler olasılık yüzdelerine göre sıralanmıştır.

SSP No	Tanımlanan Protein	Olasılık	Kod No (Mascot)	Teorik p//Mr	Hesaplanan p//Mr
1(0502)	Caspase-7	%36	CASP7	5.72/34.25	3.13/34.28
	Malectin	%27	MLEC	5.27/32.21	3.13/34.28
	G1/S-specific cyclin-D1	%26	CCND1	4.97/33.70	3.13/34.28
2(1402)	Glycoprotein 25L	%87	G25L	5.38/25.23	3.68/29.37
	Putative tetratricopeptide repeat protein 3-like	%70	TTC3L	4.94/31.63	3.68/29.37
	Tubulin-folding cofactor B	%54	TBCB	5.06/27.31	3.68/29.37
3(1403)	Protein unc-119 homolog B	%65	U119B	5.46/28.12	3.37/29.80
	Anykrin repeat family A protein 2	%57	ANRA2	4.99/34.25	3.37/29.80
4(2302)	Neurensin-2	%67	NRSN2	4.69/21.97	4.46/26.99
	Syntaxin-8	%38	STX8	4.91/26.89	4.46/26.99
	Ras-related protein Rab-6B	%38	RAB6B	5.41/23.45	4.46/26.99
5(3205)	C-type lectin domain family 2 member D	%62	CLC2D	6.37/21.84	5.21/23.59
	Heme-Binding protein 1	%39	HEBP1	5.71/21.08	5.21/23.59
	Coatomer subunit zeta-2	%36	COPZ2	5.08/23.53	5.21/23.59
6(3505)	Putative FERM domain-containing protein FKSG43	%54	FKS43	5.54/41.11	5.30/36.50
	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain	%49	1A24	5.91/40.66	5.30/36.50
	RWD domain-containing protein 2B	%42	RWD2B	5.61/36.31	5.30/36.50
7(7006)	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit-2	%89	CKS2	8.07/9.85	7.74/5.75

5. TARTIŞMA

Hücre içi iyon dengesi ve hücre hacminin düzenlenmesinden sorumlu olan Na^+/K^+ -ATPaz'ın son yıllarda bu özelliklerinin yanı sıra farklı bazı fizyolojik ve patolojik olaylarda da yer aldığı gösterilmiştir. Bunlar arasında hücre içi sinyal iletilisinin oluşumuna aracılık etme ve hücre-hücre bağlantı bölgelerindeki hücreler arası temasın sağlanması da yer almaktadır¹⁵. Na^+/K^+ -ATPaz'ın aracılık ettiği bu işlevlerin büyük bir kısmına, insanda dahil olmak üzere, memelilerde endojen olarak sentezlendiği gösterilmiş olan uvabain aracılık etmektedir^{8,9}. Uvabain, yüksek afinite ile Na^+/K^+ -ATPaz'a bağlanmakta ve bu enzimin rol oynadığı birçok olayın düzenlenmesine aracılık etmektedir. Ancak uvabainin bu etkisinin doz ve uygulandığı hücre tipine bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir^{2,34}.

Uvabain ve diğer bazı kardiyak glikozidler, uzun yıllardan beri konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılan bir ilaç grubunu oluşturmaktadır. Bu ilaçlarla tedavi sırasında uvabain ve benzeri kardiyak glikozidlere maruz kalan ilk hücre tipini endotel hücreleri oluşturmaktadır^{4,35}. Uvabainin endotel hücrelerindeki etkinliği, iki farklı doz aralığına sahiptir. Uvabain, düşük dozlarda endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ederken, yüksek dozlarda bu hücrelerde apoptotik hücre ölümlerine neden olmaktadır^{2,34}. Uvabainin bu etkisinde birçok sinyalleme yolağının rolüne ilişkin çalışmalar yapılmış olmasına rağmen bu olayın mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Diğer taraftan küçük G proteinlerinden olan rho ve onun en çok çalışılan efektörü rho-kinazların da birçok hücre tipinde gözlenen apoptotik olaylarda önemli işlevlere sahip olduğu bilinmektedir.

