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

İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRELERİNDE UVABAİN İLE İNDÜKLENEN APONEKROTİK ÖLÜMLERDE RHO KİNAZIN OLASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Aysun Özdemir

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mustafa ARK

ANKARA
Temmuz 2008

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

İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRELERİNDE UVABAİN İLE İNDÜKLENEN APONEKROTİK ÖLÜMLERDE RHO KİNAZIN OLASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Aysun ÖZDEMİR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mustafa ARK

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2008-04 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Temmuz 2008

Yüksek lisans eğitimimde, çalışmalarımın her aşamasında benden her türlü yardım ve desteği esirgemeyen, yetişmemde büyük emeği olan tez danışmanım, Doç. Dr. Mustafa Ark'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde teşvik ediciliği ve yönlendirmesi ile bana yardımcı olan Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu'na,

Çalışmalarım sırasında bana destek olan Doç. Dr. Nilüfer N. Turan, Yrd. Doç. Dr. Orhan Uludağ ve Öğr. Gör. Dr. Bilgen Başgut'a,

Yardımlarından dolayı Ecz. Ebru Hiçdurmaz, Biol. Ayla Cihan ve Ecz. Sevtap Han'a,

Ve AİLEME,

Teşekkür ederim.

Tezli yüksek lisans eğitimim boyunca, Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile beni destekledikleri için Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim.

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Teziolarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/07/2008

Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri başkanı

Prof. Dr. Bensu Karahalil

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Mustafa ARK

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay i
İçindekiler ii
Şekiller iv
Resimler v
Grafikler vi
Tablolar vii

1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Hücre Ölümleri ve Apoptozis 4
2.1.1. Apoptozis 6
2.2. Na^+/K^+ ATPaz ve Fonksiyonları 9
2.3. Kardiyak Glikozidler 15
2.3.1. Endojen Kardiyak Glikozidler ve Endojen Uvabain 16
2.4. Küçük G Proteinleri ve Rho/Rho Kinaz Yolağı 21
2.4.1. Küçük G Proteinleri 21
2.4.2. Rho/Rho Kinaz Yolağı 22
2.4.2.1. Rho Kinazların Yapısı 22
2.4.2.2. ROCK Aktivitesinin Düzenlenmesi 24
2.4.2.3. ROCK Ekspresyonu ve Lokalizasyonu 27
2.4.2.4. ROCK'un Substratları 27
2.4.2.5. Apoptotik Olayların Düzenlenmesinde ROCK'un Rolü 30
2.4.2.5.1. Membran Tomurcuk Oluşumu 30
2.4.2.5.2. Apoptotik Hücrelerin Fragmantasyonu 33
2.4.2.5.3. Apoptotik Hücrelerin Fagositozu 34
3. GEREÇ VE YÖNTEM 36
3.1. Gereç 36
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 36

3.1.2. Kullanılan Aletler 37
3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı 38
3.2.Yöntem 42
3.2.1. Endotel Hücre Kültürü 42
3.2.2. Faz Kontrast Mikroskobi 44
3.2.3. Floresans Mikroskobi 44
3.2.4. Kültüre Hücrelerden Hücre Lizatlarının Hazırlanması 46
3.2.5. Protein Miktar Tayini 46
3.2.6. Western Blot 47
3.2.7. İstatistiksel Analiz 48
4. BULGULAR 49
4.1. Endotel Hücre Morfolojisi ve Hücre Tutunması Üzerinde Uvabainin Etkileri 49
4.1.1. Faz Kontrast Mikroskobik Bulgular 49
4.1.2. Floresans Mikroskobik Bulgular 53
4.2. Uvabainin ROCK I Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 56
4.3. Uvabainin Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 58
5. TARTIŞMA 60
6. SONUÇ 63
7. ÖZET 64
8. SUMMARY 66
9. KAYNAKLAR 68
10. ÖZGEÇMİŞ 97

ŞEKİLLER

Şekil 1: Nekroz ve apoptoz arasındaki farkın şematik gösterimi 5

Şekil 2: Apoptozisle değişen hücre morfolojisi ve aktin hücre iskeleti yapısı 7

Şekil 3: Kaspaz aktivasyonunun intrinsik ve ekstrinsik yolakları 8

Şekil 4: Na^+/K^+ ATPaz sinyalleme mekanizmalarının şematik gösterimi 12

Şekil 5: Na^+/K^+ ATPaz alt ünitelerinin şematik gösterimi 13

Şekil 6: Hücrelerin birbirine yapıştığı noktalarda Na^+/K^+ ATPaz β_1 alt ünitesinin glikolizasyonunun pompa stabilizasyonundaki rolünü gösteren model 14

Şekil 7: İnsan dokularında tanımlanan dijital benzeri bileşiklerin yapısı 17

Şekil 8: G proteinlerinin aktif ve inaktif formları arasındaki döngü 21

Şekil 9: ROCK I ve ROCK II'nin moleküler yapısı 23

Şekil 10: ROCK aktivitesinin regülasyonu 25

Şekil 11: Apoptotik sinyallemelerde potansiyel ROCK hedefleri 29

Şekil 12: Apoptozis süresinde ROCK bağımlı membran tomurcuk oluşumu ve kaspaz aracılı Rock I kesilmesi 32

Şekil 13: Uvabain uygulanmış ve kontrol grubu hücre lizatlarındaki ROCK I ekspresyonu 57

Şekil 14: Uvabain uygulanmış ve kontrol grubu hücre lizatlarındaki kaspaz 3 ekspresyonu 59

RESİMLER

Resim 1: İlaç uygulama sonrası hücrelerin faz kontrast görüntüleri **50**

Resim 2: Uvabain ve Y27632 uygulanan hücrelerde aktin filamentlerin formasyonu ve membran tomurcuk oluşumu **55**

Resim 3: Resim 2'deki birleştirilmiş görüntülerden yakınlaştırılmış alanlar **56**

GRAFİKLER

Grafik 1: Uvabainin ve Y27632'nin ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi **51**

Grafik 2: Uvabainin ve Y27632'nin ön uygulamasının yüzen hücre sayısına etkisi **52**

Grafik 3: Uvabainin ve Y27632'nin ön uygulamasının tutunmuş hücre sayısına etkisi **53**

TABLOLAR

Tablo 1: Lama ilaç uygulamasının gösterimi **45**

1. GİRİŞ

NA^+/K^+ ATPaz (Na^+ pompası, NKA) kardiyak glikozidler için bilinen tek integral membran reseptörüdür. NKA'nın primer görevi, hücre içi yüksek K^+ düzeyini ve düşük Na^+ düzeyini sağlamaktır[1]. Özellikle Xie ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda, uvabainin NKA'ya bağlanarak enzimin iyon pompalamasını inhibe etmesi dışında, düşük dozlarda da enzimin kısmi inhibisyonuna neden olarak, çeşitli hücre içi sinyalleme mekanizmalarını aktive ettiği vurgulanmıştır[2].

1991'de Hamlyn ve ark.'ı insan plazmasından bitki kaynaklı uvabainden ayırt edilemeyen bir bileşik izole etmişlerdir. Bu keşiften sonra endojen uvabainin etki mekanizmasını araştırmak üzere yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Endojen uvabain memeli plazma, adrenal bez ve hipotalamusunda gösterilmiş olan sodyum pompasının uzun süreli ve iyi bilinen bir inhibitörüdür.

Uvabainin yüksek ve düşük dozlarda farklı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Uvabain, endotel hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiler oluştururken, düşük dozları antiapoptotik etkinliğe sahiptir[3] .

Uvabainin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde, HUVEC'te, C7-MDCK ve PAEC'te doz-bağımlı sitotoksik etkilerini gösteren çalışmalar yapılmıştır[3-8]. Orlov ve ark. 3µM 24 saat uvabain uygulaması ile hücrelerin yaklaşık %80'inin substratumdan ayrıldığını gösterirken[5], Trevisi ve ark. 100nM uvabainin, serum yoksunluğunda indüklenen apoptozise karşı koruyucu bir etki gösterdiğini vurgulamışlardır[3].

Hücre içi birçok sinyalleme mekanizmalarına aracılık eden küçük G proteini Rho'nun, memelilerde en az 10 üyesi bulunmaktadır[9,10]. 1990'ların ortalarında bu üyelerden olan Rho'nun iki efektörü tanımlanmıştır [11,12]. Bunlar ROKα/ROCK II ve ROKβ /ROCK I (Rho kinazlar)'dır[11-13]. Rho kinazların kan basıncı homeostazı, düz kas kontraksiyonu, hücre proliferasyonu, hücre adezyonu, migrasyonu ve inflamatuvar cevabı da içeren çok sayıda önemli fizyolojik fonksiyonlara katıldığı gösterilmiştir[14].

Diğer taraftan her iki ROCK izoformunun da apoptoziste önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. ROCK I, kaspaz 3 aracılıklı kesilme ile aktive olurken; ROCK II, granzim B aracılığı ile kesilerek aktive edilmektedir[15-17]. Aktif formlar, apoptotik hücrelere spesifik olan membran tomurcuk (bleb) oluşumuna aracılık etmektedirler.

Literatürde Rho/Rho kinaz yolağı ve hücre-hücre adhezyonu ve hücrelerin substratumdan kopması (detachment) üzerinde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Rho A sinyalleme yolağının aktivasyonunun, hücre-hücre adhezyonunu azalttığı gösterilmiştir[18]. Diğer taraftan Noren N. K ve ark. hücre-hücre adhezyonunda önemli rolü olan katherinlerin de Rho A aktivitesini önlediğini bulmuşlardır[19].

HUVEC'te yapılan bir başka çalışmada ise, katherin ailesinden olan T-katherin aktivasyonunun, hücre polarizasyon ve adhezyonundaki yeri incelenmişlerdir. T-katherinin, endotel hücrelerinde indüklediği morfolojik ve hücre iskeleti organizasyonundaki değişikliklerin Rho A/ROCK yolağına bağlı olduğu gösterilmiştir[20].

Uvabain ve Rho kinaz üzerindeki bu çalışmalar, uvabain ile gözlenen hücrelerin kopması ve aponekrotik hücre ölümlerinin mekanizmasında Rho kinaz enziminin önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar ile bu hipotez sınanmaya çalışılmıştır.

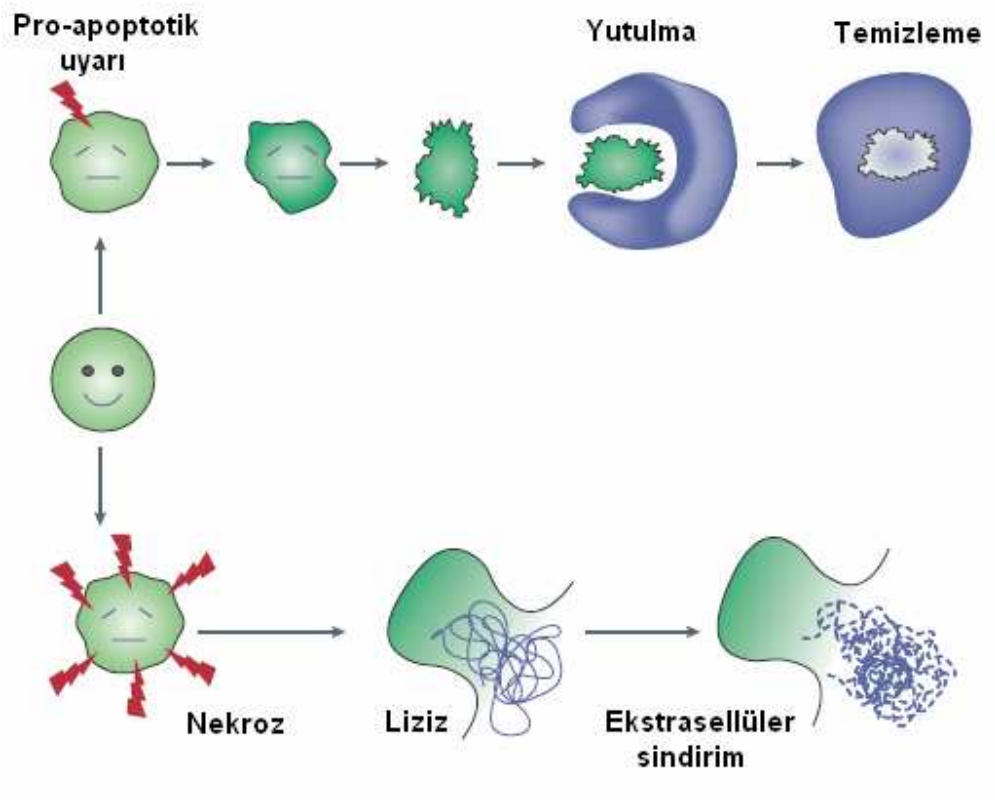
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Ölümleri ve Apoptozis

Hücre ölümlerinin nekrozis (nekroz), apoptozis, anoikis, eksitotoksisite ve otofaji olmak üzere farklı şekiller ile gerçekleştiği bilinmektedir.

Nekroz, patolojik olaylar sonucu gelişen hücre ölüm şeklidir. Hücre hasarını oluşturan travma, hücre kanlanmasının dolayısıyla oksijenlenmenin bozulması, enfeksiyon gibi nedenlere bağlı olarak gerçekleşir. Organeller şişer; hücre sınırları belirgin hâle gelir ve bunların sonucu olarak hücrenin bütünlüğü kimyasal ve yapısal olarak bozulur.

Nekroz, dışardan gelen hasarla plazma membranında oluşan değişiklikler sonucu oluşur. Nekrotik hücre, şişme ve plazma membranının yıkılması sonucunda sitoplazmik içeriği dışarıdaki doku aralığına salar. Hücrenin nekrotik artıkları inflamatuar hücreleri dokuya çekerek bu dokunun parçalanmasına yol açar ve bu, inflamasyon olarak bildiğimiz tablonun oluşmasına neden olur.



Şekil 1: Nekroz ve apoptoz arasındaki farkın şematik gösterimi[178].

Bir çeşit apoptozis olan anoikis, epitel ve endotel hücrelerin ekstrasellüler matriksten ayrılmaları sonucu oluşan ölüm şeklidir[21].

Eksitotoksisite ise sinir hücrelerinin hasar gördüğünde glutamat ve benzeri substratlar tarafından öldürülmesidir. Patolojik durumda yüksek düzeyde bulunan glutamat NMDA reseptörüne bağlanınca hücre içine aşırı miktarda Ca^{+2} girişi gerçekleşmektedir. Hücre içindeki Ca^{+2}, proteaz ve endonükleaz gibi enzimleri aktive eder. Bu enzimler de hücrede bulunan yapılara hasar verir ve ölüm gerçekleşir.

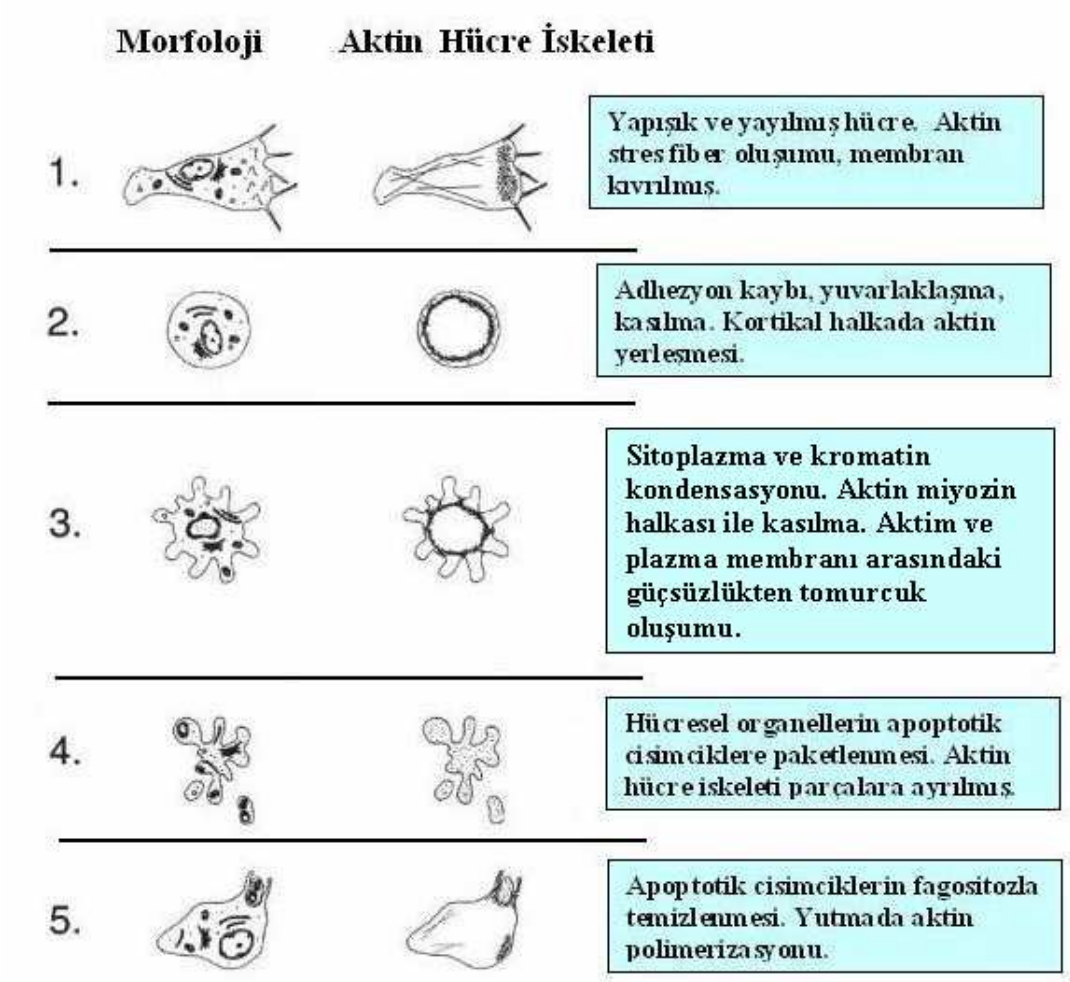
Otofaji (otofagositoz), hücrenin yaşlanmış ve bozulmuş yapılarının, hücrenin kendi lizozomu tarafından sindirilmesidir.

2.1.1. Apoptozis

Apoptozis Yunanca bir kelime olup (apo=-den/-dan ve ptosis=düşmek) ilk kez Kerr ve ark. tarafından tanımlanmıştır[21]. Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür.

Enerji bağımlı olan apoptozis morfolojik değişimlerle kendini gösterir. İlk önce hücre küçülür; nükleusta kromatin yoğunlaşır ve DNA parçalanır. Bu DNA parçaları hücre zarı ile kaplıdır (apoptotik cisimcikler) ve ortamdan çevredeki hücreler tarafından fagositozla uzaklaştırılır[23] (Şekil 2).

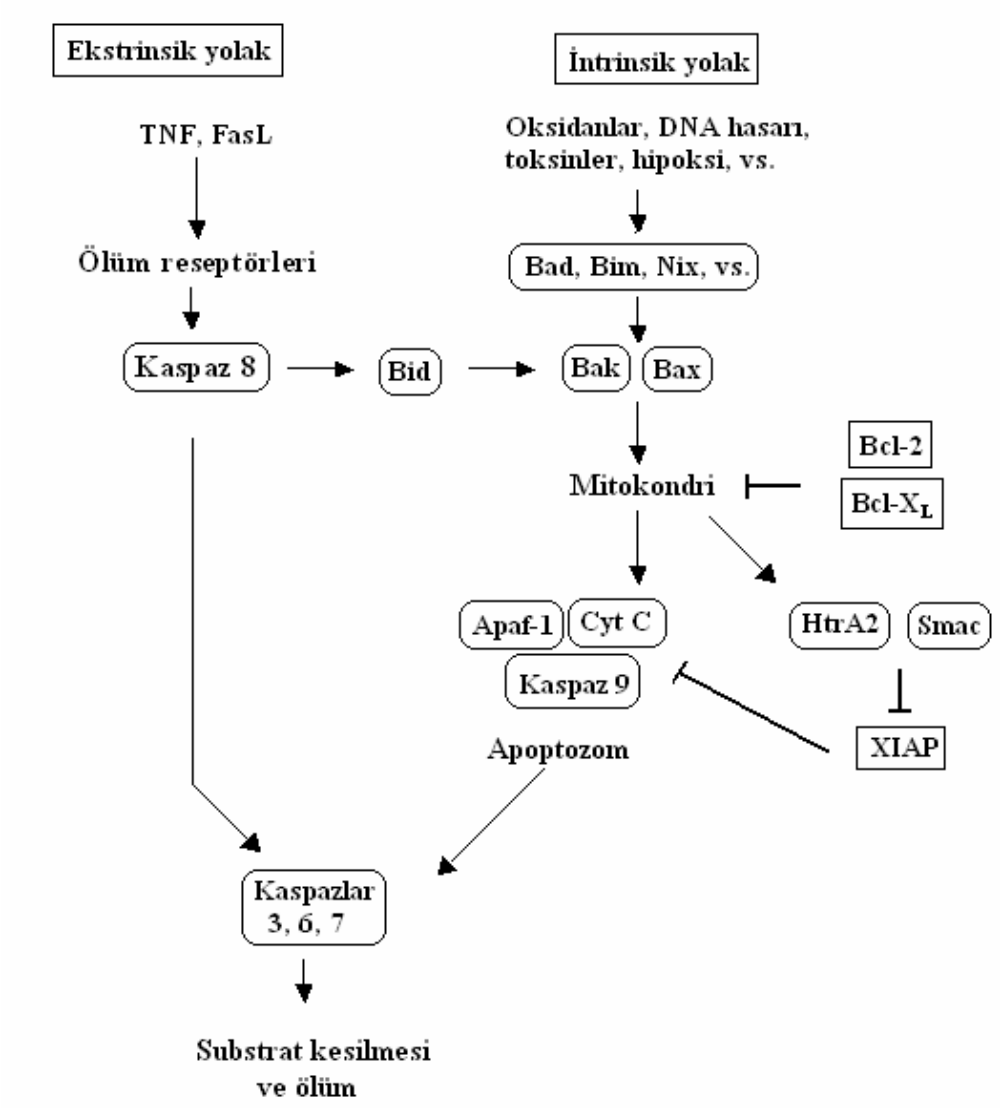
Apoptozis, yaşamın her aşamasında gelişir ve normal doku homeostazında önemli bir rolü vardır[23]. Apoptozis kaspazların aktivasyonu ile sonlanır. Kaspazlar sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Apoptozis iki farklı yolakla oluşabilir. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini kullanan ekstrinsik (dış) yolak spesifik ölüm sinyallerinden sorumludur. Buna zıt olarak intrinsik (iç) yolak endoplazmik retikulum ve mitokondri aracılı sinyalleri içerir[23,24]. Her iki yolakta da kaspaz 3, 6, 7'yi içeren kaspazların aktivasyonu söz konusudur.



