

T1865



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Biyokimya ve Klinik Biyokimya  
Anabilim Dalı

**KÜLTÜRE EDİLMİŞ RAT AORTİK DÜZ KAS  
HÜCRELERİNDE ANJİYOTENSİN II UYARIMI İLE  
NAD(P)H SİNYAL YOLU ÜZERİNDEN p38 MİTOJEN  
AKTİVELİ PROTEİN KİNAZ (MAPK)  
FOSFORİLASYONUNUN GÖSTERİLMESİ**

**Dr. Serkan ÇAĞLAR**

**Uzmanlık Tezi**

*Akdeniz Üniversitesi  
Rektörlüğü Kütüphanesi*

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.  
(Proje No. 2004.04.0103.003)

Tezinden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir.

**Antalya, 2005**

## TEŞEKKÜR

Eđitim s¼rem boyunca destek ve yardımlarını benden esirgemeyen basta danışman hocam olmak üzere tüm Biyokimya A D. Öğretim Üyelerine, onlarla çalışmaktan zevk aldığım tüm asistan arkadaşlarıma ve tez çalışmalarım boyunca çalıştıkları ortamı bizimle paylaşan Merkez Araştırma Laboratuvarı ve Histoloji Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkür eder çalışma hayatları boyunca başarılar dilerim.

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Vasküler düz kas hücreleri ve Anjiyotensin II	4
2.2. Anjiyotensin II	6
2.2.1. Anjiyotensin II'nin Tarihçesi	6
2.2.2. Anjiyotensin II'nin Yapısı ve Biyosentezi	6
2.2.3. Anjiyotensin II'nin Reseptörleri ve Hücresele Fonksiyonları	9
2.2.4. Anjiyotensin II'nin Vasküler Etkileri	11
2.2.5. Anjiyotensin II-Bağımlı Sinyal İletim Yolları	12
2.3. Reaktif Oksijen Radikalleri (Reaktive Oxygen Species, ROS)	16
2.3.1. ROS ve Metabolizması	16
2.3.2. Enzimatik Olarak Süperoksit Üretimi	18
2.3.3. VDKH'leri Üzerine ROS'un Etkileri	20
2.4. Mitojen Aktivele Protein Kinazlar (MAPK)	23
2.4.1. MAP Kinazların Özellikleri ve Düzenlenmeleri	23
2.4.2. p38 MAPK	24
2.4.3. p38 MAPK Yolunun Üst Basamak Düzenlenmesi	26
2.4.4. p38 MAPK Aktivasyonunun Alt Basamak Etkileri	27
2.4.4. MAPK Fosfatazlar Tarafından Stres Kinaz Yollarının Fizyolojik İnaktivasyonu	30
GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Materyal ve Kimyasal Malzemeler	32
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	32
3.1.2. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	33
3.2. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu	34
3.2.1. Transfer Medyumunun Hazırlanması	34
3.2.2. Vasküler Düz Kas Hücre İzolasyon Yöntemi	35
3.3. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü	35
3.3.1. Enzim Ayrışma Solüsyonunun Hazırlanması	35

3.3.2. Medyum (Besi Yeri) Hazırlanması	36
3.3.3. Düz Kas Hücre Kültürü Metod	37
3.3.4. Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon)	38
3.3.5. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi	39
3.4. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	39
3.4.1. İmmünohistokimya Preparatları Üzerine Hücrelerin Stabilizasyonu	39
3.4.2. İmmünohistokimyasal Karakterizasyon Çalışma Prosedürü	41
3.5. Kültüre Edilmiş VDKH'nin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması	42
3.5.1. Lizis (Triton X-100) Tamponunun Hazırlanması	42
3.5.2. PBS (Fosfat Tamponlu Salin, 10X Konsantre)	42
3.5.3. VDKH Üzerine Kullanılan Aktivatörler	43
3.5.4. VDKH Üzerine Kullanılan İnhibitörler	43
3.5.5. Lizat Hazırlama Metodu	44
3.6. Lizatların Protein Miktarının Tayin Edilmesi	45
3.6.1. Bradford Protein Ölçüm Yönteminin Prensipleri	45
3.6.2. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğin Hazırlanması	45
3.6.3. Numunelerin Protein Miktar Tayini	46
3.7. p38 MAPK Fosforilasyonunun SDS-PAGE ve Western İmmünoBlot Analizi	46
3.7.1. SDS-PAGE Solüsyonlarının Hazırlanması	47
3.7.2. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması	48
3.7.3. Elektroforez Çalışma Tamponu	50
3.7.4. Elektroforez Yapılacak Numunelerin Hazırlanması	50
3.7.5. Elektroforez İşleminin Yapılması	51
3.7.6. Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması	51
3.7.7. Membranların Antikor ile İşaretlenmesi	53
3.7.8. Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması	55
3.7.9. Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi	56