Biz de bu tez kapsamındaki çalışmalarla uvabainin indüklediği apoptotik hücre ölümlerine bağlı olarak gözlemlenen hücresel protein ekspresyonlarındaki değişiklikler ile rho kinaz enzimi arasında herhangi bir ilişkinin bulunup bulunmadığını proteomik yöntemler kullanarak belirlemeye çalıştık.

Yapılan çalışmalar sonucunda normal endotel hücrelerinde 204 adet spot belirledik. Bu spotların 54 tanesinin uvabain uygulaması ile değiştiğini gözlemledik. Bu 54 spottan 7 tanesinin yoğunluğunun selektif bir rho-kinaz inhibitörü olan Y27632 ön uygulaması ile değiştirildiğini saptadık. Daha sonra bu 7 spot MALDI-TOF MS ile analiz edildiğinde en yüksek olasılıklı proteinlerin caspase-7, glycoprotein 25L, protein unc-119 homolog B, neurensin-2, C-type lectin domain family 2 member D, putative FERM domain-containing protein FKSG43 ve cyclin-dependent kinases regulatory subunit-2 oldukları belirlenmiştir. Bu spotlardan caspase-7 ve protein-unc-119 homolog B proteinlerinin miktarları, uvabain uygulaması ile artmış, Y27632 ön uygulaması ile azalmıştır. Buna ek olarak neurensin-2, C-type lectin domain family-2 member D ve putative FERM domain-containing protein FKSG-43 proteinlerinin miktarları, uvabain uygulaması ile azalmış ve Y27632 uygulaması ile artmıştır. Bulgularımız, uvabain aracılıklı bu protein ekspresyonlarındaki değişikliklerde rho/rho-kinaz yolağının rolünün olacağını düşündürmektedir.

Qiu ve ark. insan umbilikal ven endotel hücrelerinde uvabain ile indüklenen apoptozisdeki protein ekspresyon değişikliklerini incelenmişlerdir. Ancak bu araştırmacılar, uvabain aracılıklı protein ekspresyonlarındaki değişiklikleri incelemişler, fakat bu değişiklikler üzerinde hangi yolakların etkili olabileceğine dair bir araştırma yapmamışlardır.

Belirlediğimiz bu 7 spota ait proteinlerin gerçekten de sözü edilen proteinler olup olmadığının kesinleştirilmesi için Western-Blot ve RT-PCR gibi alternatif yöntemler kullanılarak doğrulanması gerekmektedir. Diğer taraftan çalışmamız sonucunda belirlenen proteinlerin hücresel işlevlerinin ne olduğunun ve uvabain ile indüklenen apoptozisin nedeni mi yoksa sonucu mu olarak ortaya çıktıklarının belirlenebilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Uvabain ve rho kinazların rol oynadığı birçok patolojik olay birbirleri ile örtüşmektedir. Dolayısıyla uvabain aracılıklı bu patolojilerde, bu maddenin etkisine rho-kinaz enziminin aracılık etmesi olasıdır. Biz de bu tez kapsamındaki çalışmalar ile uvabain aracılıklı total protein ekspresyonlarındaki olası değişiklikler üzerinde rho-kinaz yolağının katkısını belirlemeye çalıştık. Bu amaçla endotel hücreleri kronik olarak uvabaine maruz bırakılmış ve total protein ekspresyonları ile rho-kinaz inhibisyonu arasındaki olası ilişki proteomik yöntemler ile belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmalarımızın sonucunda 7 adet proteinin ekspresyonlarındaki değişiklikler ile rho-kinaz enzimi arasında bir ilişkinin olabileceğini belirledik. Bu proteinler yüksek olasılıkla, caspase-7, glycoprotein 25L, protein unc-119 homolog B, neurensin-2, C-type lectin domain family 2 member D, putative FERM domain-containing protein FKSG43 ve cyclin-dependent kinases regulatory subunit-2 proteinleri olabilir.