Şekil 2: Apoptozisle değişen hücre morfolojisi ve aktin hücre iskeleti yapısı[172]. 1. Normal 2. Erken apoptosiz 3. Tomurcuk oluşumu 4. Geç apoptosiz 5. Fagositozla apoptotik cisimciklerin yutulması

Ekstrinsik yolakta, Fasl ve tümör nekroz faktör (TNF) α gibi ölüm ligandları reseptörleri ile birleştiğinde kendilerine doğal olarak bulunan FADD (Fas associated death domain)[25] ve TRADD (TNFR associated death domain)[26] ile etkileşime geçerler. FADD ve TRADD prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad şeklinde aktivasyonlarını başlatırlar. Aktive kaspaz 8 indirekt olarak prokaspaz 3'ü aktifleştirir ve sitoplazmik proteinler

kesilir; ayrıca nükleer DNA fragmantasyonları oluşur. Ayrıca kaspaz 8 Bid'i aktive ederek indirekt olarak mitokondriye de sinyal gönderir. Bid mitokondriye transloke olur ve Bax ve Bak'ı aktive ederek sitokrom c salınımına neden olur[27-29].



Şekil 3: Kaspaz aktivasyonunun intrinsik ve ekstrinsik yolakları[173].

Birçok hücre tipinde sitokrom c bağımlı apoptozis sonucu aktive olan kaspaz 9, intrinsik apoptozis yolağında kaspaz 3 aktivasyonunun gerçekleşmesi için birincil yoldur. İntrinsik yolakta mitokondri ölüm sinyallerini iletmede ve yükseltgemede önemli role sahiptir. Apoptotik uyarım ile intrinsik yolağın aktivasyonu tam çözülememiştir. Ama Bcl-2 ailesinden Bid, Bad, Bim, Nix gibi proteinlerin, kaspazları aktive ettiği bilinmektedir. Proapoptotik etkili Bax ve Bak mitokondriden sitokrom c salınımını ayrıca Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 salımını sağlarlar. Bu durum Bcl-2 ailesinden anti-apoptotik etkili olan Bcl-2 ve Bcl-X_L tarafından antagonize edilir. Mitokondiriden sitokrom c salımından sonra, sitokrom c APAF-1'e bağlanır ve onu aktive eder, sonra ATP'nin bu yapıya katılmasıyla apoptozom adı verilen kompleks bir yapı oluşur. Bu yapı inaktif olan pro-kaspaz 9'u aktif kaspaz 9'a dönüştürür. Kaspaz 9 da kaspaz 3'ü aktive eder. Bu yolak, Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 ile inhibe edilebilen kaspaz inhibitörü (IAP) ile antagonize edilebilir. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü inaktifleştirir. Böylece kaspazla aktifleşen deoksiriboniüklez inhibitörü serbestleşir ve apoptozisin göstergesi olan kromatin kondensasyonu ve DNA fragmantasyonu oluşur.

2.2. Na^+/K^+ ATPaz ve Fonksiyonları

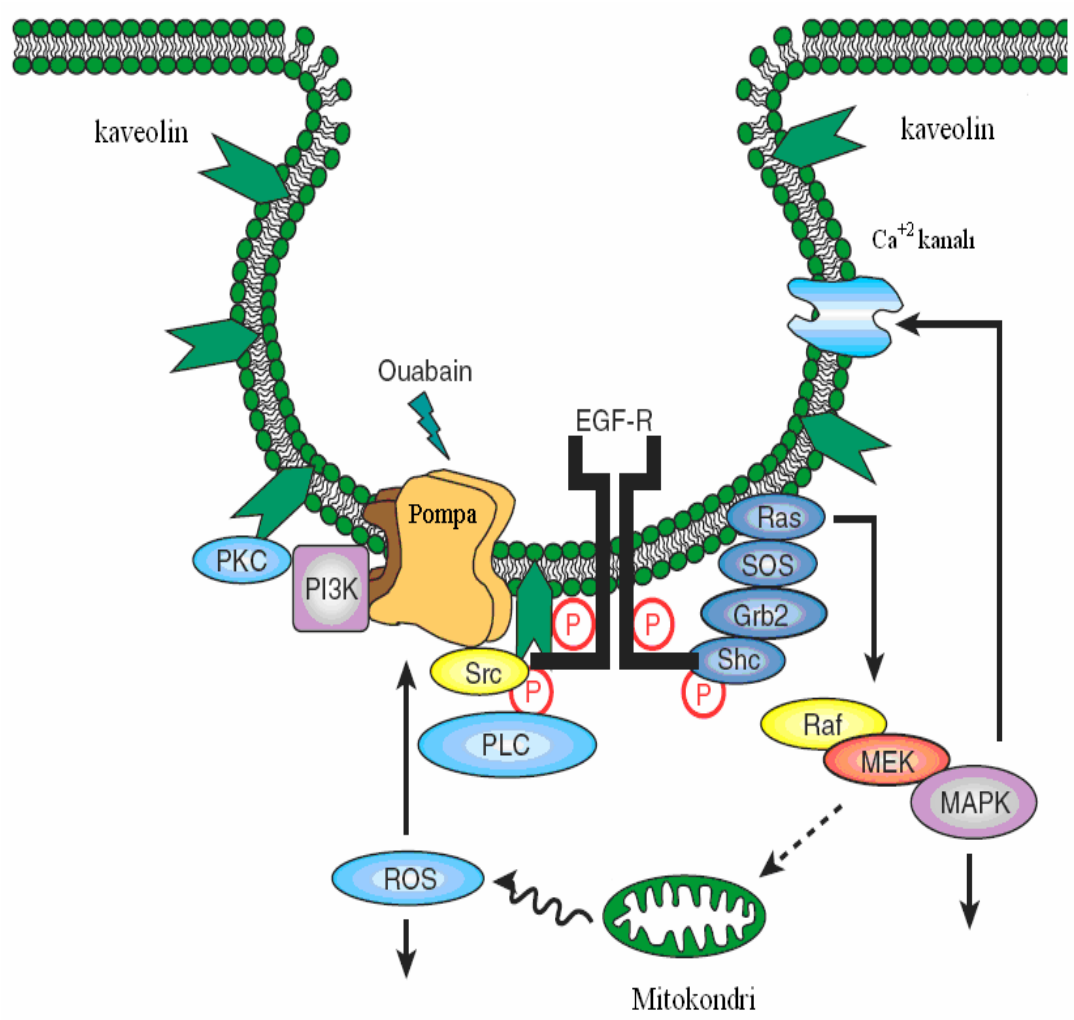
P tipi ATPaz ailesinden olan NA^+/K^+ ATPaz veya Na^+ pompası ilk defa 1957'de Skou tarafından tanımlanmıştır[30]. Na^+ pompası tüm memelilerde bulunan, elektrolit ve sıvı dengesini sağlayan bir proteindir. Pompa, ATP hidrolizinden elde ettiği enerji ile her üç sodyum iyonunu hücre dışına pompalarken, iki potasyum iyonunu da hücre içine pompalamaktadır. Proteinin hücrenin içine doğru çıkıntı oluşturan tarafında sodyum iyonlarının bağlanması için üç reseptör bölge bulunur. Dış tarafında ise potasyum

iyonları için iki reseptör bölge vardır. Taşıyıcı proteinin iç tarafına üç sodyum bağlandığı zaman proteinin ATPaz fonksiyonu aktifleşir. Bu enzim yüksek enerji taşıyan ATP'yi parçalar ve onu ADP'ye dönüştürür. Enerjinin açığa çıkması ile taşıyıcı protein molekülünde konformasyonel değişiklik oluşur ve sodyum iyonlarının hücre dışına çıkması, potasyum iyonlarının hücre içine girmesiyle pompalama olayı gerçekleşir.

Enzim α, β ve FXYD olmak üzere üç alt üniteden oluşur[31]. α alt ünitesi enzimin katalitik alt üniti, β alt üniti de enzimin regülatör alt ünitidir[32,33]. α alt ünitesi ~113 kDa ve β alt uniti 55 kDa molekül ağırlığına sahiptir[34,35]. İnsanda α alt ünitin dört (α_1, α_2, α_3 ve α_4), β alt ünitin üç (β_1, β_2 ve β_3) ve FXYD'nin ise 7 izoformu (FXYD1, FXYD2, FXYD3, FXYD4, FXYD5, FXYD6, FXYD7) bulunmuştur[36,37]. α_1 izoformu birçok dokuda bulunurken, α_2 izoformu beyin, kalp, damar sistemi ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. α_3 izoformu nöronal dokularda ve vasküler düz kas hücrelerinde ayrıca bazı hayvanlarda kalpte de bulunmaktadır. α_4 izoformuna ise testislerde ve olgun spermlerde rastlanılmıştır[38]. β1 ve β2 alt üniteleri memeli hücrelerinde predominantken, β_3 izoformu sadece Xenopus'larda bulunmaktadır[39].

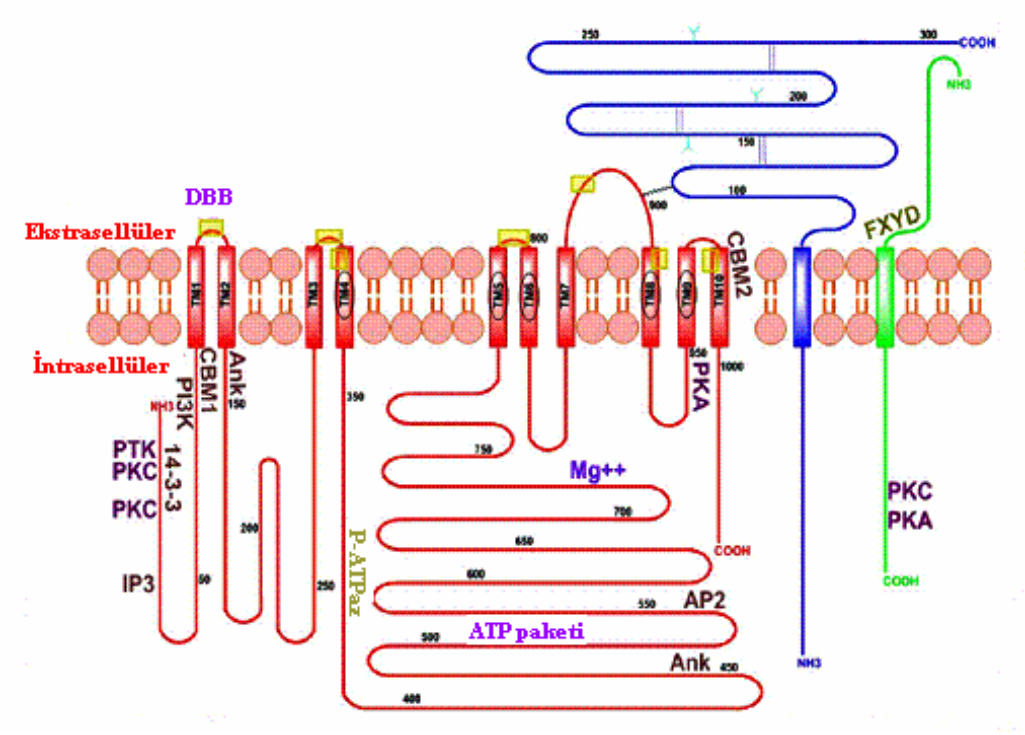
α alt ünitesi enzimin taşıyıcı ve katalitik özelliklerinden sorumlu olup ATP ve kardiyak glikozidlerin bağlanma bölgesine sahiptir[36,40,41,42]. β alt ünitesi enzimin, potasyum ve sodyum afinitesine karşı modülasyonu ve α polipeptidin plasma membranına geçişini kolaylaştırmak için α polipeptidin stabilizasyonundan sorumludur[36,43,44]. Üçüncü komponent ise farklı hücrelerin spesifik ihtiyaçları için Na+, K+ aktif transportunun kinetik özelliklerini düzenleyerek Na+, K+-ATPaz fonksiyonunu modüle eder [37,45].

Özellikle Xie ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda iyon pompalamanın yanısıra Na^+/K^+ ATPaz'ın hücre içi kompartmanlara sinyal ileten çeşitli protein kompleksi içinde de görev aldığı bilinmektedir (Şekil 4). Na^+/K^+ ATPaz'ın bu fonksiyonunun α alt ünitesinde bulunan spesifik bağlanma bölgelerinden kaynaklandığı bilinmektedir[46]. Na^+/K^+ ATPaz ve proteinlerin etkileşimi Na^+/K^+ ATPaz aracılı sinyal iletiminde önemli bir role sahiptir[47,48]. Yapılan analizler insan Na^+/K^+ ATPaz α_1 alt ünitesinin iki potansiyel protein bağlanma bölgesinin olduğunu göstermiştir. N-terminaldeki protein bağlanma bölgesinin gelişimi uvabain bağlanma yerlerine uygun olduğundan dolayı, uvabainin bu bölgeye bağlanması, uvabainin enzimin ATPaz aktivitesini regüle etmek dışında etkilerinin olduğunu da göstermiştir. Yani bu bağlanma bölgesinin gelişimi Na^+/K^+ ATPaz'ın ekstrasellüler uvabain sinyalini iletmesine neden olmuştur[49]. Uvabainin NA^+/K^+ ATPaz'a bağlanması Src kinaz/MAP kinaz ve PKC'nin aktivasyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca Src kinaz aktivasyonu reaktif oksijen türlerinin mitokondride üretimi artırmakta ve hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu da regüle etmektedir. Uvabainin indüklediği sinyal transdüklemesi enzimin iyon pompalama inhibisyonundan bağımsız gerçekleşmektedir[50] .



Şekil 4: Na^+/K^+ ATPaz sinyalleme mekanizmalarının şematik gösterimi[174].

Na^+ pompasının α alt ünitesinde birçok protein için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu proteinler: PI3K (posfo-inozitol-3 kinaz)[51], IP3 (inozitol 1,4,5-trifosfat)[52], 14-3-3 (14-3-3 protein)[53], Ankirin[54,55], Kaveolinler[50] ve AP2 (adaptör protein 2)[56] (Şekil 5). Enzimin bu proteinlerle etkileşmesi Na^+/K^+ ATPaz'ın iyon pompalaması dışında, enzimin sinyal iletici olmasını da etkilemektedir.

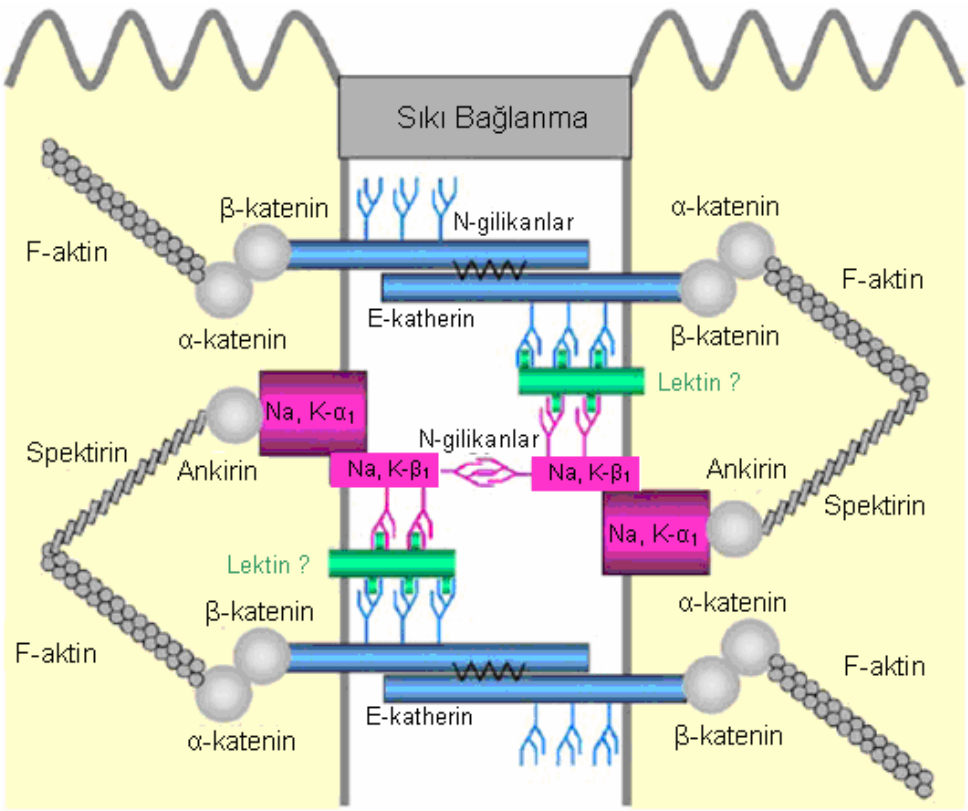


Şekil 5: Na^+/K^+ ATPaz alt ünitelerinin şematik gösterimi[175]. α_1 (kırmızı), β1 (mavi), FXYD1 (yeşil) izoformlarında major ligand bağlanan bölgeler gösterilmiştir.

Azalmış Na^+ pompa aktivasyonunun apoptozisi indüklediği de bilinmektedir. İyon dengesi, özellikle K^+ iyonu dengesindeki değişimler apoptozis regülasyonunda etkilidir[57-60] . Hücreler apoptozise girdiklerinde 100mM olan hücre içi K^+ düzeyleri 30-50 mM'a kadar düşmektedir[61-64]. Uvabain uygulanan hücrelerde de hücre içi K^+ miktarının %50-80'inin kaybedildiği gösterilmiştir[61-65].

Hücre kültüründe yapılan araştırmalar Na^+/K^+ ATPaz'ın inhibisyonu sonucu hücrelerin birbirinden ve substratından ayrıldığını

göstermiştir. Uvabainin pompayı inhibe etmesi, protein tirozin kinazların ve ekstrasellüler sinyal-regüle eden kinazların aktivasyonuna, fosforilasyonun derecesinde değişimlere, okludin ve E-katherin gibi adhezyon moleküllerinin degredasyonuna neden olarak hücre yapışmasını engellemektedir[66,67]. MDCK hücrelerinde yapılan bir başka çalışma da Na^+/K^+ ATPaz'ın ekstrasellüler β_1 alt ünitesinin hücre-hücre adhezyonu için gerekli bir basamak olduğunu göstermiştir[68] (Şekil 6).



Şekil 6: Hücrelerin birbirine yapıştığı noktalarda Na^+/K^+ ATPaz β_1 alt ünitesinin glikolizasyonunun pompa stabilizasyonundaki rolünü gösteren model[68].

2.3. Kardiyak Glikozidler

18. yy'da William Withering'in Digitalis Purpurea bitkisini konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanmaya başlamasından bu yana kardiyak glikozidler bilinmektir[69]. Dijitallerin etkisinin mekanizması, 1953'te Schatmann'ın kardiyak glikozidlerin sodyum pompasının spesifik inhibitörleri[70] ve plazma membranlarındaki NA^+/K^+ ATPaz'ın da dijital reseptörleri olduğunu bulmasından sonra ortaya çıkmıştır[30].