## BULGULAR

4.1. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Olarak Karakterizasyonu	57
4.2. Kültüre Edilmiş Vasküler Düz Kas Hücrelerinin Canlılık Oranı	59
4.3. p38 MAPK Fosforilasyonunun Western Blot ile Gösterilmesi	59
4.3.1. VDK Hücrelerinde Ang II Uyarımı Sonucunda Konsantrasyon Bağımlı Şekilde p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu	59

4.3.2. Ang II'nin VDK Hücrelerinde Süre Bağımlı Şekilde p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu	60
4.3.3. Ang II'nin VDK Hücrelerinde AT1 Reseptörü Üzerinden p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu	62
4.3.4. Ang II'nin VDK Hücrelerinde Hem NADPH Oksidaz Hem de MAPK Üzerinden p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu	63
4.3.5. Ang II'nin VDK Hücrelerinde Sadece NADH/NADPH Oksidaz Üzerinden p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu	65
<b>TARTIŞMA</b>	<b>68</b>
<b>SONUÇLAR</b>	<b>76</b>
<b>ÖZET</b>	<b>78</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>80</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ACE</b>	Angiotensin Converting Enzyme
<b>AEC</b>	Amino Etil Karbizol
<b>Ang I</b>	Anjiyotensin I
<b>Ang II</b>	Anjiyotensin II
<b>Ang III</b>	Anjiyotensin III
<b>Ang IV</b>	Anjiyotensin IV
<b>APS</b>	Amonyum Per sülfat
<b>BCA</b>	Bisinkoninikası
<b>bFGF</b>	Temel fibroblast büyüme faktörü (basic Fibroblast Growth Factor)
<b>BMK</b>	Büyük MAP kinaz (Big MAP kinase)
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum
<b>cGMP</b>	Siklik Guanozin Monofosfat
<b>DAG</b>	Diçil Gliserol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>EAS</b>	Enzim Ayırışma Solüsyonu
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence
<b>ECM</b>	Ekstraselüler Matriks
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
<b>EGFR</b>	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>EGTA</b>	Etilenbis-(oksietilennitrilo)-tetraasetikasit
<b>ERK 1/2</b>	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2 (Extracelluler Signal Regulated Kinase 1/2)
<b>ET-1</b>	Endotelin 1
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>GDP</b>	Guanozin difosfat
<b>GRK</b>	G protein Reseptör Tirozin Kinaz
<b>GTP</b>	Guanozin Trifosfat
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salt Solution

<b>HRP</b>	Horse - Radish Peroxydase
<b>HSP</b>	Heat - Shock Protein
<b>IGF-1</b>	İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1 (Insulin-like Growth Factor-1)
<b>IL-6</b>	İnterlökin 6 (interleukin 6)
<b>IP3</b>	İnositol Trifosfat
<b>JNK</b>	c- Jun N-terminal Kinazlar
<b>MAP2</b>	Mikrotübül-ilişkili protein-2 (Microtübül-Associated Protein 2)
<b>MAPK</b>	Mitojen Aktive edici Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
<b>MBP</b>	Miyelin Temel Protein (Miyelin Basic Protein)
<b>MCP-1</b>	Makrofaj Kemoatraktant Protein 1 (Macrophage Chemoattractant Protein 1)
<b>MKK</b>	MAPK Kinazlar, MEK
<b>MKKK</b>	MAPK Kinaz Kinaz, MEKK
<b>MKP-1</b>	MAPK Fosfataz-1 (MAP Kinase Phosphatase-1)
<b>NaF</b>	Sodyum Florid
<b>Na-o-Va</b>	Sodyum orto-Vanadat
<b>oxLDL</b>	Okside düşük yoğunluklu Lipoprotein (Oxide Low Density Lipoprotein)
<b>PAK</b>	p21 Aktive edici Kinaz (p21-Activated Protein Kinase )
<b>PDGF</b>	Trombosit-türevli büyüme faktörü (Platelet-Derived Growth Factor )
<b>PKC</b>	Protein Kinaz C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipaz A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipaz C
<b>PLD</b>	Fosfolipaz D
<b>PMSF</b>	Fenilmetansulfonilflorid
<b>PtdIns</b>	Fosfotidil İnozitol
<b>PYK2</b>	Prolinden zengin tirozin kinaz 2
<b>RAS</b>	Renin Anjiyotensin Sistemi
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
<b>SAPK</b>	Stres Aktive edici Protein Kinazlar (Stress- Activated Protein Kinase)