Belirlediğimiz bu 7 spota ait proteinlerin gerçekten de sözü edilen proteinler olup olmadığının kesinleştirilmesi için Western-Blot ve RT-PCR gibi alternatif yöntemler kullanılarak doğrulanması gerekmektedir. Diğer taraftan çalışmamız sonucunda belirlenen proteinlerin hücresel işlevlerinin ne olduğunun ve uvabain ile indüklenen apoptozisin nedeni mi yoksa sonucu mu olarak ortaya çıktıklarının belirlenebilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Bir integral membran proteini olan Na^+/K^+ -ATPaz, hücrelerdeki iyonik dengenin sağlanmasında rol oynamaktadır. Kardiyak glikozitlerden uvabain ise, bu iyon pompasının spesifik inhibitörüdür. Hücreler uzun süre uvabaine maruz bırakıldıklarında apoptotik hücre ölümleri gözlemlenmiştir^{2,34}. Ama bu mekanizmanın nasıl olduğu tam olarak aydınlatılamamıştır. Rho-kinazlar (rho-kinaz 1 ve rho-kinaz 2), küçük G proteinleri içerisinde en çok araştırılan efektörlerden biridir^{65,66}. Apoptozisdeki birçok biyokimyasal ve morfolojik olayda görev almaktadırlar¹⁴. Bu çalışmada uvabain ile indüklenmiş apoptotik hücre ölümlerinde, rho-kinazın olası rolünü proteomik yaklaşımlar kullanarak değerlendirdik.

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri, spesifik rho-kinaz inhibitörü Y27632 varlığı veya yokluğu durumunda 16 saat süreyle uvabaine (10 μM) maruz bırakılmıştır. Hücre homojenatları, 2-D jel elektroforezi ile ayrılmış ve “Invitrogen Simple Blue Safestain” ile boyanmıştır. Uvabain uygulaması sonucunda, 54 spotun değiştiği tespit edilmiştir. Uvabain + Y27632 uygulamasında değiştiği gözlenmiş olan 7 protein, MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmak üzere seçilmiştir. Caspase-7 ve protein-unc-119 homolog B proteinlerinin miktarları uvabain uygulaması ile artmış, Y27632 ön uygulaması ile azalmıştır. Buna ek olarak neurensin-2, C-type lectin domain family-2 member D ve putative FERM domain-containing protein FKSG-43 proteinleri uvabain uygulaması ile azalmış ve Y27632 uygulaması ile artmıştır.

Bu sonuçlar, bu proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler üzerinde rho-kinaz yolağının önemini göstermektedir. Bununla birlikte sonuçlarımızın doğrulanması ve bu proteinlerin öneminin belirlenmesi için daha başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: uvabain, rho-kinaz, proteomik

8. SUMMARY

Na^+/K^+ -ATPase is an integral membrane protein that maintains ionic balance in the cells. Ouabain, a cardiac glycoside, is a specific inhibitor of the pump. It has been shown that prolonged exposure to cells to ouabain results in an apoptotic cell death^{2,34}. However the exact mechanism of this effect was not completely understood. Rho kinases (Rho kinase-1 and Rho kinase-2), one of the most studied effectors of small G protein Rho, involve in several biochemical and morphological events in apoptosis^{14,65,66}. In the current work, we evaluated possible involvement of rho kinase in the ouabain-induced apoptotic cell death using a proteomic approach.

Human umbilical vein endothelial cells were exposed to ouabain (10 μM) for 16 hours in the presence and absence of the specific rho kinase inhibitor Y-27632. Cell homogenates were separated by 2D gel electrophoresis and stained with coomassie blue. It was detected that 54 spots were changed with the ouabain treatment. Seven spots, changed with ouabain plus Y-27632 treatment, were excised and subjected to MALDI-TOF MS to indentify the proteins of interest. Caspase-7 and protein unc-119 homolog B proteins, increased with the ouabain treatment, were decreased by the pretreatment with Y-27632. In addition, neurensin-2, C-type lectin domain family-2 member D and putative FERM domain-containing protein FKSG43 proteins decreased with ouabain treatment, were increased by the pretreatment with Y-27632.

These results indicate that rho kinase pathway may involve in the expression changes of these proteins. However, further studies are needed to confirm our results and to determine the importance of these proteins.