1960'ların sonunda memeli kardiyak kasında Na^+/Ca^{++} değiş tokuşçusunun bulunması ile kardiyotonik steoidler tarafından sodyum pompasının inhibisyonu sonucu hücre içi Ca^{++} konsantrasyonundaki artış açıklanmıştır[71]. Sonuç olarak kardiyak kasında pozitif inotropi oluşmaktadır. Kardiyak glikozidler digoksin ve uvabain gibi bitki kaynaklı, bufalin ve marinobufagenin gibi vertebra kaynaklıdır.

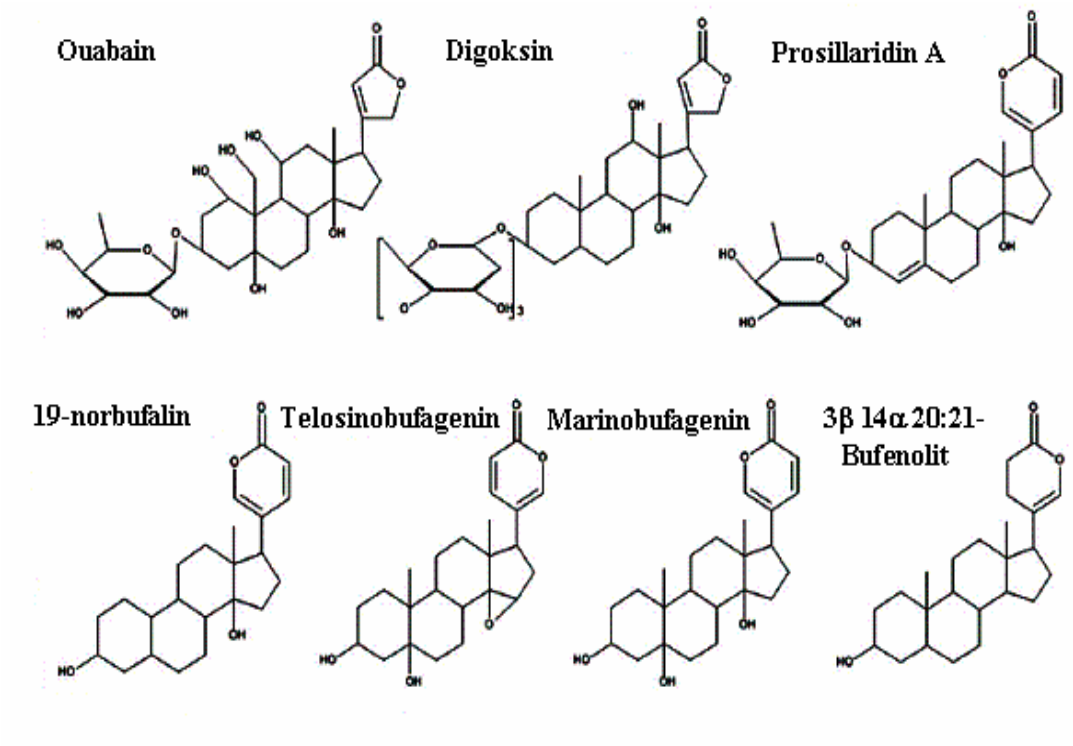
Kardiyomiyosit plazma membranlarında sodyum pompasının α_1 izoformu dağınık hâlde bulunmasına rağmen α_2, α_3 izoformları, membranın endoplazmik retikuluma yakın taraflarında bulunmaktadır. Bu plazmarezomlarda aynı zamanda Na^+/Ca^{++} değiştokuşçusu da yer almaktadır. Na^+ pompasının α_2 ve α_3 izoformunun inhibisyonu sitozolik Na^+ konsantrasyonunda ve dolaylı yoldan da Ca^{++} konsantrasyonunda değişikliğe neden olur. Bu durum Ca^{++} sinyalleme ve endoplazmik retikulumun Ca^{++} içeriğinin modülasyonunu etkiler. Sonuç olarak glikozidlerin pozitif inotropik etkileri ortaya çıkar [72].

2.3.1. Endojen Kardiyak Glikozidler ve Endojen Uvabain

1953 yılında memelilerde endojen glikozid regülatörlerinden bahsedilmiştir[73]. Aynı yıllarda glikozidlerin NKA'ya yüksek afinite ile bağlandığı ve enzimi inhibe ettiği bulunmuştur[70]. Daha sonra yapılan çalışmalar bilinmeyen natriüretik hormonların kan basıncı, plazma tuz konsantrasyonu regülasyonunda etkili olabileceği üzerine gerçekleşmiştir[74]. Bu araştırmalar normal ve patofizyolojik durumlarda NKA regülasyonunda endojen faktörlerin rolü olabileceğini göstermiştir. Memeli kanında NKA bağlanan ve onu inhibe eden uvabaine benzer dijital benzeri bileşiklerin (DBB) varlığı ilk kez 1991'de Hamlyn ve ark.'ları tarafından gösterilmiştir[75-77] . İlk tanımlanan bileşik uvabainin streoidal izomeridir[78]. Endojen uvabainin hormonal stimülasyon sonucu adrenal kortexde sentezlendiği bilinmektedir[79]. Esansiyel hipertansiyonda endojen uvabain plazma seviyesi %30-%45 civarında arttığından[80], kardiyovasküler sistemde NKA inhibisyonunun hipertansiyona neden olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca hem sığır hem de insan plazmasında glikozidlerin taşınmasında görevli spesifik glilozid bağlayan bir protein de tanımlanmıştır[81,82].

Uvabainin düşük dozda (1-100 nM) NKA'nın α_2 alt ünitesini, yüksek dozda (≥ 1 µM) α_1 alt ünitesini inhibe ettiği bilinmektedir[83].

Daha sonra insan plazmasında digoksin, insan katarakt lenslerinde 19 nor bufalin84, insan plasentasında 3β-hidroksi 14α 20:21-bufenolit72, insan plasentasında Proscillaridin A85, akut mikokard infarktüsünden sonra insan idrarında marinobufagenin86 ve son olarak böbrek yetmezliği olan hastaların plazmasında telocinobufagin87 tanımlanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7: İnsan dokularında tanımlanan dijital benzeri bileşiklerin yapısı[175].

Dijital benzeri bileşiklerin kan basıncı regülasyonu, kalp kontraktilitesi ve ritim regülasyonu, hücre büyümesi, farklılaşması ve adhezyonu gibi sistemik etkileri ve NA^+/K^+ ATPaz'ın inhibisyonu, NA^+/K^+ ATPaz endositozunun sitümülasyonu, hücre içi sinyalleme yolaklarının sitümülasyonu, sitoplazmik Ca^{++} osilasyonunun aktivasyonu gibi moleküler etkileri vardır.

Özellikle uvabainin NA^+/K^+ ATPaz'a bağlanması Src kinaz/MAP kinaz ve PKC'nin aktivasyonlarına neden olmaktadır. Uvabainin indüklediği

sinyal transdüklemesi enzimin iyon pompalama inhibisyonundan bağımsız gerçekleşmektedir[50].

Uvabainin kaspaz aktivasyonu ile oluşan apoptotik etkisinin yanısıra kaspaz bağımsız olarak gelişen nekrotik toksisitesi bulunmaktadır.

Vasküler düz kas hücrelerinde serum yokluğu, starosporin ve okadoik asitle oluşturulan apoptozis sonucu 1-2 saat önce uvabain uygulamasının kaspaz-3 aktivasyonunu ve DNA fragmantasyonunu engellediği görülmüştür[88]. Bu inhibisyonun oubainin ön koşullama etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Orlov ve ark. PAEC'te uvabainin Na+/K+-ATPaz ile etkileşimi sonucu hücrelerin [Na+]i/[K+]i-bağımsız mekanizma ile nekroza gittiğini, K+'suz besiyerinde ise bu inhibisyonun $[Na+]_i$ arttırması aracılığıyla apoptozise karşı koruyucu bir etki gösterdiğini vurgulamışlardır[4].

Diğer bir deneysel çalışmada Orlov ve ark. uvabainin neden olabileceği hücre ölümünün Src kinaz/MAP kinaz ve PKC'nin aktivasyonlarına bağlı olup olmadığını araştırmışlardır. C7-MDCK hücrelerine 3µM 24 saat uvabain uygulaması ile hücrelerin yaklaşık %80'inin substratumdan ayrıldığını göstermişlerdir[5]. Ras sinyalleme inhibitörlerinin, PI3K (wortmannin), MAPK ERK1/2 kinase (PD98059), tyrosine kinases (genistein) ve aktivatörlerinin (4-PMA, 8-Br-cAMP, 8-Br-cGMP, forskolin) hücre ölümüne etkilerinin olmadığını vurgulamışlardır[5].

Son olarak Orlov ve ark. C7-MDCK 6 saat 3µM uvabain uygulamansının NKA'nın yaklaşık %50'sinin internalizasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir[6]. K^+'suz besiyerinde ise uvabainin indüklediği NKA'nın internalizasyonunun inhibe edildiğini ama 18 saatte görülen sitotoksik etkisini etkilemediğini belirtmişlerdir[6].

Kobaylarda yapılan bir çalışmada uvabain ve digoksinin letal dozunun %50-60'ının apoptozisin göstergesi olan mitokondriden sitokrom c salınımını, prokaspaz 9 ve prokaspaz 3 aktivasyonunu, periferal nükleer kromatin kondensasyonunu ve DNA fragmantasyonunu indüklediğini göstermiştir[89].

Düşük dozda uvabainin böbrek hücrelerinde NF-kB'yi aktive ederek serum yoksunluğu sonucu indüklenen apoptozisi önlediği görülmüştür[90].

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine 10 nM uvabain uygulaması hücre sayısını % 20, 4gün 1 µM uvabain uygulaması ise hücre sayısını %75 azaltmıştır[7].

Sitoplazmik Ca^{++} değişimleri intrasellüler sinyalizasyonu, enzimlerin aktive olmasını, protein etkileşimlerini etkilemektedir. Oubainin de nM konsantrasyonlarda Ca^{++} osilasyonunu indüklemektedir[91]. Ayrıca oubainin neden olduğu Ca^{++} osilasyonu kalsiyum bağımlı NF-kB'yi de aktive etmektedir.

Ren YP ve ark.'ı HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücreleri) kültüründe yaptıkları çalışmada uvabainin fizyolojik konsantrasyonlarda (0.3-0.9 nmol/L) hücre proliferasyonuna neden olduğunu, buna karşılık patolojik konsantrasyonlarda (0.9-1.8 nmol/L) hücre ölümünü indüklediğini göstermişlerdir[8]. Uvabainin gen ekspresyonu üzerine etkilerini incelediklerinde de hücre proliferasyonu ve farklılaşması ile ilgili olan protein kinaz (NM_002737) ve protein fosfotaz (NM_014225) gen ekspresyonlarında artış olduğunu belirlemişlerdir [8].

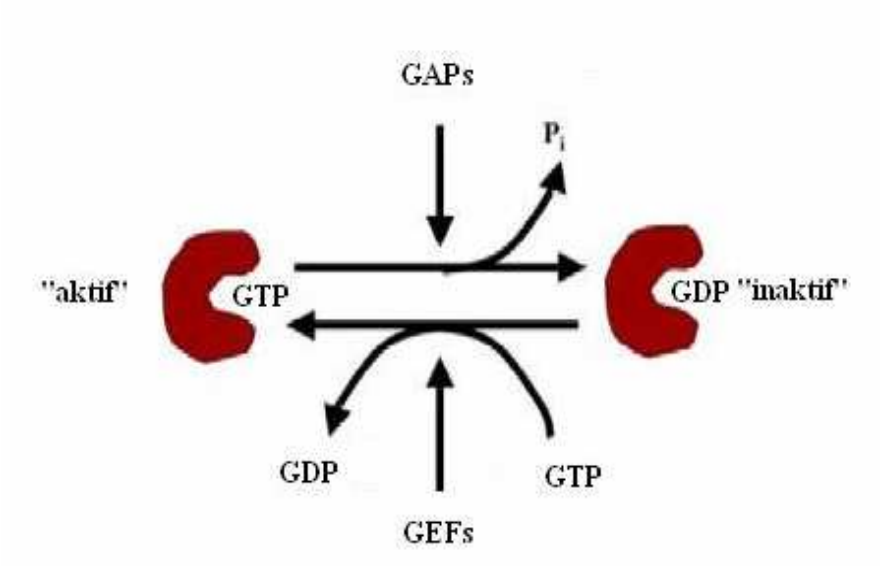
Diğer yandan Trevisi ve ark.'ı HUVEC'te yaptıkları çalışmada 100nM uvabainin antiopoptotik etkili olduğunu, bu etkinin de PI-3K ve ERK aktivasyonu ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır[3]. Elde ettikleri bulgular kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptozisle sonuçlanan büyüme faktörü ve serum yoksunluğunda, uvabainin HUVEC üzerinde antiapoptotik ajan olarak görev aldığını göstermiştir[92-94].

Dijital benzeri bileşikler PI3K[51], Src[95-97], Akt[98] ve ERK[99] gibi kinazları up-regüle ederler. Bu kinazlardan bazıları paralel sinyal transdükleme yolaklarını aktive ederler[100]. Bu yolaklar NF-κB[90] ve AP-1[101,102] gibi hücresel ve fizyolojik mekanizmalarda rolü olan transkripsiyon faktörlerini aktive ederler.

2.4. Küçük G Proteinleri ve Rho/Rho Kinaz Yolağı

2.4.1. Küçük G Proteinleri

Moleküler biyolojide yapılan son çalışmalar küçük GTP-bağlı proteinlerinin (G proteinleri) hücre içi sinyalleme yolaklarında önemli role sahip olduğunu göstermiştir. G proteinleri (20-35 kDa) hücre farklılaşması, bölünmesi, hücre iskeletinin kontrolü gibi çeşitli hücresel olaylarda görev alır. Tüm G proteinleri aktif GTP-bağlı form ile inaktif GDP-bağlı formda bulunur. GEFs (guanin-nükleotid-değiştirici faktörler) ve GAPs (GTPaz aktive eden proteinler) proteinleri bu döngüyü regüle ederler. GEFs GDP'yi GTP'ye değiştirerek aktif formu, GAPS ise yavaş intrinsik GTPaz aktiviteyi stimüle ederek inaktif formu düzenler (Şekil 8).



Şekil 8: G proteinlerinin aktif ve inaktif formları arasındaki döngü[176].

G proteinleri Rho, Ras, Rab, Sarl/Arf ve Ran ailelerinden oluşur[103]. Ras ailesinin Rap, Ral ve Reb, Rho ailesinin Rho (A'dan E'ye ve G izoformları), Rac (1'den 3'e izoformları), Cdc42 ve TC10 olmak üzere üyeleri belirlenmiştir[103]. Rab, Ran ve Arf proteinleri veziküler ve nükleo-sitoplazmik taşımadan, Ras ve Rho proteinleri ise ekstrasellüler uyaran gibi çeşitli sinyalleme ağında rol alırlar[104].

2.4.2. Rho/Rho Kinaz Yolağı

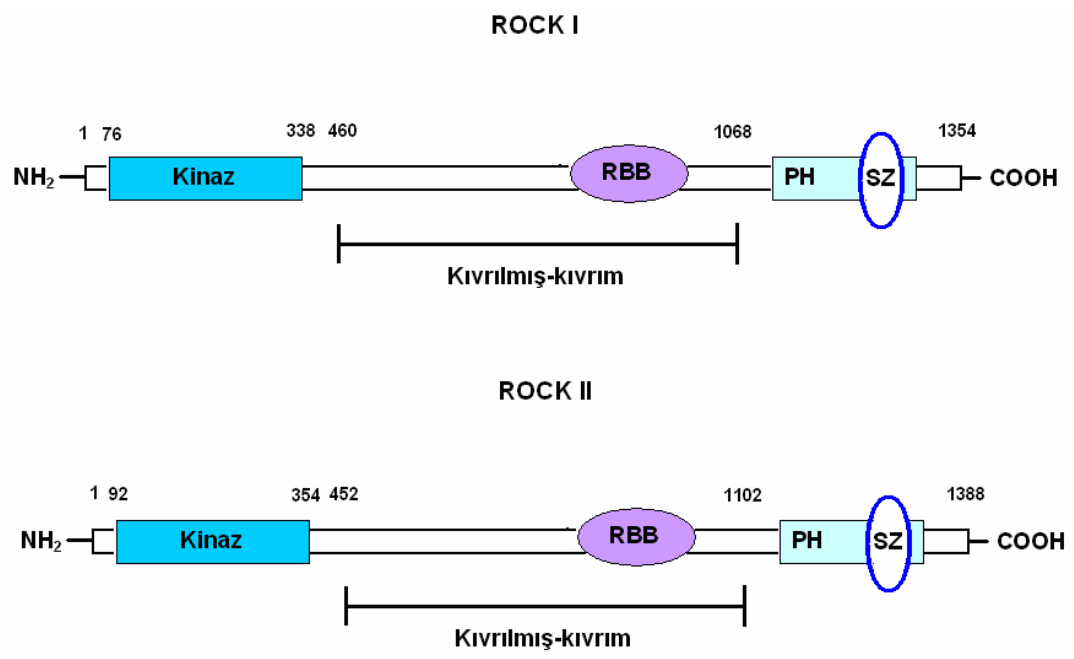
Rho hücrede GTP-bağlı aktif form ile GDP-bağlı inaktif formda bulunur. Rho A, Rho B ve Rho C (toplam Rho olarak bilinir) aynı aminoasit sekanslarına sahip olduğundan bunların hücre içi hedefleri de benzerdir[103]. Rho proteinleri gen ekpresyonunu ve aktin hücre iskeletini kontrol eden sinyalleme yolaklarında etkilidir[105]. Rho bağımlı yolaklar, Rho inhibitörü olan ve clostridium botulinum'dan elde edilen C_3 transferaz toksini kullanılarak incelenmiştir.

Rho kinazlar (ROCK'lar) Rho'nun ilk effektörleri olarak keşfedilmiştir. ROCK, ROCK I ve ROCK II olmak üzere iki izoforma sahiptir. 1990'ların ortasında ilk olarak Rho kinaz α[11]/ ROK α[12]/ROCK II[13] izole edilmiştir. ROCK'un diğer izoformu ise Rho kinaz β[11]/ ROK β[12]/ ROCK I[13] olarak tanımlanmıştır.

2.4.2.1. Rho Kinazların Yapısı

ROCK, 160kDa molekül ağırlığına sahip, serin/treonin protein kinaz aktiviteli Rho-bağlanan protein olarak tanımlanmıştır. Rho kinaz N-

terminal bölgesinde bulunan katalitik (kinaz) bölge, orta bölümde bulunan kıvrılmış-kıvrım (coiled-coil) bölge ve C-terminal bölgesinde bulunan, sisteince zengin (SZ) bölgeden oluşan plekstrin-homoloğu bölge olmak üzere 3 ana bölgeden oluşur (Şekil 9). Rho kinazın Rho-bağlanan bölgesi (RBB) kıvrılmış-kıvrım bölgenin C terminalinde lokalize olmuştur ve GTP-bağlı Rho'nun bu bölgeye bağlanması ile Rho kinazın aktivitesi artmaktadır.



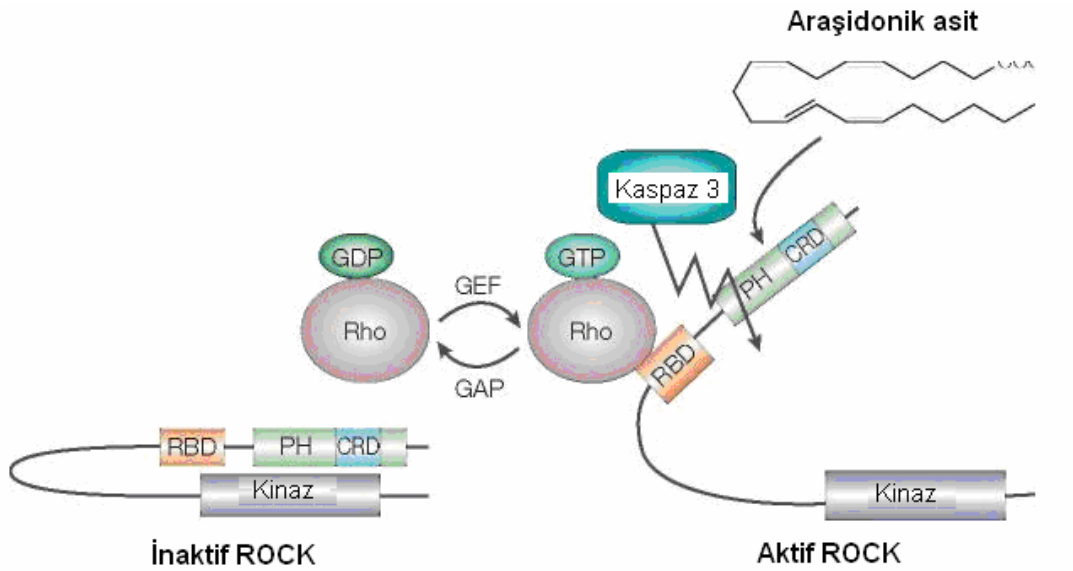
Şekil 9: ROCK I ve ROCK II'nin moleküler yapısı

Rho-kinazın her iki izoformu kinaz bölgesinden %92, tüm amino asit diziliminden %65 benzerlik göstermektedir[106-108].

2.4.2.2. ROCK Aktivitesinin Düzenlenmesi

ROCK oto-inhibitör etkiye sahiptir[109]. İnaktif formda ROCK'un C-terminal PH bölgesi ve RB bölgesi, kinaz bölgesi ile etkileşim içindedir. Enzim bu etkileşimle oto inhibitör halka olarak şekillenir. Kinaz bölgesi yaklaşık 300 aa uzunluğunda ve serin/treonin protein kinaz aktivitesine sahiptir[110].

ROCK aktivitesi çeşitli mekanizmalarla regüle olur. Enzimin kinaz aktivitesi Rho bağlanmasından sonra artar[106,107,111]. Kıvrılmış-kıvrım bölgesinde lokalize olan RBB yaklaşık 80 aa uzunluğunda olup, Rho A, Rho B, Rho C gibi yalnızca aktif durumdaki Rho GTPaz'larla etkileşim içindedir[112]. RBB ve GTP bağlı Rho'nun etkileşimi, ROCK'un inhibitör karboksi terminal bölgesi ile katalitik bölgesi arasındaki etkileşimi bozar. Rho iki farklı bölgeden enzim ile etkileşmektedir (Rho A'nın 23-40 ve 75-119 aa sekanslarından)[113]. Rho/ROCK yolağı ekstraselluler uyarana bağlı olarak aktive olur. Rho bağımlı ROCK aktivasyonu hücre tipine bağlı olarak kontraktilitede, hücre permeabilitesinde, migrasyonda ve proliferasyonda değişikliğe ve apoptozise neden olabilir.



Şekil 10: ROCK aktivitesinin regülasyonu[177].

Araşidonik asit (AA)[114] ve sifingosilfosforilkolin (SPC)[115] gibi lipit mediyatörleride PH bölgesi ile etkileşerek ROCK'ları Rho'dan bağımsız olarak aktive edebilir. Hücresel düzeyde AA veya SPC/ROCK yolaklarının aktivasyonu düz kas hücrelerinde Ca^{+2} duyarlılığını arttırmaktadır[115,116]. $PI3,4,5P_3$ ve $PI4,5P_2$ gibi inozitol fosfolipidler de enzimin PH bölgesi ile etkileşerek ROCK II'yi aktive etmektedir[117].

ROCK, inhibitör karboksi terminal bölgesinin proteolitik olarak ayrılması ile de aktive edilebilir. Apoptozis süresince kaspaz 3 ROCK I'i DETD1113 bölgesinden parçalayarak aktive eder[15,16]. Diğer yandan sitotoksik lenfosit granülün indüklediği hücre ölümü boyunca proapoptotik enzim olan granzim B insan Rock II'sini IGLD1131'den parçalayarak aktif hâle getirir[17]. Ayrıca endotel hücrelerinde insan ROCK II'si trombine cevap olarak kaspaz 2 aracılı parçalanma ile aktif hâle gelebilir[118]. Fakat parçalanma bölgesi aydınlatılamamıştır.

Enzimin N-terminal bölgesi diğer substratlarla (Örneğin Rho E) etkileşimde ve enzimin kinaz aktivitesinde önemlidir.

Pozitif regülatörlerinin yanı sıra, ROCK'un negatif regülatörleri de tanımlanmıştır.

Yapılan araştırmalar diğer küçük GTP bağlı proteinlerin ROCK'ların negatif regülatörü olarak fonksiyon gördüğünü kanıtlamıştır. Gem ve Rad ROCK'a bağlanıp enzimi inaktive etmektedir[119]. Gem, ROCK I aracılı MLC ve MLC fosfatazın fosforilasyonunu inhibe etmektedir; buna karşın Rad ROCK II'nin indüklediği cevapları inhibe etmektedir[119]. Diğer küçük G proteini olan Rho E ise ROCK I inhibitörü olarak tanımlanmıştır[120]. Rho E, ROCK I'in N-terminal bölgesine bağlanarak, fiziksel olarak kinaz aktiviteyi inhibe etmektedir. Gem ve Rad hücra iskeletine bağlı olarak bulunurken[121,122]. Rho E golgi ile ilişkilidir[120]. Y27632 ve fasudil gibi ROCK inhibitörleri enzimin kinaz bölgesine bağlanır ve ROCK I ile ROCK II'yi benzer potenslikte inhibe ederler[123-125].

Kaspaz 3/ROCK yolağı çeşitli hücre tiplerinde, apoptotik uyarana bağlı olmaksızın membran tomurcuk oluşumunda önemli role sahiptir[15,16]. Rho/ROCK[126,127], granzim B/ROCK II[17] veya kaspaz 2/ROCK II[118] gibi ROCK aktivasyonu ile gerçekleşen apoptozis çoğunlukla hücre tipine ve/veya apoptotik uyarana bağlıdır.

2.4.2.3. ROCK Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

Hem ROCK I hem de ROCK II insan, sıçan ve fare dokularında ekprese olmaktadır[106,108,111,128]. ROCK II beyin ve kas dokusunda fazla eksprese olurken, Rock I böbrek, karaciğer ve testislerde eksprese olmaktadır. Hem ROCK I hem ROCK II vasküler düz kasta ve kalpte eksprese olmaktadır. Erken fare embriyolarında gelişen kalpte ROCK I kuvvetli eksprese olurken, ROCK II her yerde dağılmış şekilde bulunur[129]. ROCK I ve ROCK II dinlenme periyodunda sitozolde bulunurken Rho aktivasyonu ile membrana transloke olur[107]. ROCK II hücre bölünmesi sırasında cleavege furrowslarda[130], stress liflerinde[131] ve vimentin aracılı filament ağının oluşumunda lokalize olurken, ROCK I'in sentrozomlarla ko-lokalize olduğu gösterilmiştir[132].

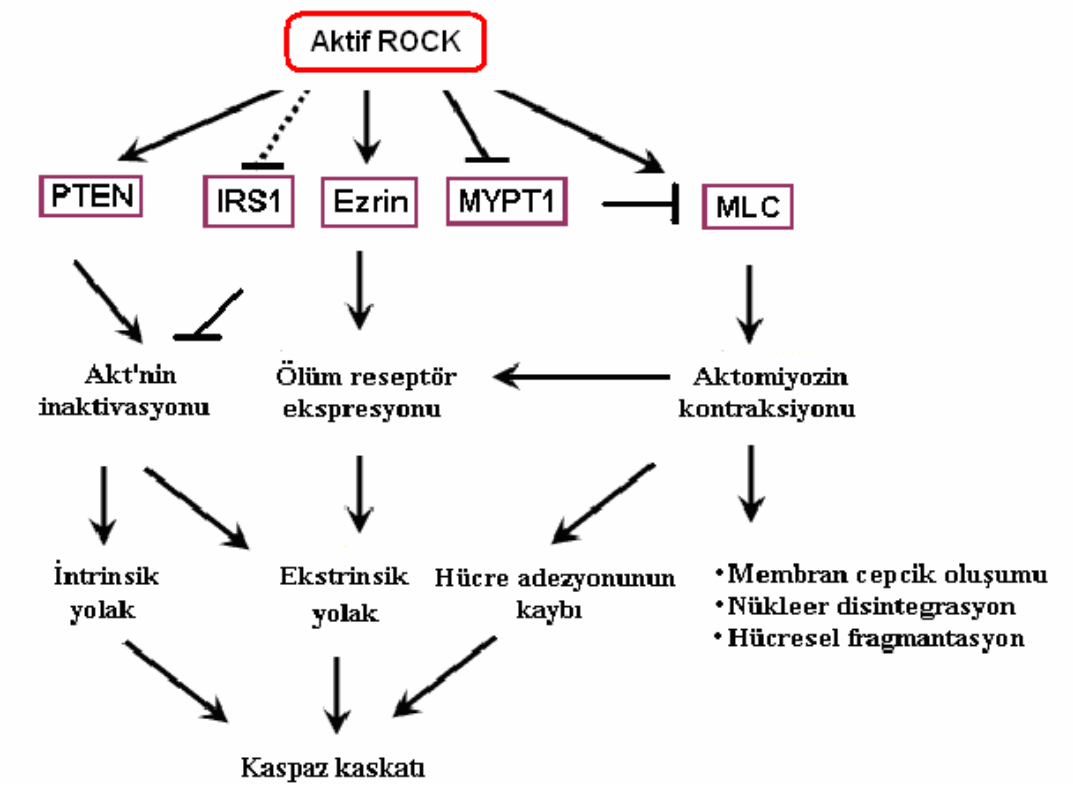
2.4.2.4. ROCK'un Substratları

Hem ROCK I hem ROCK II serin veya treonin rezidülerinden çeşitli proteinleri fosforiller. ROCK'lar substratlarını R/KXS/T veya R/KXXS/T amino asit sekanlarından fosforile eder[133,134] (R: arjinin , K: lizin, S: serin, T: treonin, X: herhangi bir amino asit). ROCK'lar otofosforile olup[106] kendi fonksiyonlarını modüle edebilir. 20'den fazla ROCK substratı tanımlanmıştır[135-137].

Birçok substrat için ROCK'un sadece bir izoformu (genelde Rock II) test edilmiştir. Ama katalitik bölgelerinden %92 benzerlik gösteren ROCK I ve ROCK II'nin farklı substratları fozforillediğine dair kanıt yoktur. Buna karşı sadece ROCK I, Rho E'ye bağlanıp onu fosforile etmektedir[131].

ROCK'un ilk belirlenen hedefleri miyozin hafif zincir (MLC)[138,139] ve miyozin hafif zincir fosfatazın miyozin bağlı alt uniti (MYPT1)'dir[138,10,141]. ROCK doğrudan MLC üzerinden ya da dolaylı olarak MLC fosfatazı inaktive ederek MLC fosforilasyonunu artırabilir. Artmış MLC fosforilasyonu aktomiyozin kontraktilitesinde de stimülasyona neden olur[111,142,143]. ROCK II Ca^{++} bağımsız olarak MLC'yi in vitro[138] ve in vivo[144] fosforile eder. Bu fosforilasyon MLC'yi MLC kinazın MLC'yi fosforillediği rezidüden gerçekleşmektedir (serin 19)[138].

MLC ve MYPT1 dışında aktin hücre iskeleti regülasyonunda etkili ROCK substratları da vardır. Bunlar CPI-17 (Shi 2006-63), kalponin[145], LIM kinazlar[146], ezrin/radiksin/moesin (ERM)[147], adusin[148], sodyum-hidrojen değiş tokuşçusu (NHE1)[149] ve ZIP kinaz[150]'dır.



Şekil 11: Apoptotik sinyallemelerde potansiyel ROCK hedefleri[173].

Birçok Rock substratı hücre ölüm ve yaşayabilirliği ile ilişkilidir.

Apoptotik hücrelerde artmış MLC fosforilasyonu ve aktomiyozin kontraktilitesi plazma membran tomurcuk oluşumunu regüle eder[151]. Farklı hücre tiplerinde kaspaz 3 aracılı ROCK I aktivasyonu, MLC fosforilasyonundaki artıştan sorumludur[15,16]. Fosfotaz ve tensin-homolog (PTEN) yeni tanımlanan ROCK substratıdır[152]. ROCK tarafından fosforillenen PTEN'in fosfataz aktivitesi artmaktadır. PTEN proteinleri ve fosfoinositleri defosforile eder. Ayrıca hücre yaşayabilirliğini de içeren çeşitli biyolojik olaylarda önemli rollere sahip olan fosfatidil inozitol (PI) 3-kinaz/Akt yolağının da negatif regülatörüdür [153].

HEK hücrelerinde ROCK aktivasyonu ile indüklenen PTEN Akt fosforilasyonunun redüksiyonuna aracılık eder[152,154]. Redüklenen PTEN aktivitesi endotel hücrelerinde[155] ve kardiyomiyositlerde[154] ROCK inhibisyonunun koruyucu etkisine aracılık edebilir.

Düz kas hücrelerinde ROCK'un insülin reseptör substrat 1 (IRS1) sinyallemesini ve PI3- kinaz aktivasyonunu negatif olarak regüle ettiği gösterilmiştir[156]. Buna zıt olarak ROCK adipositlerde, kas hücre kültürlerinde ve izole soleus kasında ROCK'un IRS1'i fosforillediği ve PI3- kinaz aktivasyonunun buna bağlı olarak arttığı gösterilmiştir[157]. ROCK PI3-kinaz/Akt yolağının hem pozitif hem de negatif regülatörüdür.

Son olarak Raf 1 bulunmayan embriyonik fibroblastlarda ROCK II aktivasyonunun ezrin fosforilasyonunun artması ile apoptozisi indüklediği bulunmuştur[158].

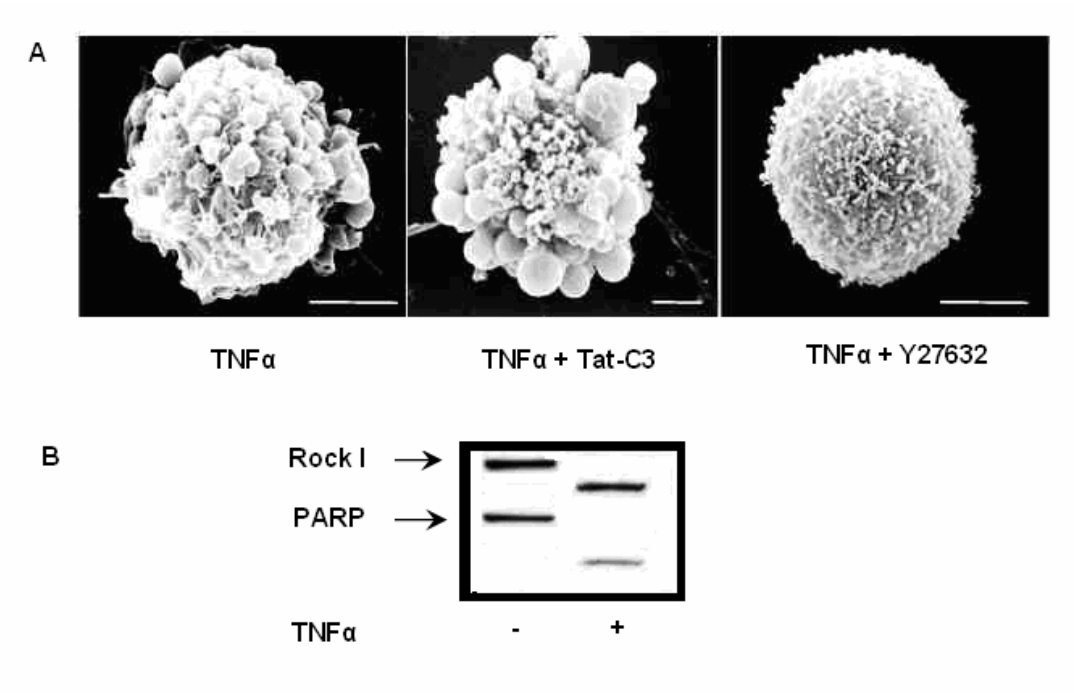
2.4.2.5. Morfolojik Apoptotik Olayların Düzenlenmesinde ROCK'un Rolü

ROCK hücre kasılması, membran tomurcuk oluşumu (blebbing), nükleer disintegrasyon ve apoptotik hücrelerin apoptotik cisimciklere fragmantasyonu gibi apoptozis de meydana gelen morfolojik olaylarda etkilidir.

2.4.2.5.1. Membran Tomurcuk Oluşumu

Apoptozis; salım, membran tomurcuk oluşumu ve kondensasyon olmak üzere üç bölümden oluşur. Salım bölümünde ölen

hücre ekstrasellüler matriksle bağlantısını kaybeder; tek başına yuvarlak bir hâl almaya bundan sonra membranda tomurcuklar oluşmaya başlar. Membran tomurcuk oluşumundan sonra kondensasyon bölümünde hücreler ya tek bir apoptotik cisime kondense olurlar ya da birden çok apoptotik cisimciklere parçalanırlar. Plazma membran tomurcuklarının oluşumu MLC fosforilasyonu ve aktomiyozin kontraksiyonu ile regüle olur[151]. Membran tomurcuklarının ve apoptotik hücrelerin regülasyonunda kaspaz 3 aracılı ROCK I kesilmesi ve aktivasyonunun rölü ilk kez anti-Fas antikoru uygulanmış jurkat hücrelerinde ve TNFα-uygulanmış NIH3T3'te gösterilmiştir[15,16]. Kaspaz 3 aracılı ROCK I aktivasyonu, MLC fosforilasyonunu ve aktomyozin kontraktilitesini artırdığı için membran tomurcuk formasyonunda gerekli ve etkilidir[15,16]. Tomurcuk oluşumunda bu yolağın önemi daha sonra çeşitli hücre tiplerinde apoptotik uyarandan bağımsız olarak gösterilmiştir[159-164].



Şekil 12: Apoptozis süresinde ROCK bağımlı membran tomurcuk oluşumu (A) ve kaspaz aracılı Rock I kesilmesi (B)[15]. (PARP: bilinen kaspaz substratı)

Bazı apoptotik durumlarda Rho bağımlı ve kaspaz bağımsız ROCK aktivasyonu ile de membran tomurcuk oluşumu gerçekleşebilir [126,127]. Bu süreçte hem ROCK I hem de ROCK II etkili olabilir.

Bunun dışında sitotoksik lenfosit granüllerinin indüklediği apoptoziste sadece ROCK II granzim B aracılı kesilme ile aktif hâle gelebilir. Aktif hâle gelen ROCK II kazpas 3 aktivasyonundan bağımsız olarak membran tomurcuk oluşumunu indükleyebilir[17].

2.4.2.5.2. Apoptotik Hücrelerin Fragmantasyonu

Apoptozisde hücre kendini apoptotik cisimciklere paketler. Bu şekilde hücre içeriği dışarı salınamaz. Bu apoptotik cisimcikler komşu hücreler tarafından fagositozla uzaklaştırılır[165]. Apoptotik hücreler fagositoz için birçok değişime uğrar. Bunlar nükleer fragmantasyon, membran tomurcuklarının içine DNA parçalarının yeniden lokalizasyonu, hücre küçülmesi ve/veya apoptotik cisimciklere hücrenin fragmantasyonu şeklindedir. Ayrıca hücreler yüzeylerinde fagositik belirteçler eksprese ederler. ROCK aktivasyonu ve MLC fosforilasyonu DNA'nın fragmante olup tomurcuk ve apoptotik cisimcikler içine yerleşmesinde[15] olduğu kadar NIH3T3 hücrelerinde apoptotik nükleer disintegrasyonda da görevlidir[166]. ROCK aktivitesi ve aktomiyozin kontraksiyonu, apoptozisin ileri fazında bulunan hücrelerde endoplazmik retikulum formasyonuna ve kromatin içeren tomurcukların oluşumuna eşlik eder[160].

Y27632 ile elde edilen ROCK inhibisyonu ile apoptotik COS-7 ve PC12 hücrelerinde apoptotik hücrelerin fragmantasyonu önlenmiş ve golgi fragmantasyonu bloklanmıştır[167,168]. ROCK bağımlı bu olaylar aktomiyozin kontraksiyonu ile ilişkilidir[167,168].

COS-7 hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada, apoptoziste görülen apoptotik cisimciklere fragmantasyon ROCK inhibitörleri (Y-27632 or H-1152) uygulaması ile önlenmiştir[168]. Kaspazlardan tarafından ROCK I kesilip aktive olurken ROCK II aktive olmamıştır. Ölen hücrelerin fragmantasyonunu siRNA knock-down ROCK I inhibe ederken, siRNA knock-down ROCK II inhibe etmemiştir.

Bunun yanı sıra ROCK, aktomiyozin kontraksiyonundan bağımsız olarak fagositik belirteçlerin membran yüzeyinde ekspresyonunu kontrol etmektedir[167]. Y27632 varlığında apoptotik hücreler daha geç fagosite edildiğinden bu durum ROCK'un ölü hücrelerin fagositoz için hazırlanmasında önemli role sahip olduğunu göstermiştir[167].

Yalnız Y27632 varlığında ölen Jurkat hücreleri inhibitör yoksunluğunda ölen hücrelerle aynı etkinlikte makrofajlar tarafından fagosite edildiğinden[163], ölü hücrelerin fagositoz için hazırlanmasında ROCK'un öneminin hücre tipine ve/veya apoptotik uyarana göre değişmekte olduğunu göstermiştir.

Bu bulgular ROCK'un apoptotik hücrelerin fragmantasyonunda önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur.

2.4.2.5.3. Apoptotik Hücrelerin Fagositozu

Dokularda apoptotik hücrelerin yok oluşu makrofajların ve komşu hücrelerin bu hücreleri fagosite etmesiyle gerçekleşir.

Son çalışmalar apoptotik hücrelerin temizlenmesinde, aktin hücre iskeleti regülasyonu üzerinde rolü olan Rho ve ROCK'un etkili olduğunu göstermiştir[169,170].