Keywords: ouabain, rho-kinase, proteomic

9. KAYNAKLAR

1. Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 1957; 23: 394-401.

2. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na^+/K^+ -ATPase emerges as an interesting drug target. *Journal of Internal Medicine* 2007; 261: 44-52.

3. Skou JC. and Esmann M. The Na^+/K^+ -ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24: 249-261.

4. Withering W. An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases. London; G. G. J. & J. Robinson: 1785.

5. Croyle ML, Woo AL, and Lingrel JB Extensive random mutagenesis analysis of the Na^+/K^+ -ATPase Alpha subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity-implications for ouabain binding. *Eur J Biochem* 1997; 248: 488-495.

6. Vasiletes LA, Takeda K, Kawamura M, and Schwarz W Significance of the glutamic acid residues Glu334, Glu959, and Glu960 of the α subunits of Torpedo Na^+/K^+ pumps for transport activity and ouabain binding. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368: 137-149.

7. Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 1998; 46: 84-101.

8. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, and Ludens JH. Identification and characterization of ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6259-6263.

9. Ludens JH, Clark MA, DuCharme DW, Harris DW, Lutzke BS, Mandel F, Mathews WR, Sutter DM, and Hamlyn JM. Purification of an endogenous digitalis-like factor from human plasma for structural analysis. *Hypertension* 1991; 17: 923-929.

10. Hamlyn JM, Lu ZR, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, Laredo J, Hamilton JP, Hamilton MJ, and Hamilton BP. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin Exp Hypertense*. 1998; 20: 523-533.

11. Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J Hypertens*. 1994; 12: 549-560.

12. Hamlyn JM, Laredo J, Shah JR, Lu ZR, Hamilton BP. 11-hydroxylation in the biosynthesis of endogenous ouabain: multiple implications. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 986: 685-693.

13. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001; 81: 153-208.

14. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002; 420: 629-635.

15. Hiroki J, Shimokawa H, Mukai Y, Ichiki T, Takeshita A. Divergent effects of estrogen and nicotine on Rho-kinase expression in

human coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 326: 154-159.

16. Lingrel JB. Na⁺/ K⁺-ATPase: isoform structure, function, and expression. *J. Bioenerg Biomembr* 1992; 24: 263-270.

17. Farley RA, Heart E, Kabaline M, Putnam D, Wang K, Kasho VN, and Faller LD Site-directed mutagenesis of the sodium pump: analysis of mutations to amino acids in the proposed nucleotide binding site by stable oxygen isotope exchange. *Biochemistry* 1997; 36: 941-951.

18. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of Na⁺/ K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; 988:185-220.

19. Kaplan JH. Biochemistry of Na⁺/ K⁺-ATPase. *Annual Review of Biochemistry* 2002; 71: 511-535.

20. Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na⁺/ K⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269 (31): 19659-19662.

21. Mobasheri A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, Lamb JF, Martin-Vasollo P. Na⁺/ K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Bioscience Reports* 2000; 20 (2): 51-91.

22. Barry WH, Hasin Y, Smith TW. Sodium pump inhibition, enhanced calcium influx via sodium-calcium exchange, and positive inotropic response in cultured heart cells. *Circ Res* 1985; 56: 231-241.

23. Pressley TA, Structure and function of the Na⁺/ K⁺ pump: ten yeras of molecular biology. Mineral and Electrolyte Metobolism 1996; 22 (5-6): 264-271.
24. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na⁺/ K⁺-ATPase. American Journal of Physiology. Renal Physiology 2006; 290 (2): F241-F250.
25. Garty H, Karlish SJ. Role of FXYD proteins in ion trasport. Annoal Review of Physiology 2006; 68: 431-459.
26. Gren NM. Inion –motive Atpases: Structure, function and Regulation New York Academy of science, New York. 1992.
27. Söderholm M, Hebbert H, Skriver E, and Maunsbach AB Asseby of two-dimensional membrane crystal of Na⁺/ K⁺-ATPase. J Ultrastruct Mol Struct Res 1988; 99: 234-243.
28. Levenson R Isoforms of the Na⁺/ K⁺-ATPase: family members in search of function. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1994; 123: 1-45.
29. Albers RW Biochemical aspects of active transport. Annu Rev Biochem 1967; 36: 727-756.
30. Post RL, Hegyvary C, and Kume S, Activation by adenosine triphospate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphospatase. J Biol Chem 1972; 247: 6530-6540.

31. Jorgensen PL Structure, function and regulation of Na⁺/K⁺-ATPase in the kidney *Kidney Int* 1986; 29: 10-20.
32. Burns EL, Nicholas RA, and Price EM Random mutagenesis of the sheep Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit generating the ouabain-resistant mutant L793P. *J Biol Chem* 1996; 271: 15879-15883.
33. Xie Z, Cai T. Na⁺/K⁺-ATPase – mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Molecular Interventions* 2003; 3 (3): 157-168.
34. Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke CW, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matteson DR, Wier WG, Blautein MP. Sodium pump alpha 2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J. Physiol* 2005; 569:243-256.
35. Eisner DA, Smith TW. The Na-K pump and its effectors in cardiac muscle. In *The Heart and cardiovascular System* (Fozzard, H. A., Harber, E, Jennings RB, Katz AM.&Morgan HE, eds), Raven Pres, New York 1992; 863-902.
36. Gheorghiade, M., Mather., Van Velduisen, D.J., and Colucci, W.S. Contemporary use of digoxin in the management of cardiovascular disorders. *Circulation* 2006; 113: 2556-2564.
37. Hamad, E., Mather, P.J., Srinivasan, S., Rubin, S., Whellan, D.J., and Feldman, A.M. Pharmacologic therapy of chronic heart failure. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 2007; 7: 235-247.

38. Hilton PJ, White RW, Lord GA, Garner GV, Gordon DB, Hilton MJ, Forni LG, McKinnon W, Ismail FM, Kenan M, Jones K, Morden WE. An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta. *Lancet* 1996; 348: 303-305.

39. Schoner W. Endogen cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2440-2448.

40. Schneider R, Antolovic R, Kost H, Sich B, Kirch U, Tepel M, Zidek W, Schoner V. Proscillaridin A immunoreactivity: its purification, transport in blood by a specific binding protein and its correlation with blood pressure. *Clinical and Experimental Hypertension* 1998; 20 (5-6): 593-599.

41. Tymiak AA, Norman JA, Bolgar M, DiDonato GC, Lee H, Parker WL, Lo LC, Berova N, Nakanishi K, and Haber E. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 8189-8193.

42. Komiyama Y, Nishimura N, Munacata M, Mori T, Ocuda K, Nishino N, Hirose S, Kosaka C, Masuda M, and Talahashi H. Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12 cells. *J Hypertens*. 2001; 19: 229-236.

43. el-Masri MA, Clark BJ, Qazzaz HM, and Valdes R Jr. Human adrenal cells in culture produce both ouabain-like and dihydroouabain-like factors. *Clin Chem*. 2002; 48: 1720-1730.

44. Murrell JR, Randall JD, Rosoff J, Zhao JL, Jensen RV, Gullans SR, and Haupert GT Jr. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. *Circulation* 2005; 112: 1301-1308.

45. Bhattacharya M, Babwah AV, Ferguson SSG. Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochemical Society Transactions*. 2004; 32 (6): 1040-1044.
46. Laredo J, Shah JR, Hamilton BP, and Hamlyn JM. Alpha-1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells. In: *Na/K-ATPase and Related ATPases*, edited by Tkak S. Amsterdam: Elsevier Science, 2000; 671-679.
47. Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, Schoner W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J Biol Chem* 1998; 273: 784-792.
48. Hong BC, Kim S, Kim T-S, Corey EJ. Synthesis and properties of several isomers of the cardioactive steroid ouabain. *Tetrahedron Lett*. 2006; 47: 2711-2715.
49. Gruber KA, Rudel LL, Bullock BC. Increased circulating levels of and endogenous digoxin-like factor in hypertensive monkeys. *Hypertension*.1982; 4: 348-354.
50. Doris PA. Ouabain in plasma from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1994; 266 (1 Pt 2):H360-H364.
51. Lewis LK, Candele TG, Lewis Jg, Richerds AM, Pidgeon GB, Kaaja RJ, Nicholls MG, Ouabain is not detectable in human plasma. *Hypertension*.1994; 24: 549-555.