Apoptotik hücrelerin yutulması sırasında Rho aktivitesinde azalma görülmüştür[170]. Rho aracılı sinyallemenin inhibisyonu da apoptotik

hücrelerin uptake'ini güçlendirdiği için Rho'nun, bazal fagositozisi negatif olarak etkilediği bilinmektedir. Yutulma üzerinde bu inhibitör etkinin birinci sorumlusu ROCK olarak gösterilmektedir[170]. Apoptotik hücrelerin yutulmasında Rho/ROCK'un negatif etkisi komplement reseptör ve Fc reseptör aracılı fagositozlarda farklılık göstermektedir.

Apoptotik hücrelerin fibroblastlardan ve makrofajlardan degredasyonu sırasında Rho/ROCK/ERM sinyalleme yolağı fagozomların olgunlaşmasına eşlik etmektedir[169].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Uvabain (Sigma)
Y27632 (Sigma)
Bisinkoninik asit (Sigma)
Bakır sülfat
Tris HCI (Merck)
Temed (Amresco)
% 30 Akrilamid/Bis (Bio-Rad)
Amonyum persülfat (Amresco)
Bromofenol mavisi (Sigma)
β-merkaptoetanol (Sigma)
Glisin (Merck)
Tween 20
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Bio-Rad)
Metanol (Merck)
Nitrosellüloz membran (Bio-Rad)
PVDF membran (Bio-Rad)
Yağsız süt tozu (Pınar)
Antikor ROCK 1 (BD)
Anti Mouse (Pierce)
Anti Rabbit (Pierce)
ECL (Amersham Biosciences)
X-Ray Film (Agfa)

Developer-Geliştirici (Kodak)
Fixer-Sabitleyici (Kodak)
PBS (Gibco)
Fetal Sığır Serum Gold (PAA)
Kollajenaz Type II (Gibco)
Jelatin (Sigma)
Medium199 Earles 10X (Gibco)
Glukoz (Sigma)
HEPES (Gibco)
$NaHCO_3$ (%7.5 w/v) (Merck)
Penisilin-Streptomisin (Gibco)
1 N NaOH
L-Glutamin 200mM (Sigma)
Paraformaldehit (Sigma)
Triton X-100 (Merck)
Rhodamine-Phalloidin (Sigma)
DAPI (Sigma)
Slow Fade Anti Kit (A) (Invitrogen)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Shimadzu)
Mikropipet (Eppendorf Research)
Vortex (Firlabo)
Bıçaklı Homojenizatör (IKA)
Supersonic Homojenizatör (SONICS)
Santrifüj (Nüve)
Su banyosu (Nüve)

Plak okuyucu (Platereader)

Çalkalayıcı (IKA)

Isıtıcı (FALC)

Elektroforez Tank (Bio Rad)

Elektroforez Tank (Invitrogen)

Tank Blot (Invitrogen)

Tank Blot (Bio Rad)

Laminar Akımlı Kabin

CO_2 Etüvü (Sanyo)

Faz Kontrast- Floresan Mikroskop (Leica)

Mikroskop Kamerası (Leica DFC 420C)

3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Homojenizasyon Çözeltisi

Tris-HCl	50 mM
NaCl	400 mM
EGTA	2 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Roche	0.5 tablet/100ml
NaF	1 mM

%8'lik SDS-Polyakrilamid Jel

dH_2O	2.3 ml
%30 Akrilamid	1.3 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	1.3 ml
%10 SDS	0.05 ml

%10 APS	0.05 ml
Temed	0.003 ml

Üst SDS-Polyakrilamid Jel

dH_2O	4.76 ml
%30 Akrilamid	1.04 ml
1M Tris (pH 6.8)	0.39 ml
%10 SDS	0.065 ml
%10 APS	0.050 ml
Temed	0.005 ml

10x Yürütücü Tampon Sistemi

Tris Baz	250 mM
Glisin	2 M
SDS	%0.1

pH 8.3'e ayarlanır.

Elektroforez Çözeltisi

dH_2O	900 ml
10xYürütücü Tampon Sistemi	100 ml

Transfer Çözeltisi

dH_2O	800 ml
Metanol	100 ml
10xYürütücü Tampon Sistemi	100 ml

Örnek Tampon Sistemi (Laemmli)

%10 SDS	20 ml
Sükroz	2.5 g
Bromofenol mavisi	0.25 g

Çözelti 0.5 M tris (pH 6.8) ile 45 ml'ye tamamlanır. Çözelti 1ml'lik hacimlerde bölünür ve -20 ^{0}C'de dondurulur. Kullanım öncesi 1 ml'lik hacimlere 110 µl β-merkaptoetanol eklenir ve karıştırılır.

TBS-T

Tris Baz	3.03 g
NaCl	8 g

Katı maddeler 1lt dH_2O'da çözülür ve pH 7.4'e ayarlanır. Daha sonra 1lt için çözeltiye 1 ml Tween-20 eklenir.

1x PBS :

- PBS 10x	100 ml
- Steril dist. H_20	900 ml
- Glukoz	2 g

- Çözelti laminar akımlı kabin içinde 0.2 µm filtreden geçirilip, falkonlara bölünür ve -20^{0}C de saklanır.

Kollajenaz Type II:

- 0.2 g kollajenaz tartılıp 100 ml PBS'de oda ısısında çözülür.
- Alimunyum folyoya sarılıp pH 7.4'e ayarlanır (1 N NaOH ile).
- Elde edilen %0.2'lik çözelti laminar akımlı kabin içinde 0.2 µm filtreden geçirilir ve 10 ml'lik falkonlara bölünüp -20^{0}C'de kadar saklanır.

Medium199 Earles 10X: (Stok Kültür Ortamı)

- M199 10X 10 ml
- Steril dH_20 90 ml
- Çözelti laminar akımlı kabin içinde hazırlanır, 50'lik falkon tüplerine bölünür, $+4^0C$'de saklanır.
- Hazırlanan Medium199 Earles 1X ''tam besiyeri'' hazırlamada kullanılır.

Tam M199:

- Glutamin 0.2 M 1 ml
- HEPES 1 M 1,5 ml
- $NaHCO_3$ %7,5 (w/v) 1,8 ml
- Penisilin-streptomisin 1 ml
- Fetal sığır serumu 10 ml
- Tüm bu miktarlar steril behere konur üzerine 100 ml'ye tamamlanacak kadar M199 stok eklenir, 50'lik falkon tüplerine bölünüp 1 haftaya kadar $+4^0C$'de saklanabilir.

Paraformaldehit:

1g paraformaldehit tartılır ve üzerine 10 ml dH_2O ilave edilir. 60^0C'de ısıtılır. Üzerine 1 damla 1 M NaOH ilave edilir ve büyük bir kısmı eriyene kadar ısıtmaya devam edilir. Stok 0.2 µm'lik filtreden süzülür. % 10'luk paraformaldehit stok çözelti elde edilir. %10'luk stoktan 2 ml alınıp üzerine 8 ml PBS konulursa % 2'lik 10 ml çözelti elde edilir.

Triton X-100:

100 µl triton x100 alınır ve 100 ml'ye PBS ile tamamlanır. Elde edilen triton % 0.1'liktir.

Rhodamin-Phalloidin:

1 mg stok rhodamin-phalloidin 1 ml DMSO'da çözülür. Işıktan korunması için alüminyum folyoya sarılır. Stoktan 250 µl alınarak üzerine 4750 µl PBS ilave edilir. 50 µg/ml konsantrasyona sahip çözelti elde edilir.

DAPI:

1 g DAPI 5000 µl dH_2O ile çözülür. Buradan 5 µl alınır ve 10 ml'ye tamamlanır. Elde edilen çözelti konsantrasyonu 0.1 µg/ml'dir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Endotel Hücre Kültürü

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC), insan umbilikal kord veninden Baudin ve ark.'nın tanımladığı şekilde[171], kollajenazla enzimatik disagregasyon sonucu izole edilip %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren ''Tam M199'' besiyeri ile flasklarda ve lama kültüre edilmiştir. Çalışmada primer hücre kültürü kullanılmıştır.

İzolasyon şu şekilde gerçekleştirilmiştir; doğumdan sonra alınan göbek kordonu steril koşullarda Krebs-Henseleit çözeltisi içinde taşınmıştır. Laminar akımlı kabin içinde steril 6 numara beslenme katateri, umbilikal ven içine döndürülerek yerleştirilir. Önceden su banyosunda 37^0C'ye getirilen 1x PBS 20cc'lik enjektöre çekilir ve kanül yardımıyla damar yavaş yavaş yıkanır. Bu şekilde kırmızı kan hücreleri venden uzaklaştırılmış olur. Farklı bir enjektör 37^0C'ye kadar ısıtılmış % 0.2'lik kollajenazla doldurulur ve damara verilir. Kollajenaz diğer taraftan akmaya başladığında damarın alt ucu bağlanır.

Mümkün olduğu kadar kollajenazın damara verilmesi sağlanır. Ven iyice kollajenazla şişirildikten sonra kanül takılı uçta bağlanır. Kord büyük petri kabında inkübatöre konur ve 10 dk. beklenir. Kollajenazla inkübasyondan sonra 20 cc'lik enjektöre 37^0C'deki PBS ve ''tam M199 besiyeri'' 1:1 oranında karıştırılarak çekilir ve damar laminar akımlı kabin içinde yıkanarak 50ml'lik falkona içerik toplanır. Toplanan içerik 15ml'lik falkonlara eşit miktarlarda bölüştürülür ve oda ısısında 1500 rpm'de 10 dk santrifüjlenir. 10dk sonunda laminar akımlı kabin içinde falkonlardan süpernatantlar atılır. Falkonlardaki pelletler ''tam M199 besiyeri'' ile pipetlenerek resüspande edilir. T-25 flask'a toplam hacim 5ml olacak şekilde ekilir. Flask kapağı gevşetilerek inkübatör içine konulur. Flask 37^0C'de %95 hava %5 CO_2 bulunan ortamda inkübe edilir. 1 gün inkübatörde bekleyen flask, besiyeri ertesi gün değiştirilir (besiyeri çekilir, 37^0C'deki 5ml PBS ile yıkanır ve 37^0C'de taze besiyeri konur). Bu şekilde flaska yapışmayan hücreler uzaklaştırılmış olur. Besiyeri değişimi sonrası mikroskop altında hücrelerin yüzeye yapışıp yapışmadıklarına bakılır. Kültürler günlük olarak kontrol edilir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlenir. Hücrelerin tutundukları yüzeyi kaplayana kadar 2 günde bir ''tam M199 besiyeri'' ile besiyeri değişimi yapılır. Yüzeyi kaplayan hücreler morfolojik olarak parke taşı görünümü sergilemektedirler.

Dokudan izole edilen endotel hücreleri kabın yüzeyini %100 tabaka şeklinde kapladıktan sonra deneye alınmıştır. Hücreler farklı dozlarda uvabain ve Rho kinaz inhibitörü olan Y27632 ile inkübe edilmiş ve Western-Blot yöntemi ile çeşitli protein ekpresyonlarına bakılmıştır. Ayrıca uvabain uygulanmış hücrelerde immünofloresan boyama da yapılmıştır. Flasklarda kültüre edilen endotel hücrelerine zaman ve doz bağımlı ilaç uygulaması

sonucu, hücreler faz kontrastta morfolojik olarak incelmiş ve hücrelerin fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.2. Faz Kontrast Mikroskobi

T25 flasklara ekilen hücreler, ekilen alanı tamamen kapladıktan sonra flasklara ilaç uygulanmıştır. İlaç inkübasyon süresinden sonra hücrelerin 3-8 flasktan en az 3 farklı alanda faz kontrastta fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflarda daha sonra tomurcuklu hücre, yüzen hücre ve tutunan hücreler sayılmıştır. Hücre sayıları toplam hücre sayısının %'si olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Floresans Mikroskobi

Hücre izolasyonundan önce lam, hücrelerin yapışması için %1'lik jelatin ile kaplanır. 8 çukurlu lamın içine 500µL %1'lik jelatin çözeltisinden konur ve 40 dk. laminar akımlı kabin içinde tutulur. 40 dk. sonunda çukurlardan jelatin çözeltisi çekilir ve 40 dk. daha beklenir. Daha sonra resüspande edilmiş hücrelerden eşit hacimde çukurlara konularak ekim gerçekleştirilir.

8 çukurlu lama ekilen hücrelere ilaç uygulaması sonucu floresan işaretleme yapılmıştır.

Tablo 1: Lama ilaç uygulamasının gösterimi. Lamın 2, 4, 6 ve 8. çukurlarına 10µM Y27632 uygulanır. 30 dk. inkübasyondan sonra lamın 3, 4, 7 ve 8. çukurlarına 10µM uvabain uygulanır ve 16 saat inkübasyon gerçekleştirilir.

1 Kontrol	**2** 10µM Y27632	**3** 10µM Uvabain	**4** 10µM Uvabain + 10µM Y27632
5 Kontrol	**6** 10µM Y27632	**7** 10µM Uvabain	**8** 10µM Uvabain + 10µM Y27632

Lamın 2, 4, 6 ve 8. çukurlarına 10µM Y27632 uygulanır. 30 dk. inkübasyondan sonra lamın 3, 4, 7 ve 8. çukurlarına 10µM uvabain uygulanır ve 16 saat inkübasyon gerçekleştirilir. İlaç inkübasyon sonrası lamın her çukuru 2 kez 500µl soğuk PBS ile hafif çalkalanarak yıkanmıştır. Hücreler % 2'lik taze hazırlanmış 500µl paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15dk fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası her bir çukur 4 kez 500µl PBS ile yıkanır. Hücreler 500µl % 0.1 Triton X-100 ile 5 dk. permeabilize edilir. Daha sonra 3 kez 500µl PBS ile yıkanır. Hücreler 50µg/ml rhodamine-phalloidin ile 40dk oda sıcaklığında boyanır. 40dk sonrasında hücreler 3 kez 500µl PBS ile yıkanarak bağlanmamış falloidin uzaklaştırılır. Nükleik asitler de boyanmak isteniyorsa DAPI boyamaya geçilir. Hücreler yıkandıktan sonra hazırlanan

0.1µg/ml konsantrasyona sahip DAPI çözeltisinden 250µl hücreler üzerine ilave edilerek oda ısısında 5dk boyunca boyama gerçekleştirilir. DAPI boyama sonrası hücreler 500µl PBS ile 3 kez yıkanır. Yıkama sonrası 8'li çukurlu lamın kenarları çıkartılır; Slow Fade Anti Kit (2x'lik solüsyon filtre edilmiş distile su ile 1:1 oranında dilüe edilir) ile kapatılır. Lamın 2 çukuruna 1'er damla prolong anti fade damlatılır. 45^0 açı ile lamel lamın üzerine kapatılır ve kurumaya bırakılır. Preparatlar floresan ataşmanlı Leica DMIL mikroskobu ile incelenerek Leica DFC 420C kamera ile kaydedilmiştir. F-aktin ve DAPI görüntüleri Photoshop CS2 programı ile birleştirilmiştir.

3.2.4. Kültüre Hücrelerden Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Belirlenen dozlarda ve zamanda uvabain ve Y27632 uygulanan hücreler flasktan 2 ml medyum ile kazınır. İçerik 2ml'lik eppendorflara alınır ve 900g'de 10 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilir. Santrifüj sonrası eppendorftaki süpernatant atılır ve pellet 100µl 10mM HEPES, 0.32 M sukroz, 0.1 mM EDTA ve 1/20 hacim fenil methanosülfonil fluorid içeren tamponda ultrasonik homojeniztör kullanılarak homojenize edilir. İçerik 10500 rpm'de 10 dk. $+4^0$C'de santrifüj edilir. 10 dk. sonunda süpernantlar alınır ve $–80^0$C'de saklanır.

3.2.5. Protein Miktar Tayini

Santrifüj sonrası homojenatların total protein konsantrasyonu Bisinkoninik Asit yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Örnekler 1:7 oranında dilüe edildikten sonra plakanın her kuyucuğuna 20µl olmak üzere 2'şerli olarak konulmuştur. Üzerlerine 1:50 oranında karıştırılmış %4 bakır sülfat ve

bisinkoninik asit karışımı ilave edilmiştir. Plak 37^0C'de 30 dk. bekletildikten sonra 562nm'de okutulmuştur. Sığır serum albümini standartlarına karşı okutulan değerlerden hareketle örneklerin protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.6. Western Blot

Rho kinaz ve kaspaz 3 protein ekspresyonlarının belirlenmesi Western blot yöntemine göre yapılmıştır.

Protein miktar tayininden sonra örnekler 1:1 oranında Örnek Tampon Sistemi (Laemmli) ile karıştırılıp ve 95-100^0C'de 3 dk. kaynatılmıştır. Denatürasyon sonrası hazırlanan jellere, hesaplanan eşit miktarlarda örneklerden yükleme yapılmıştır. Rock I için %8'lik, kaspaz 3 için ise %4-12'lik kademeli SDS-polyakrilamid jel kullanılarak proteinlerin elektroforez işlemi ile ayrımı sağlanmıştır. Elekroforez 120V, 400mA'de 120 dakika yapılmıştır.

Proteinlerin transfer işleminde ROCK I için nitroselüloz membran (35 V, 350 mA, 60 dk.) , kaspaz için ise PVDF membran kullanılmıştır (6V, 75mA, 20 dk.).

Her iki protein için %5'lik süt tozu kullanılarak 1 saat bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

%5'lik süt tozunda 1:500 dilüsyonda monoklonal Rho kinaz antikoru ve monoklonal kaspaz 3 antikoru hazırlanmış ve bloklama sonrasında membranlar gece boyunca +4C'de birincil antikorlarla inkübasyona bırakılmıştır.

Birincil antikor sonrası membranlar %5‘lik süt tozunda 1:1000 dilüsyonda hazırlanan enzim konjuge ikincil antikorla 2 saat boyunca inkübe edilmiştir (ROCK I için anti-fare, kaspaz 3 için anti-tavşan).

Antikorla inkübasyon sonrası membranlar ECL çözeltisi ile muamele edilmiştir. Membranda kemilüminesan olay sonucu oluşan bantlar karanlık odada x-ray filmine aktarılmıştır. Filmde oluşan bantların bilgisayarda ‘’Scion Image’’ programı ile dansitometrik olarak miktar tayini yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

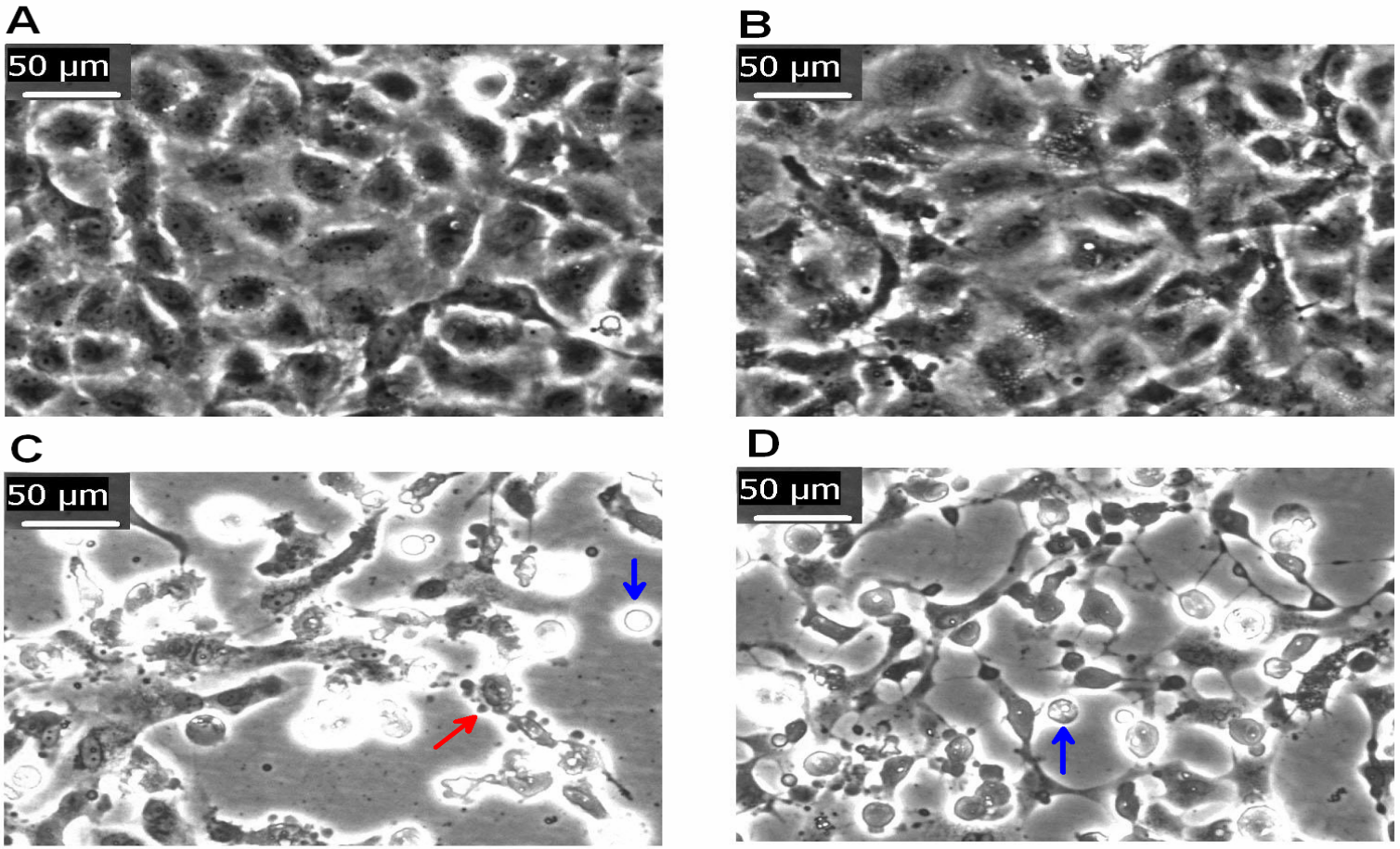
Hücre lizatlarındaki Rho-kinaz ve kaspaz 3 enzim ekspresyonlarının ölçümünde Student ortalamalar arası “unpaired” t testi, çoklu karşılaştırmalarda ise tek yönlü Varyans (ANOVA) analizi kullanılmıştır, ortalama ± ortalamaların standart hatası şeklinde ifade edilmiştir. $P < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Endotel Hücre Morfolojisi ve Hücre Tutunması Üzerinde Uvabainin Etkileri

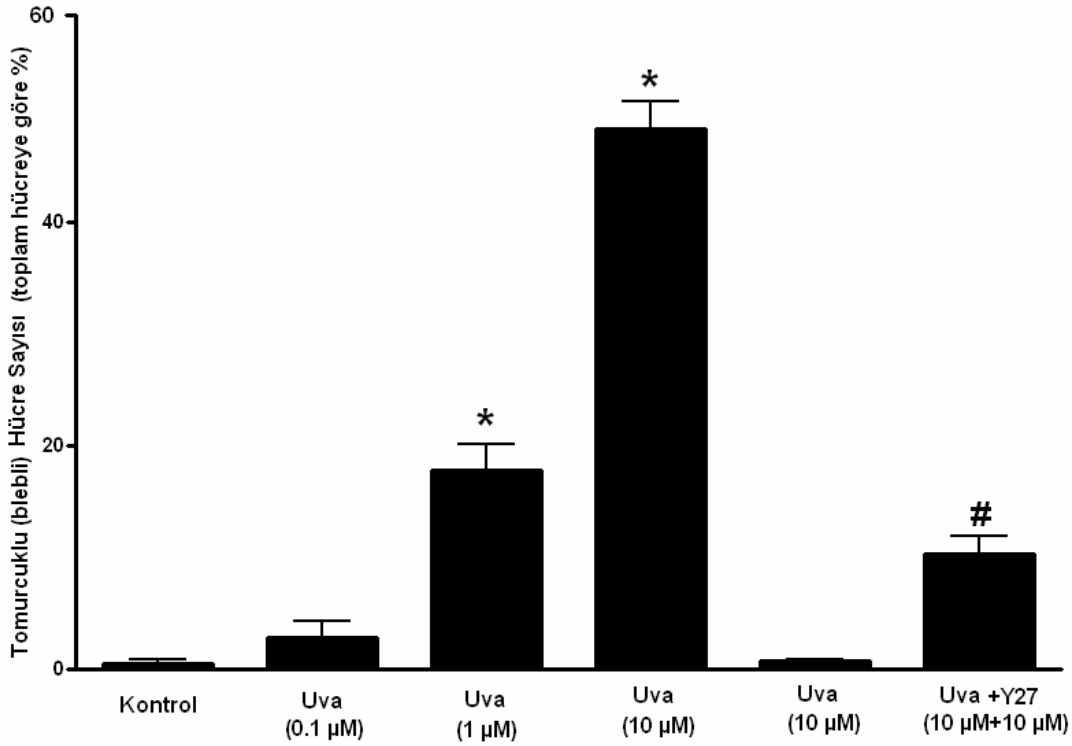
4.1.1. Faz Kontrast Mikroskobik Bulgular

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerine 16 saat 10µM uvabain uygulaması hücrelerin büyük oranda zeminden ayrılmasına (detachment) ve apoptozisin göstergesi olan membran tomurcuk oluşumuna neden olmuştur. Uvabain aracılıklı bu etkiler üzerinde ROCK'un rolünü saptamak için hücrelere spesifik bir ROCK inhibitörü olan Y27632 uygulanmıştır. Uvabain uygulaması öncesi, hücreler 30 dk. boyunca 10µM Y27362 ile inkübasyonu, tomurcuk oluşumunu inhibe etmiştir. Bu durum ROCK'un uvabain ile indüklenen membran tomurcuk oluşumunda etkili olduğunu düşündürmektedir. Endotel hücrelerine yalnız Y27632 uygulandığında hücrelerin kontrole göre faz kontrast görüntüleri arasında herhangi bir morfolojik farklılık belirlenmemiştir (Resim 1).



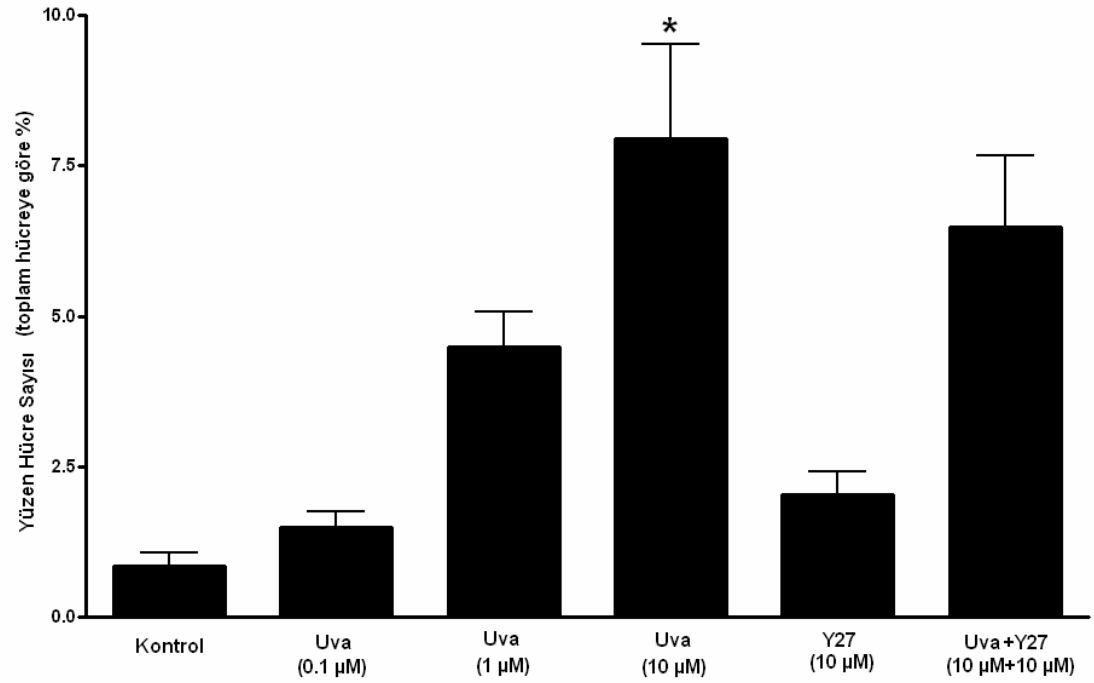
Resim 1: İlaç uygulama sonrası hücrelerin faz kontrast görüntüleri. A: kontrol, B: 10µM Y27632, C: 10µM uvabain, D: 10µM uvabain + 10µM Y27632 ön uygulama. 10µM uvabain inkübasyonu apoptotik membran tomurcuklanmasını indüklerken, 10µM Y27632 ön uygulaması bu etkiyi inhibe etmiştir. Tomurcuklu hücreler kırmızı okla, yüzen hücreler mavi okla gösterilmiştir. (fotoğraflar X100 büyütme ile çekilmiştir)

Uvabainin hücre tomurcuklanması üzerindeki bu etkisi doz bağımlıdır. 10µM 16 saat uvabain uygulanmış endotel hücrelerinde tomurcuklu hücre sayısı % 48.41 ± 2.445 (n = 8) bulunmuştur. Bu değer uvabainle birlikte Y27632 uygulandığında anlamlı olarak azalmıştır [% 10. 34 ± 1. 529 (n = 5)] (Grafik 1).



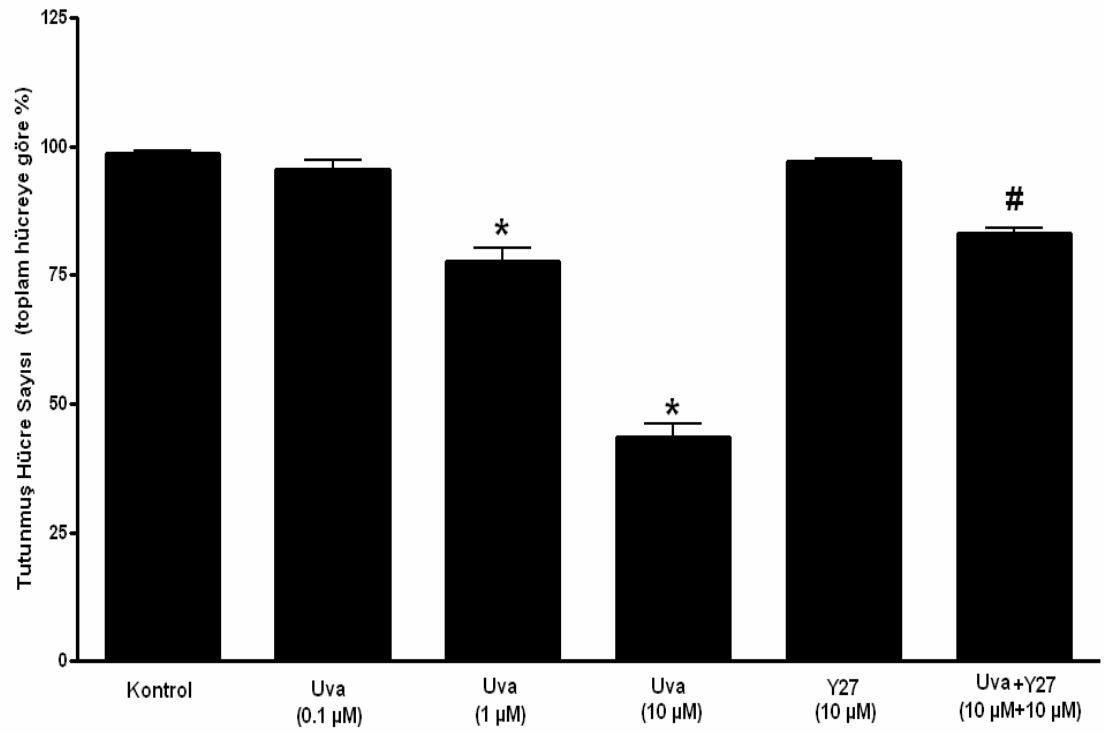
Grafik 1: Uvabainin ve Y27632'nin ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi. Uvabain doz bağımlı membran tomurcuk oluşumunu artırırken, Y27632 ön uygulaması uvabainin neden olduğu tomurcuklu sayısını azaltmıştır. * Uvabain uygulanmış ve kontrol gruplar arasında, # 10µM uvabain uygulanmış ve 10µM uvabain + 10µM Y27632 uygulanmış gruplar arasında anlamlı farklılık (p < 0,05).

Yüzen hücre sayısında uvabain uygulanmış hücrelerde kontrol gruba göre anlamlı bir artış görülürken, Y27632'nin ön inkübasyonu, uvabain uygulanmış gruba göre yüzen hücre sayısında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Grafik 2).



Grafik 2: Uvabainin ve Y27632'nin ön uygulamasının yüzen hücre sayısına etkisi. 10µm uvabain yüzen hücre sayısını artırmıştır. * Uvabain uygulanmış ve kontrol gruplar arasında anlamlı farklılık (p < 0,05).

Uvabainin neden olduğu tutunmuş hücre sayılarındaki anlamlı azalış doz bağımlıdır. 10µM uvabain, tutunmuş hücre sayısını % 98.57 ± 0. 583 (n = 3)'ten, % 43.64 ± 2.55 (n = 8)'e düşürmüştür. Y27632 ön uygulaması 10µM uvabain uygulanan gruba göre tutunmuş hücre sayısını % 43.64 ± 2.55 (n = 8)'den, %83.18 ± 1. 09 (n = 5)'a çıkartmıştır (Grafik 3).

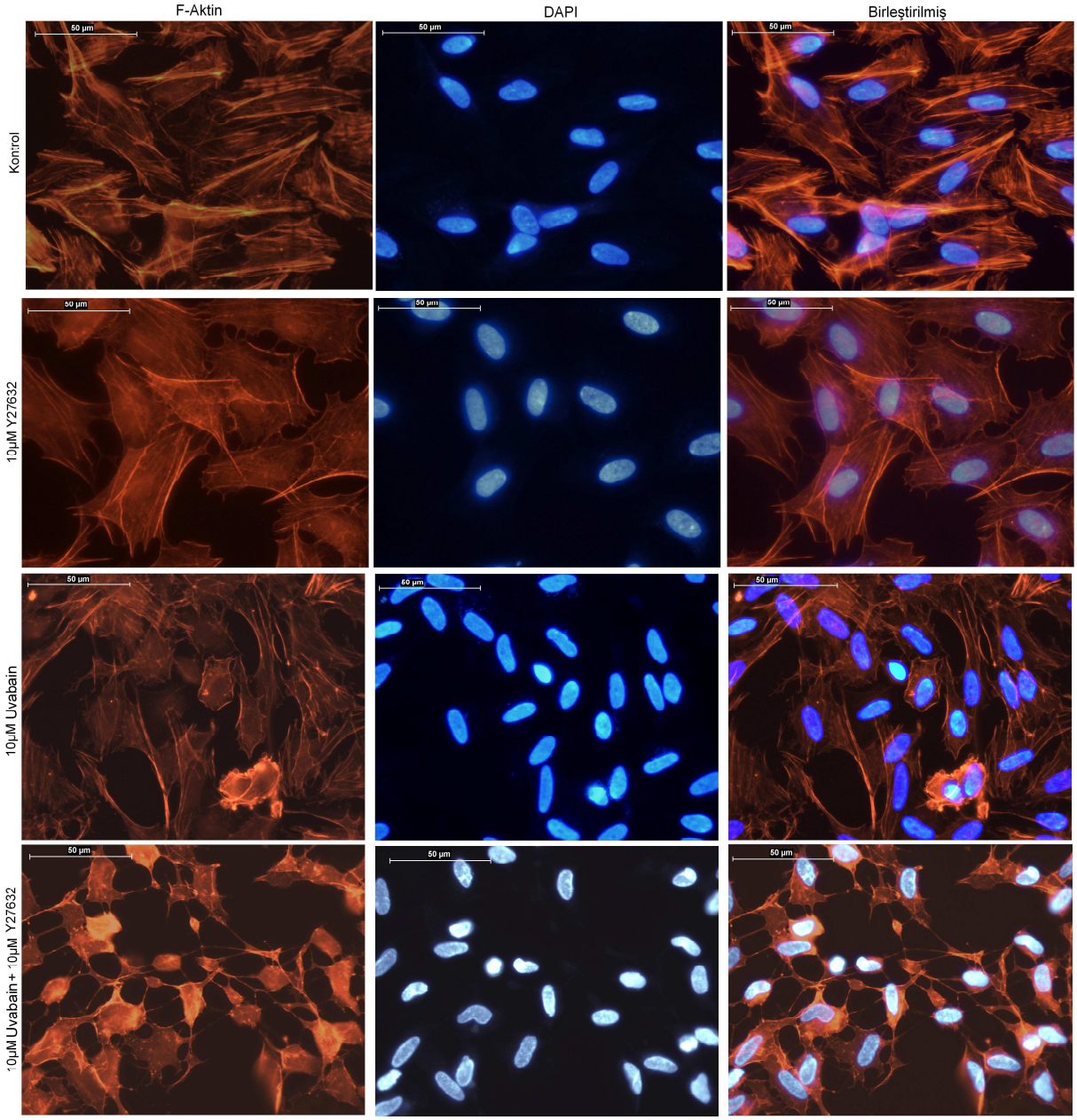


Grafik 3: Uvabainin ve Y27632'nin ön uygulamasının tutunmuş hücre sayısına etkisi. Doz bağımlı olarak uvabain tutunmuş hücre sayısını azaltmıştır. Y27632 ön uygulaması ise 10µm uvabainin neden olduğu tutunmuş hücre sayısındaki azalışı inhibe etmiştir. * Uvabain uygulanmış ve kontrol gruplar arasında, # 10µM uvabain uygulanmış ve 10µM uvabain + 10µM Y27632 uygulanmış gruplar arasında anlamlı farklılık (p < 0,05).

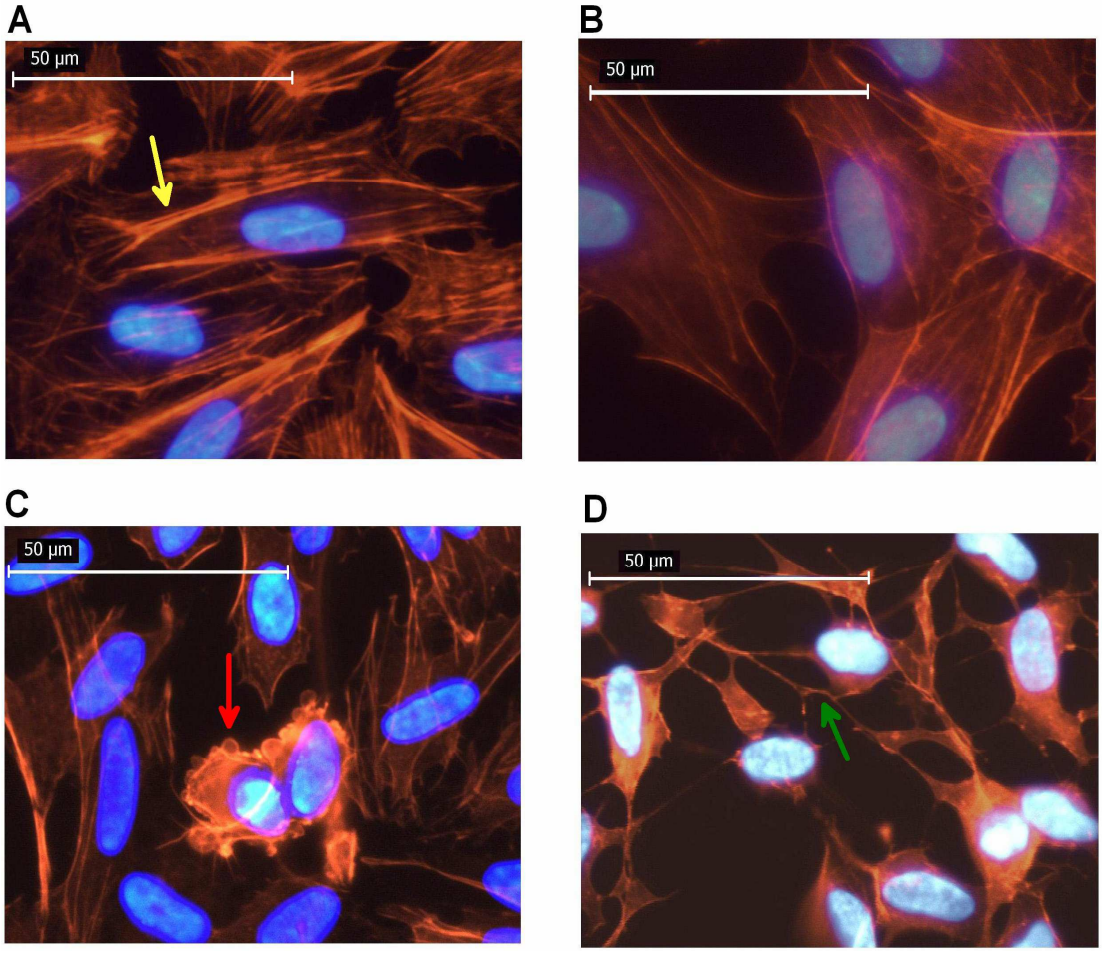
4.1.2. Floresans Mikroskobik Bulgular

Uvabain uygulanmasının hücre morfolojisinde ne gibi değişiklikler oluşturduğu ve bunun ROCK inhibisyonundan nasıl etkilendiğinin belirlenebilmesi için faz kontrast mikroskobisine ek olarak floresans mikroskobisi de kullanılmıştır. Uvabain uygulanan hücrelerde kontrole göre aktin liflerinde azalma ve belirlenebilen kopmuş hücrelerde apoptotik tomurcuklanma oluştuğu gözlenmiştir. Yalnızca Y27632 uygulanan hücrelerde ise hücre içi aktin liflerinde belirgin azalmanın yanında hücrelerin genişlediği görülmüştür.