52. Gomez-Sanchez EP, Foecking MF, Sellers D, Blankenship MS, Gomez-Sanchez CE. Is the circulating ouabain-like compound ouabain? *Am J Hypertens*. 1994; 7: 647-650.

53. Tamura M, Haris TM, Phillips D, Blair IA, Walg YF, Hellerqvist CG, et al. Identification of two cardiac glycosides as Na(+)-pump inhibitors in rat urine and diet. *J Biol Chem* 1994; 269: 11972-11979.

54. Kitano S, Morimoto S, Nishibe A, Fukuo K, Hirotsu A, Nakahashi T, et al. Exogenous ouabain is accumulated in the adrenals and mimics the kinetics of endogenous digitalis-like factor in rats. *Hypertens Res* 1998; 24: 47-56.

55. Hamlyn JM, Manunta P. Ouabain, digitalis-like factors and hypertension. *J Hypertens*. 1992; 10 (Suppl 7): S99-S111.

56. Ferrandi M, Minotti E, Florio M, Bianchi G, Ferrari P. Age-dependency and dietary influence on the hypothalamic ouabain-like factor in Milan hypertensive rats. *J Hypertens* 1995; 13 (12 Pt 2):1571-1574.

57. Manunta P, Stella P, Rivera R, Ciurlino D, Cusi D, Ferrandi M, et al. Left ventricular mass, stroke volume, and ouabain-like factor in essential hypertension. *Hypertension*. 1999; 34: 450-456.

58. Aizman O, Uhlen P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98 (23): 13420-13424.

59. Nesher M, Shpolansky U, Rosen H, Linchtstein D. The digitali-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. *Life Sciences* 2007; 80: 2093-2107.
60. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 2005; 118: 843-846.
61. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental Cell Research* 2000; 261: 44-51.
62. Barandier C, Ming XF, Yang Z. Small G proteins as Novel Therapeutic Targets in Cardiovascular Medicine. *News Physiol Sci.* 2003; 18: 18-22.
63. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22: 9-32.
64. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1712-1719.
65. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol Chem.* 1995; 270: 29051-29054.
66. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 1996; 392:189-193.

67. Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, Morikkawa K, Kandabashi T, Kawamura N, Kubota T, Ichiki T, Amano M, Kaibuchi K, Takeshita A. Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37: 537-546.
68. Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates Rho-kinase activity. *J. Biol Chem.* 1999; 274: 32418-32424.
69. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and function of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 2000; 261: 44-51.
70. Doran JD, Liu X, Taslimi P, Saated A, Fox T. New insight into the structure-function relationships of Rho-kinase: a thermodynamic and hydrodynamic study of the dimer-to-monomer transition and its kinetic implications. *Biochem J.* 2004; 384: 255-262.
71. Feng J, Ito M, Kureishi Y, Ichikawa K, Amano M, Isaka N, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J. Biol Chem.* 1999; 274: 3744-3752.
72. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki N-Ikeda, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel Messenger for Rho-kinase-mediated Ca^{++} sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Res.* 2002; 91: 112-119.
73. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J Riche N, Beertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC

phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol.* 2001;3: 346-352.

74. Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Breard J. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med.* 2005; 201: 465-471.

75. Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 4219-4229.

76. Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, Kelly K. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho-kinase pathway. *J Cell Biol.* 2002; 157: 291-302.

77. Wilkins M.R, Sanchez J-C, Gooley A.A, Apel R.D, Humphery-Smith I, Hochstrasser D.F, Williams K.L. progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology.* 1995; 13: 19-50.

78. Dove A. Proteomics: translating genomics into products? *Nature Biotechnol.* 1999; 17: 233-236.

79. Pennington SR, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Dunn MJ. Proteome analysis: from protein characterisation to biological function. *Trend Cell Biol.* 1997; 7: 168-173.