Uvabain uygulanmadan önce Y27632 ön uygulaması uvabain aracılıklı tomurcuklanmaların inhibisyonuna neden olurken hücre hacminde de belirgin azalmayla karakterize hücre büzülmesine neden olmuştur. Ayrıca hücreler arasında f-aktin liflerinden bir ağ oluşumuna neden olarak hücrelerin bir arada tutulmasını sağladığı gözlenmiştir (Resim 2 ve 3).



Resim 2: Uvabain ve Y27632 uygulanan hücrelerde aktin filamentlerin formasyonu ve membran tomurcuk oluşumu. Fikse edilen hücreler F-aktin'e spesifik rhodamin-falloidin, nükleik asitlere spesifik DAPI ile boyanmıştır. 10µM uvabain apoptozisin göstergesi olan tomurcuklanmaya neden olurken, 10µM Y27632 ön uygulaması uvabainin bu etkisini geri çevirmiştir. (fotoğraflar X400 büyütme ile çekilmiştir) (Fotoğraflar Adobe Photoshop CS2 programı ile birleştirilmiştir.)

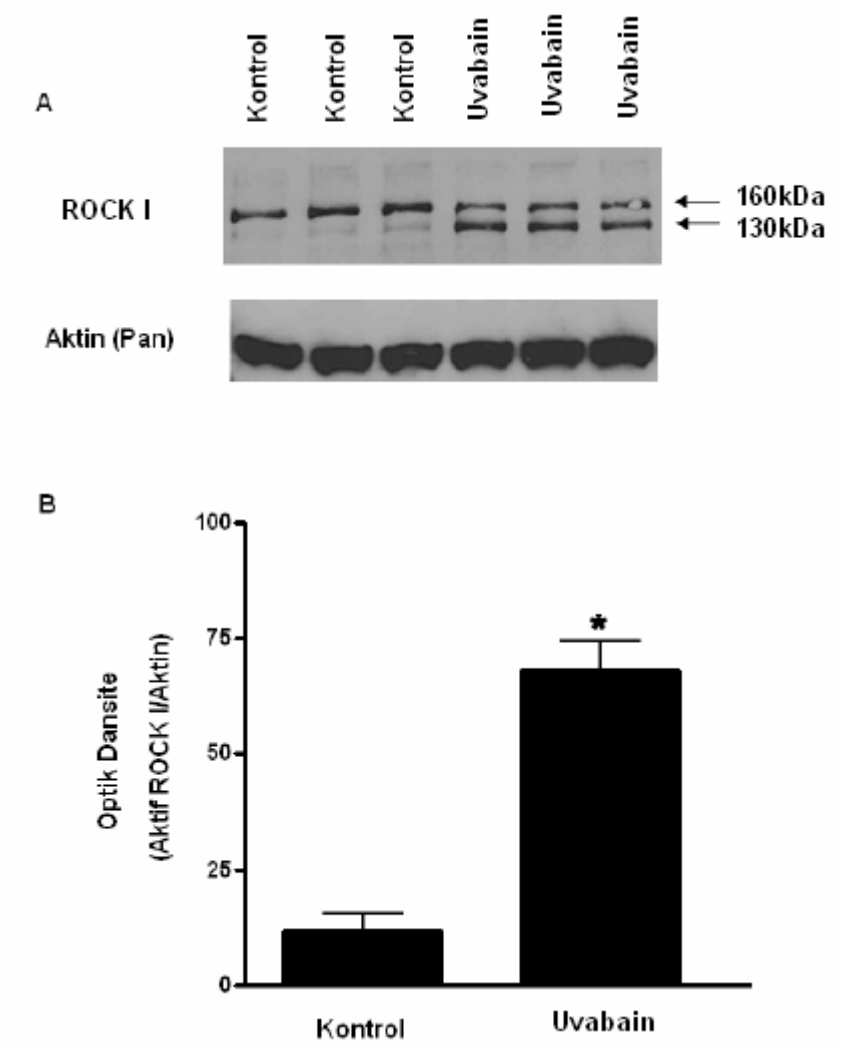


Resim 3: Resim 2'deki birleştirilmiş görüntülerden yakınlaştırılmış alanlar. A: kontrol, B: 10µM Y27632, C: 10µM uvabain, D: 10µM uvabain + 10µM Y27632 ön uygulama. F-aktin bantları sarı ok, tomurcuklu hücre kırmızı ok ve Y27632 ön uygulamasının neden olduğu ağ oluşumu yeşil ok ile gösterilmiştir.

4.2. Uvabainin ROCK I Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

ROCK'un aktin-miyozin kasılmasını kontrol etmesinden dolayı membran tomurcuklanmasının oluşumunda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir**.** Endotel hücrelerine 16 saat 10µM uvabain uygulaması sonucu 130kDa molekül ağırlığına sahip olan ROCK I'in aktif

formunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür. Bu bulgular uvabainin neden olduğu membran tomurcuklanmasının oluşumunda, ROCK I'in aktivasyonunun rol oynadığını göstermektedir.

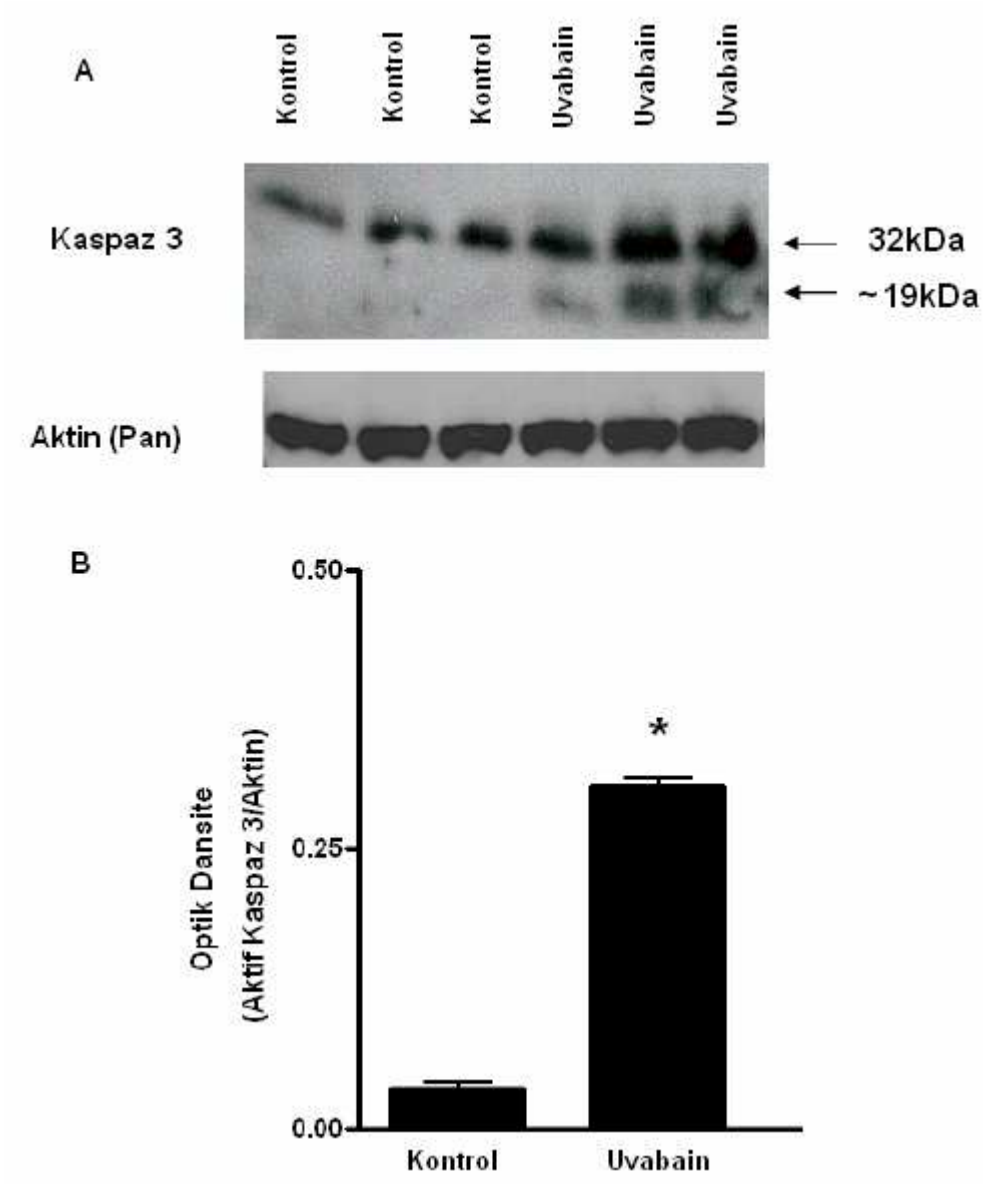


Şekil 13: Uvabain uygulanmış ve kontrol grubu hücre lizatlarındaki ROCK I ekspresyonu. Temsili immünoblotlar (A). ROCK I ekpresyonu için yapılan dansitometrik analiz (B). Uvabain aktif ROCK I oluşumunu artırmıştır. * Uvabain uygulanmış ve kontrol gruplar arasında anlamlı farklılık ($p < 0,05$).

4.3. Uvabainin Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Apoptozisin farklı şekillerde indüklenmesi, kaspaz 3'ün aktif fragmentasyonuna neden olmakta ve aktif kaspaz 3 de, 160 kDa'luk inaktif rock'un 130 kDa'luk aktif formuna dönüşmesine neden olmaktadır.

Uvabain uygulanmış hücrelerde kaspaz 3 aktivasyonu ve ROCK fragmentasyonun eş zamanlı gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi için endotel hücrelerine uvabain uygulanmış ve daha sonra hücre lizatlarında western blot yöntemi ile aktif kaspaz formunun bulunup bulunmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. 16 saat 10µM uvabain uygulanmış hücrelerde aktif kaspaz 3 oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir.



Şekil 14: Uvabain uygulanmış ve kontrol grubu hücre lizatlarındaki kaspaz 3 ekspresyonu. Temsili immünoblotlar (A). Kaspaz 3 ekpresyonu için yapılan dansitometrik analiz (B). Uvabain aktif kaspaz 3 oluşumunu arttırmıştır. * Uvabain uygulanmış ve kontrol gruplar arasında anlamlı farklılık (p < 0,05).

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kronik uvabain uygulamasına bağlı hücre ölümleri ve apoptozisin mekanizmasında Rho kinaz enziminin olası rolü incelenmiştir.

Hem faz kontrast hem de floresan mikroskobik çalışmalar, uvabainin endotel hücrelerinde apoptotik membran tomurcuk oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Spesifik bir ROCK inhibitörü olan Y27632 ön uygulaması tomurcuk oluşumunu inhibe etmiştir.

Tomurcuklu hücre miktarı sayısal olarak değerlendirildiğinde, uvabain (1µM ve 10µM) uygulamasının tomurcuklu hücre sayısında doz bağımlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir.

16 saat 10µM uvabain, hücrenin sustratumdan ayrılmasına neden olmuştur. Bu bulgu Orlov ve ark.[4] yaptığı çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Vagin ve ark.[68] ve Contreras ve ark.[66,67]'nın yaptıkları çalışmalar, Na^+/K^+ ATPaz'ın inhibisyonu sonucu hücrelerin birbirinden ve substratumdan ayrıldığını göstermiştir. Bu nedenle uvabainin Na^+/K^+ ATPaz'ın inhibisyonuna neden olup hücrelerin substratumdan kalkması sonucu apoptozisi indüklediği düşünülebilir.

1µM ve 10µM uvabain anlamlı olarak tutunan hücre sayısını azaltmıştır. Y27632 ön uygulaması ise bu etkiyi yine geri çevirmiştir.

Uvabain, kaspaz 3 ve ROCK I kesilmesini indüklemektedir. Gelişen ROCK aktivasyonu ile de membran tomurcuk oluşumu gerçekleşmektedir. Kaspaz 3 aracılı ROCK I aktivasyonu, MLC fosforilasyonunu ve aktomyozin kontraktilitesini artırdığı için membran tomurcuk oluşumunda gereklidir[15,16]. Bu bulgular uvabainin neden olduğu apoptoziste, Rho kinazın önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Uvabain ve Y27632'nin birlikte uygulandığı hücrelerde spesifik olarak yoğun bir hücre büzülmesi görülmüştür. Tek başına uvabain uygulandığında bu etkinin görülmemesi, gözlenen hücre büzülmesinde ROCK inhibisyonunun katkısının olduğunu düşündürmektedir. Uvabain tarafından Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonuyla hücre içi iyonik dengenin değiştirilmesi, diğer taraftan ROCK inhibisyonuyla olası F-aktin-membran kanal proteinleri etkileşiminin bozulması birlikte bu etkinin oluşmasına neden olabilir. Ancak bu olayın mekanizmasının aydınlatılabilmesi için daha detaylı çalışmalara gerek vardır.

Damar endotel hücrelerinin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü kan akımının sürdürülebilmesi için gereklidir.

Damar endotel hücre apoptozisi hipertansiyonda görülen vasküler remodelingdeki damar disfonksiyonuna katkıda bulunmaktadır[179].

Esansiyel hipertansiyon olgularında endojen uvabain düzeyinin yükselmesi, endotel hücrelerini bu madde için hedef haline getirmektedir. Dolayısıyla uvabainin endotel hücrelerinde aponekrotik ölümleri indüklemesi, bu maddenin apoptotik etki mekanizmasının aydınlatılmasını önemli hale getirmektedir.

Bununla birlikte hipertansif olgularda yükselen endojen uvabain düzeyleri bu maddenin endotel hücrelerinde in-vitro apoptozis oluşturan konsantrasyonlarından oldukça düşüktür. Ancak in-vitro deneylerde uvabain uygulaması 24 saat gibi sürelerle kısıtlıdır. Çok daha uzun süreli daha düşük uvabain düzeylerinin endotel hücreleri üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Uvabain tarafından indüklenen aponekrotik mekanizmaların bu uzun süreli maruziyet sonrasında da tetiklenebileceğini göz önünde bulundurmak gerekir.

Uvabain ve benzeri kardiyak glikozidlerin çeşitli tümör hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. ROCK inhibitörleri ise tümör hücre invazyonunu inhibe etmektedir. Bu özellikleri nedeniyle her iki grup bileşiğin antikanser ilaç olarak geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Uvabain aracılıklı hücre kopmasının ROCK inhibitörü tarafından önlenmesi, her iki ilaçla kombine kanser tedavi potansiyeli taşıması açısından klinik bir önem oluşturabilir. Ancak endotel hücrelerinde gözlenen bu durumun, kanser hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda sınanması gerekir.

6. SONUÇ

Oubainin indüklediği hücre ölümleri ve apoptoziste Rho kinazın olası rolü insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) araştırılmıştır.

Sonuçlarımız uvabainin indüklediği hücre kopması ve membran tomurcuk oluşumunda Rho kinazın önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu bulgular endojen uvabain düzeylerinin yükseldiği esansiyel hipertansiyon olgularında önemli olabilir. Ayrıca bulgularımız kanser hastalarında, uvabain ve ROCK inhibitörleri ile kombine tedavi olasılığını ima etmektedir.

7. ÖZET

Oubainin indüklediği hücre ölümleri ve apoptoziste Rho kinazın olası rölü insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) araştırılmıştır.

HUVEC doğumdan sonra alınan umbilikal kordlardan izole edilmiş ve yalnızca primer hücreler deneylerde kullanılmıştır. Endotel hücreleri yapıştıkları yüzeyi tamamen kaplayınca, hücrelere uvabainin (0.1-10µM, 16 saat) farklı konsantrasyonları ile ROCK inhibitörü olan Y27632 (10µM) uygulanmıştır. Hücre morfolojisi ve yapıştıkları yüzeyden kalkmaları faz kontrast ve floresan mikroskobi ile, ROCK I ve kaspaz 3 ekspresyonları immünoblotlama ile ölçülmüştür.

Uvabainin, hücre kopmasına ve membran tomurcuk oluşumuna neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca 10µM uvabain uygulaması endotel hücrelerin tomurcuklu hücre sayısını anlamlı olarak artırmıştır. Y27632 ön uygulaması ise uvabainin indüklediği membran tomurcuk oluşumunu anlamlı olarak inhibe etmiştir. Uvabain yüzen ölü hücre sayısını da anlamlı olarak artırmıştır. Fakat Y27632 ön uygulaması yüzen hücre sayısında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. HUVEC'te uvabainin hücre kopmasına etkisi doz bağımlıdır. Bu etki Y27632 ön uygulaması ile geri çevrilmiştir. ROCK I ve kaspaz 3'ün aktif fragmantasyonu da 10µM uvabain uygulanmış hücrelerde anlamlı olarak artmıştır.

Sonuçlarımız uvabainin indüklediği hücre kopması ve membran tomurcuk oluşumunda Rho kinazın önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu bulgular endojen uvabain düzeylerinin yükseldiği esansiyel hipertansiyon olgularında önemli olabilir. Ayrıca bulgularımız

kanser hastalarında, uvabain ve ROCK inhibitörleri ile kombine tedavi olasılığını ima etmektedir.

Anahtar Kelimeler : uvabain, Rho kinaz, apoptozis, HUVEC

8. SUMMARY

Possible involvement of the Rho kinase in ouabain-induced cell deaths and apoptosis was investigated in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

HUVEC were isolated from the umbilical cords after delivery and only primary cells were used for the experiments. When endothelial cells became confluent, cells were treated with different concentrations of ouabain (0.1-10µM, 16 hours) and Y27632 (10 µM) , a Rho kinase inhibitor. Cell morphology, detachment and ROCK I and caspase 3 expressions were evaluated by phase contrast and fluorescence microscopy and immunoblotting respectively.

It was found that ouabain induced cell detachment and membrane blebbing. Moreover, ouabain (10µM) treatment significantly increased in cell numbers with blebs of endothelial cells. Preincubation with Y27632 significantly inhibited the ouabain-induced membrane blebbing. Ouabain also increased the floating death cell numbers significantly. However preincubation with Y27632 did not make a significant change in floating cell numbers. In addition, ouabain caused cell detachment in a dose-dependent manner in HUVEC. This effect was also prevented by the pretreatment with Y27632. Active fragmentation of both ROCK I and caspase 3 were significantly higher in 10µM ouabain treated cells.

Our results indicate that Rho kinase plays an essential role for ouabain-induced cell detachment and blebbing. These observations may be important for essential hypertension with elevated endogenous

ouabain levels. Additionally, resent findings also imply the possibility of combination therapy with ouabain and ROCK inhibitors in cancer patients.

Keywords: ouabain, Rho kinase, apoptosis, HUVEC

9. KAYNAKLAR

1. Robinson JD, Flashner MS. The Na^+-K^+-activated ATPase. Enzymatic and transport properties. Biochim Biophys Acta 1979; 549:145–76.

2. Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem 2002; 269 (10): 2434–2439.

3. Trevisi L, Visentin B, Cusinato F, Pighin I, Luciani S. Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 321: 716–721.

4. Orlov SN, Thorin-Trescases N, Pchejetski D , Taurin S, Farhat N, Tremblay J, Thorin E, Hamet P. Na+/K+ pump and endothelial cell survival: [Na+]i/[K+]i-independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of [Na+]i . Eur J Physiol 2004; 448: 335–345.

5. Orlov SN, Akimova OA, Lopina OD, Hamet P. Search for intermediates of Na^+, K^+-ATPase-mediated $[Na^+]_i/[K^+]_i$ independent death signaling triggered by cardiotonic streoids. Pathophysiology 2005; 12: 125-135.

6. Akimova OA, Hamet P, Orlov SN. [Na+]i/[K+]i-independent death of ouabain-treated renal epithelial cells is not mediated by Na+,K+-ATPase internalization and de novo gene expression. Eur J Physiol 2008; 455: 711–719.

7. Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma Biochimica et Biophysica Acta 2007; 1768: 1691–1702

8. Ren YP, Huang RW, Lü ZR. Ouabain at pathological concentrations might induce damage in human vascular endothelial cells. Acta Pharmacologica Sinica. 2006; 27 (2): 165-172.

9.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: 32–39.

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

11. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. EMBO J. 1996; 15: 2208 –2216.

12. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. EMBO J. 1996; 15: 1885–1893.

13. 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.

14. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 446–456.

15. Coleman M L, Sahai E A, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. Nat Cell Biol 2001; 3: 339–345.

16. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. Nat Cell Biol 2001; 3: 346–352.

17. 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.

18. Arthur WT, Noren NK, Burridge K. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. Biol Res 2002; 35(2): 239-46.

19. Noren NK, Arthur WT, Burridge K. Cadherin Engagement Inhibits RhoA via p190RhoGAP. J Biol Chem 2003; 278(16):13615–13618.

20. Philippova M, Ivanov D, Allenspach R, Takuwa Y, Erne P, Resink T RhoA and Rac mediate endothelial cell polarization and detachment induced by T-cadherin. FASEB J 2005 ;19(6): 588-90.

21. Frisch, S. M. and Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol 1994; 124: 619-626.

22. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-rangind implications in tissue kinetics. Br j Cancer 1972; 26: 239-257.

23. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell 2004; 116: 205–219.

24. Foo RS, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. J Clin Invest 2005; 115: 565–571.

25. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998; 281: 1305–1308.

26. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14: 193–209.

27. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets

mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor- R1/Fas death. J Biol Chem 1999; 274: 1156–1163.

28. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 1998; 94: 491–501.

29. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell 1998; 94: 481–490.

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

31. Lingrel JB, Kuntzweiler TA. Na+,K(+)-ATPase. J Biol Chem. 1994 ; 269(31): 19659-62

32. Akera T, Brody TM. Inotropic action of digitalis and ion transport. Life Sci 1976; 18: 135–142 .

33. 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.

34. Lingrel JB, Orlowski M, Sbull MM, Price EM. Prog. Nucleic J. H. H. M., ed) pp. 1-26, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.1990

35. Sweadner K J. Isozymes of the Na+/K+-ATPase. Biochim. Biophys. Acta1989; 988: 185-220

36. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. The American Journal of Physiology 1988; 275 (5 Pt 2): F633–F650.

37.Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na–K-ATPase. American Journal of Physiology. Renal Physiology 2006; 290 (2): F241–F250.

38. Gren NM. Inion –motive Atpases: Structure, function and Regulation New york Academy of sciences, New York. 1992.

39. Good PJ, Richter K, Dawid IB. A nervous system-specific isotype of the beta subunit of Na+,K(+)-ATPase expressed during early development of Xenopus laevis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1990; 87(23): 9088-92.

40. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. Annual Review of Biochemistry 2002; 71: 511–535.

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

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

43. Chow DC, Forte JG. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. The Journal of Experimental Biology 1995;198 (Pt1): 1–17.

44. Pressley TA. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. Mineral and Electrolyte Metabolism 1996;22 (5–6): 264–271.

45. Garty H, Karlish SJ. Role of FXYD proteins in ion transport. Annual Review of Physiology 2006; 68: 431–459.

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

47. Takeyasu K, Okamura H,Yasuhara JC, Ogita Y, Yoshimura SH. P-type ATPase diversity and evolution: The origins of ouabain sensitivity and subunitassembly. Cell Mol Biol 2001;47: 325–333

48. Liu L, Mohammadi K, Aynafshar B, Wang H, Li D, Liu J, Ivanov AV, Xie Z, Askari A. Role of caveolae in the signal transducing function of cardiac Na+/K+-ATPase. Am J Physiol 2003. This article provides evidence that Na+-K+–ATPase signalosome is preassembled in caveolae.

49. Ferrari P, Torielli L, Ferrandi M, Padoani G, Duzzi L, Florio M, et al. PST 2238 : a new antihypertensive compound that antagonises the long-term pressor effect of ouabain. J Pharm Exp Ther 1998; 285: 83.

50. Xie Z, Cai T. Na+–K+-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. Molecular Interventions 2003; 3 (3): 157–168.

51. Yudowski GA, Efendiev R, Pedemonte CH, Katz AI, Berggren PO, Bertorello AM. Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na+, K+-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000; 97 (12): 6556–6561.

52. Zhang S, Malmersjo S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlen P, Mikoshiba K, Aperia A. Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. The Journal of Biological Chemistry 2006; 281 (31): 21954–21962.

53. Efendiev R, Chen Z, Krmar RT, Uhles S, Katz AI, Pedemonte CH, Bertorello, AM, The 14-3-3 protein translates the NA+, K+-ATPase {alpha}1-subunit phosphorylation signal into binding and activation of phosphoinositide 3-kinase during endocytosis. The Journal of biological chemistry 2005; 280 (16): 16272–16277.

54. Devarajan P, Scaramuzzino DA, Morrow JS. Ankyrin binds to two distinct cytoplasmic domains of Na,K-ATPase alpha subunit. Proceedings

of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994; 91 (8): 2965–2969.

55. Nelson WJ, Veshnock PJ, Ankyrin binding to (Na++K+)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. Nature 1987; 328 (6130): 533–536.

56. Done SC, Leibiger IB, Efendiev R, Katz AI, Leibiger B, Berggren PO, Pedemonte CH, Bertorello AM. Tyrosine 537 within the Na+, K+-ATPase alpha-subunit is essential for AP-2 binding and clathrin-dependent endocytosis. The Journal of Biological Chemistry 2002; 277 (19): 17108–17111.

57. Bortner CD, Cidlowski JA. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. Biochem Pharmacol 1998; 56: 1549–59.

58. Hughes Jr FM, Cidlowski JA. Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. Adv Enzyme Regul 1999; 39: 157–71.

59. Montague JW, Bortner CD, Hughes Jr FM, Cidlowski JA. A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. Steroids 1999; 64: 563–9.

60. Yu SP, Choi DW. Ions, cell volume, and apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 9360–2.

61. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. J Neurosci 2002; 22: 1350–62.

62. Barbiero G, Duranti F, Bonelli G, Amenta JS, Baccino FM. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. Exp Cell Res 1995; 217: 410–8.

63. Hughes Jr FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. J Biol Chem 1997; 272: 30567–76.

64. Dallaporta B, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Larochette N, Brenner C, Marzo I, Kroemer G. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. J Immunol 1998; 160: 5605–15.

65. Nobel CS, Aronson JK, van den Dobbelsteen DJ, Slater AF. Inhibition of Na^+/K^+ATPase may be one mechanism contributing to otassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis. poptosis 2000; 5: 153–63.

66. Contreras RG, Flores-Maldonado C, Lazaro A, Shoshani L, Flores-Benitez D, Larre I, Cereijido M. Ouabain binding to Na+,K+-ATPase relaxes cell attachment and sends a specific signal (NACos) to the nucleus. J Membr Biol 2004; 198: 147–158.

67. Contreras R G, Shoshani L, Flores-Maldonado C, Lazaro A, Cereijido M. Relationship between Na+,K+-ATPase and cell attachment. J Cell Sci 1999; 112: 4223–4232.

68. Vagin O, Tokhtaeva E, Sachs G. The Role of the _1 Subunit of the Na,K-ATPase and Its Glycosylation in Cell-Cell Adhesion. J Biol Chem 2006; 281 (51): 39573–39587

69. 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

70. Schatzmann HJ. Herzglykoside als hemmstoffe für den aktiven kalium- und natriumtransport durch die erythrocytenmembran. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 1953;11: 346–354.

71. Eisner DA, Smith TW. The Na-K pump and its effectors in cardiac muscle.In The Heart and Cardiovascular System (Fozzard, H. A., Haber, E, Jennings RB, Katz AM.&Morgan HE, eds), 1992; 863 –902. Raven Press, New York.

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

73. Szent-Gyorgi A. Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle. New York: Academic, 1953.

74. Dahl LK, Knudsen KD, Heine M, and Leitl G. Effects of chronic excess salt ingestion. Genetic influence on the development of salt hypertension in parabiotic rats: evidence for a humoral factor. J Exp Med 1967; 126: 687–699

75. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca2_ stores and cell responsiveness. Am J Physiol Cell Physiol 1993; 264: C1367–C1387

76. Hallaq HA and Haupert GT Jr. Positive inotropic effects of the endogenous Na_/K(_)-transporting ATPase inhibitor from the hypothalamus. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 10080–10084

77. Hamlyn JM, Harris DW, and Ludens JH. Digitalis-like activity in human plasma. Purification, affinity, and mechanism. J Biol Chem 1989; 264: 7395–7404

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

79. 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.

80. 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 Hypertens 1998; 20: 523–533,

81. Antolovic R, Kost H, Mohadjerani M, Linder D, Linder M, and Schoner W. A specific binding protein for cardiac glycosides exists in bovine serum. J Biol Chem 1998; 273: 16259–16264

82. Komiyama Y, Nishimura N, Nishino N, Okuda K, Munakata M, Kosaka C, Masuda M, and Takahashi H. Purification and characterization of ouabain-binding protein in human plasma. Clin Exp Hypertens 1998; 20: 683–690

83. 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, Blaustein MP. Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. J. Physiol 2005; 569: 243-256.

84. Lichtstein D, Gati I, Samuelov S, Berson D, Rozenman Y, Landau L, Deutsch J. Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses. European Journal of Biochemistry/FEBS 1993; 216 (1): 261–268.

85. Schneider R, Antolovic R, Kost H, Sich B, Kirch U, Tepel M, Zidek W, Schoner W. 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.

86. Bagrov AY, Fedorova OV, Dmitrieva RI, Howald WN, Hunter AP, Kuznetsova EA, Shpen VM. Characterization of a urinary bufodienolide Na+, K+-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. Hypertension 1998; 31 (5): 1097–1103.

87. Komiyama Y, Dong XH, Nishimura N, Masaki H, Yoshika M, Masuda M, Takahashi H. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure. Clinical Biochemistry 2005; 38 (1): 36–45.

88. Orlov SN, Taurin S, Tremblay J, Hamet P. Inhibition of Na^+, K^+ pump affects nucleic asid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio: possible implication in vascular remodeling. J Hypertens 2001; 19: 1559-65.

89. Ramirez-Ortega M, Zarco G , Maldonado V, Carrillo JF , Ramos P, Ceballos G, Melendez-Zajgla J, Garcia N, Zazueta C, Chanona J, Suarez J, Pastelin G. Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis? European Journal of Pharmacology 2007; 566: 34–42.

90. Li J, Zelenin S, Aperia A, Aizman O. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB. Journal of the American Society of Nephrology 2006; 17 (7): 1848–1857.

91. 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.

92. Vinci MC, Visentin B, Cusinato F, Nardelli GB, Trevisi L, Luciani S. Effect of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor on iatrogenic apoptosis in human endothelial cells. Biochem Pharmacol 2004; 67: 277–284.

93. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, B.A. Keyt, Dixit V, Ferrara N, Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 30-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem 1998; 273: 30336–30343.

94. A. Yilmaz, S. Kliche, U. Mayr-Beyrle, G. Fellbrich, J. Waltenberger, p38 MAPK inhibition is critically involved in VEGFR-2-mediated endothelial cell survival, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003; 306: 730–736.

95. Aydemir-Koksoy A, Abramowitz J, Allen JC, Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. The Journal of Biological Chemistry 2001; 276 (49): 46605–46611.

96. Haas M, Askari A, Xie Z,. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na+/K+-ATPase. The Journal of Biological Chemistry 2000; 275 (36): 27832–27837.

97. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z, Src-mediated inter-receptor crosstalk between the Na+/K+-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. The Journal of Biological Chemistry 2002; 277 (21): 18694–18702.

98. Khundmiri SJ, Metzler MA, Ameen M, Amin V, Rane MJ, Delamere NA. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. American Journal of Physiology. Cell Physiology 2006 ; 291 (6): C1247–C1257.

99. Dmitrieva RI, Doris PA, Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278 (30): 28160–28166.

100. Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na+/K+-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na+ and Ca2+ concentrations. The Journal of Biological Chemistry 2000.;275 (36): 27838–27844.

101. Scheiner-Bobis G, Schoner W.A fresh facet for ouabain action. Nature Medicine 2001; 7 (12). 1288–1289.

102. Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. European Journal of Biochemistry/FEBS 2002; 269 (10): 2434–2439.

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

104. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci 2005; 118: 843–846.

105. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu. Rev Cell Dev Biol 2005; 21: 247–269.

106. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. EMBO J. 1996; 15: 1885–1893.

107. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. EMBO J. 1996; 15: 2208 –2216.

108. 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.

109. 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.

110. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 1988; 241: 42–52.

111. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. Mol Cell Biol 1996; 16: 5313–5327.

112. Fujisawa K, Fujita A, Ishizaki T, Saito Y, Narumiya S. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. J Biol Chem 1996; 271: 23022–23028.

113. Fujisawa K et al. Different regions of ;Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. J Biol Chem 1998; 273: 18943-18949.

114. 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.

115. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel Messenger for Rho-kinase-mediated Ca2+ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C Circ Res 2002; 91: 112–119

116. Morikage N, Kishi H, Sato M, Guo F, Shirao S, Yano T, Soma M, Hamano K, Esato K, Kobayashi S. Cholesterol primes vascular smooth

muscle to induce Ca^{+2} sensitization mediated by a sphingosylphosphorylcholine- Rho-kinase pathway: possible role for membrane raft. Circ Res 2006; 99: 299–306.

117. Yoneda A, Multhaupt HA, Couchman JR. The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. J Cell Biol 2005; 170:443–453.

118. Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. Blood 2006; 108: 1868–1876.

119. Ward. Y et al The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of Rho/Rho kinase pathway. J Cell Biol 2002; 157: 291-302.

120. Riento K, Guash RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RHo E binds to ROCK I and inhibits down stream signalling. Moll Cell Biol (in the press)

121. Bilan PJ, Moyers SJ, Kahn CR. The Ras related protein Rad associates witj the cytoskeleton in anon-lipd dependent manner. EXp Cell Res 1998; 242: 391-400.

122. Piddini E, Schmid JA, de Martin R, Dotti CG. The Ras-like GTPase Gem is involved is cell shape and remodeling interacts with the novel kinesin-like protein KIF9. EMBO J 2001; 20: 4076-4087.

123. Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA, Bossemeyer D. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-

27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity. Structure 2003; 11: 1595–1607.

124. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. Mol Pharmacol 2000; 57: 976–983.

125. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. Nature 1997; 389: 990–994.

126. Kanthou C, Tozer GM. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. Blood 2002; 99: 2060–2069.

127. Minambres R, Guasch R M, Perez-Arago A, Guerri C. The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. J Cell Sci 2006; 119: 271–282.

128. Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble J P, Westfall T D. Expression and functional role of Rho--kinase in rat urinary bladder smooth muscle. Br. J. Pharmacol., 2003; 138: 757–766.

129. Wei L, Roberts W, Wang L, Yamada M, Zhang S, Zhao Z, Rivkees SA, Schwartz RJ, Imanaka-Yoshida K. Rho kinases play an obligatory role in vertebrate embryonic organogenesis. Development 2001; 128:2953–2962.

130. Kosako H, Goto H, Yanagida M, Matsuzawa K, Fujita M, Tomono Y, Okigaki T, Odai H, Kaibuchi K, Inagaki M. Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments. Oncogene 1999; 18: 2783–2788.

131. Chen XQ, Tan I, Ng C H, Hall C, Lim L, Leung T. Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha implication of the pleckstrin homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies. J Biol Chem 2002; 277: 12680–12688.

132. Chevrier V, Piel M, Collomb N, Saoudi Y, Frank R, Paintrand M, Narumiya S, Bornens M, Job D. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. J Cell Biol 2002; 157: 807–817.

133. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. J Cell Biol 1999; 147: 1023–1038.

134. Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. J Biol Chem 2001; 276: 670–676.

135. Hu E, Lee D. Rho kinase as potential therapeutic target for cardiovascular diseases: opportunities and challenges. Expert Opin. Ther. Targets 2005; 9: 715–736.

136. Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. Circ Res 2006; 98: 322–334.

137. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 446–456.

138. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). J Biol Chem 1996; 271: 20246–20249.

139. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. J Biol Chem 1997; 272: 12257–12260.

140. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. J Cell Biol 1999; 147: 1023–1038.

141. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). Science 1996; 273: 245–248

142. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. Science 1997; 275: 1308–1311.

143. Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. FEBS Lett 1997; 404: 118–124.

144. Totsukawa, G. et al. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for asssembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. J Cell Biol 2000; 150: 797-806.

145. Kaneko T, Amano M, Maeda A, Goto H, Takahashi K, Ito M, Kaibuchi K. Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. Biochem Biophys Res Commun 2000; 273: 110–116.

146. Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. J Biol Chem 2000; 275: 3577–3582.

147. Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, Tsukita S. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. J Cell Biol 1998; 140: 647–657.

148. Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. J Cell Biol 1999; 145: 347–361.

149. Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S, Barber DL. p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. EMBO J 1998; 17: 4712–4722.

150. Hagerty L, Weitzel DH, Chambers J, Fortner CN, Brush MH, Loiselle D, Hosoya H, Haystead TA. ROCK1 phosphorylates and activates ZIP kinase. J Biol Chem 2007; 282: 4884–4893.

151. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. J Cell Biol 1998; 140: 627–636.

152. Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, Tang L, Hla T, Zeng R, Li L, Wu D. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. Nat Cell Biol 2005; 7: 399–404.

153. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. Cell 2000; 100: 387–390.

154. Chang J, Xie M, Shah VR, Schneider MD, Entman ML, Wei L, Schwartz RJ. Activation of Rhoassociated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. Proc Natl Acad Sci 2006; 103: 14495–14500.

155. Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, Gong Y, Scalia R, Dominiak P, Liao JK. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24, 1842–1847.

156. Begum N, Sandu OA, Ito M, Lohmann SM, Smolenski A. Active Rho kinase (ROK-alpha) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 2002; 277: 6214–6222.

157 . Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ, Araki K, Choi CS, Kim HJ, Lee YH, Kaibuchi K, Kahn BB, Masuzaki H, Kim JK, Lee SW, Kim YB. Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. Cell Metab 2005; 2: 119–129.

158. Piazzolla D, Meissl K, Kucerova L, Rubiolo C, Baccarini M. Raf-1 sets the threshold of Fas sensitivity by modulating Rok-alpha signaling. J. Cell Biol 2005; 171: 1013–1022.

159. Domnina LV, Ivanova OY, Pletjushkina OY, Fetisova EK, Chernyak BV, Skulachev VP, Vasiliev JM. Marginal blebbing during the early stages of TNF-induced apoptosis indicates alteration in actomyosin contractility. Cell Biol Int 2004; 28: 471–475.

160. Lane JD, Allan VJ, Woodman PG. Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. J Cell Sci 2005; 118: 4059–4071.

161. McElhinney B, Poynter ME, Shrivastava P, Hazen SL, Janssen-Heininger YM. Eosinophil peroxidase catalyzes JNK-mediated membrane blebbing in a Rho kinase-dependent manner. J Leukoc Biol 2003; 74: 897–907.

162. Parent N, Sane AT, Droin N, Bertrand R. Procaspase-2S inhibits procaspase-3 processing and activation, preventing ROCK-1-mediated apoptotic blebbing and body formation in human B lymphoma Namalwa cells. Apoptosis 2005; 10: 313–322.

163. Shiratsuchi A. Mori T, Nakanishi Y. Independence of plasma membrane blebbing from other biochemical and biological characteristics of apoptotic cells. J Biochem 2002; 132: 381–386.

164. Zihni C, Mitsopoulos C, Tavares IA, Ridley AJ, Morris JD. Prostate-derived sterile 20-like kinase 2 (PSK2) regulates apoptotic morphology via C-Jun N-terminal kinase and Rho kinase-1. J Biol Chem 2006; 281: 7317–7323

165. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. Mol Cell 2004; 14: 277–287.

166. Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart C L, Olson MF. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. J Cell Biol 2005; 168: 245–255.

167. Orlando KA, Pittman RN. Rho kinase regulates phagocytosis, surface expression of GlcNAc, and Golgi fragmentation of apoptotic PC12 cells. Exp Cell Res 2006; 312: 3298–3311.

168. Orlandoa KE, Stoneb NL, Pittman RN. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. Exp Cell Res 2006; 312: 5 – 15

169. Erwig LP, McPhilips KA, Wynes MW, Ivetic A, Ridley AJ, Henson PMDifferential regulation of phagosome maturation in macrophages and dendritic cells mediated by Rho GTPases and ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins. Proc Natl Acad Sci 2006; 103: 12825–12830.

170. Tosello-Trampont AC, Nakada-Tsukui K, Ravichandran KS. Engulfment of apoptotic cells is negatively regulated by Rho-mediated signaling. J Biol Chem 2003; 278: 49911–49919.

171. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M, A protocol for isolation and culture of human umbilikal vein endothelial cells. Nat Pro 2007; 2(3)

172. Coleman ML, Olson MF. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. Cell Death and Differentiation 2002; 9: 493-504

173. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. Arch Immunol Ther Exp 2007; 55: 61–75

174. Xie Z, Cai T. Na+-K+–ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. Mol Interv 2003; 3: 157-168.

175. Nesher M, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein D. The digitalis-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. Life Sciences 2007; 80: 2093–2107

176. Lundquist E A. Small GTPases. WormBook. 2006; 17: 1-18.

177. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4(6): 446-56.

178. Samejima K, Earnshaw WC. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6(9): 677-88

179. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Wood K, Cool CD, Voelkel NF. Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;291(3): L362-8.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Aysun
Soyadı	Özdemir
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara 04.04.1983

Eğitimi

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2002-2006
Ankara Gazi Anadolu Lisesi	1994-2001
Fevzi Atlıoğlu İlkokulu	1989-1994

Yabancı Dili

İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri

TÜBİTAK Yurtiçi Lisansüstü Eğitim Bursu 2006-2008