80. Wilkins MR, Sanchez J, Gooley AA; Apel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology.* 1995; 13: 19-50.

81. Fleischmann RD, Adams MD, White O. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; 269: 496-512.

82. Merchant M, Weinberger SR. Recent advances in surface enhanced laser-desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2000; 21: 1165-1177.

83. Nelson RW, Nedelkov D, Tubbs KA. Biosensor chip mass spectrometry: a chip- based approach. *Electrophoresis*. 2000; 21: 1155-1163.

84. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnol*. 1999; 17: 676-682.

85. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coated affinity tags. *Nature Biotechnol*. 1999; 17: 994-999.

86. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnol*. 1999; 17: 1030-1032.

87. Uetz P, Giot L, Cagney G. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2000; 403: 623-627.

88. Dunn MJ. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Advanced in Electrophoresis. 1987; vol.1, VCH, Weinheim: 1-109.
89. Smithies O, Poulik MD. Two- dimensional electrophoresis of serum proteins. Nature. 1956; 177: 1033.
90. O'Farrell P.H, Goodman H.M. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell. 1977; 12: 1133-1141.
91. Fenn J.B, Mann M, Meng C.K, Wong S.F, Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science. 1989; 246: 64-71.
92. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. Anal. Chem. 1988; 60: 2299-2301.

10. TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca benden desteğini esirgemeyen, tecrübeleri ile her zaman yoluma ışık tutan tez danışmanım **Doç. Dr. Mustafa ARK'a**,

Hayatımda attığım tüm adımlarda yanımda olduğu gibi tez çalışmamda da benim en büyük yardımcım ve destekçim olan biricik nişanlım **Ecz. Dilek AKGÜN'e**,

Eğitim hayatım boyunca bana yol gösteren ve çalışmalarımda beni destekleyen **Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU'na**,

Yetişmemde emekleri olan hocalarım **Prof. Dr. Fatma AKAR, Doç. Dr. Nilüfer N. TURAN, Yrd. Doç. Dr. Orhan ULUDAĞ ve Öğr. Gör. Dr. Bilgen BAŞGUT'a**,

Yardımları ve ilgilerinden dolayı Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarından **Doç. Dr. Duygu Ö. DEMİRALP, Bio. Naşit İĞCİ ve Uzm. Bio. Beycan AYHAN'a**,

Tez çalışmamdaki yardımlarından ve daimi arkadaşlıklarından ötürü başta **Arş. Gör. Uzm. Ecz. Aysun ÖZDEMİR** olmak üzere **Ecz. Murat HAMAMCILAR, Ecz. Öğr. Seyit ÖCAL, Uzm. Bio. Ayla CİHAN, Uzm. Ecz. Sevtap HAN ve Ecz. Khatereh FETTAPOUR'a**

ve **AİLEME**

teşekkürü borç bilirim.

11. ÖZGEÇMİŞ

EMRAH BAYRAM

İlkyerleşim Mah.355.Sok.No:30 Batıkent/ANKARA

İş: (312) 255 41 20

Cep: (555) 552 46 98

e-mail: emrahbayram84@hotmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Uyruğu: T.C.

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 04/09/1984

Askerlik Durumu: Tecil

Medeni Durumu: Bekar

EĞİTİM

Türkoğlu İlköğretim Okulu (1990-1995)

İrfan Baştuğ İlköğretim Okulu (1995-1998)

Batıkent Süper Lisesi (1998-2002)

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2002-2006)

DENEYİM VE BECERİLER

İletişime açık, ikna edici, sonuç odaklı çalışan ve analitik bakış açısına sahip.

İŞ DENEYİMİ

2006-...: Polen Eczanesi

EĞİTİM ve SEMİNERLER

02/2005: Farkındayız Cinsel Eğitim Programı

YABANCI DİL

İngilizce: Orta seviye

BİLGİSAYAR

Microsoft Ofis 2003; Excel, Word, PowerPoint, Access, Internet

İLGİ ALANLARI

Seyahat etmek, Bilgisayar, Basketbol