<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>Sos</b>	Son-of-sevenless
<b>STI</b>	Soya Tripsin İnhibitör
<b>TAK</b>	TGF- $\beta$ aktive edici kinaz (TGF- $\beta$ Activated Kinase)
<b>TAO</b>	Thousand and one amino acid kinase
<b>TBS</b>	Tris Buffer Salin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforme edici büyüme faktörü $\beta$ (Transforming Growth Factor $\beta$ )
<b>VDKH</b>	Vasküler Düz Kas Hücresi
<b>VSMC</b>	Vascular Smooth Muscle Cell



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1.1. Ang II'nin vasküler yapılar üzerine etkileri	5
2.2.1. Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması	7
2.2.2. Ang II'nin hücre içi sinyal iletim yollarındaki rolü	14
2.3.1. VSMC üzerine ROS'un etkileri	17
2.3.2. ROS'un kaynakları ve hücresel etkileri	21
2.4.1. Memeli MAPK Sinyal Yollarının Şematik Gösterimi	25
3.7.1. Protein Standart Grafiği	45
4.1.1 Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	58
4.3.1. Ang II'nin farklı konsantrasyonlarının VDKH'lerinde p38 MAPK üzerine etkisi	60
4.3.2. Ang II'nin VDKH kültürlerinde farklı sürelerde p38 MAPK aktivasyonları	61
4.3.3. VDKH kültürlerinde AT1 Reseptörünün Rolü	63
4.3.4. VDKH kültürlerinde p38 MAPK aktivasyonunda Ras'ın rolü	64
4.3.5. VDKH kültürlerinde p38 MAPK aktivasyonunda NADH/NADPH oksidaz'ın rolü	66

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.4.1. p38 MAPK'nın Vasküler Düz Kas Hücrelerindeki Etkileri	28
2.2.2. p38 MAPK'nın Substratları ve Sonraki Hedef Proteinler	29
3.3.1. Enzim Ayrışma Solüsyonu Bileşenleri ve Miktarları	35
3.7.1. Ayrışma ve Yükleme Jeli Tamponu ve Miktarları	47

## GİRİŞ ve AMAÇ

Hücre membran reseptörlerinden hücre içindeki proteinlere bilgi transferi “hücre içi sinyal iletim yolu” adı verilen birbirine bağlanmış moleküller tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücre bu şekilde kasılma, büyüme, mitogenez, apoptozis, farklılaşma, migrasyon ve diğer spesifik fonksiyonlarını düzenlemektedir. Vasküler düz kas hücre (VDKH; vascular smooth muscle cell, VSMC)’lerinin hem fizyolojik hem de patofizyolojik olarak düzenlenme mekanizmalarının anlaşılması için sinyal iletim yollarının belirlenmesi gereklidir (1).

Anjiyotensin II (Ang II), renin-anjiyotensin sistemi (RAS)’nin aktif bir bileşeni olan oktapeptid yapıda bir hormondur (1). Güçlü bir vazokonstriktör olan Ang II kan basıncını, sodyum ve su dengesini, nöronal fonksiyonları ve nörohumoral sistemi düzenler. Ang II ile ilgili ilk araştırmalar onun hipertansiyon potogenezinde ki rolüne odaklanmıştı, fakat son yıllardaki artmış kanıtlar bu oktapeptidin ateroskleroz, miyokard infarktüsü, vasküler ve miyokardiyal remodeling ile konjestif kalp yetmezliğinin gelişmesinde de rol oynadığını gösterdi (2). AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, AT<sub>3</sub> ve AT<sub>4</sub> olmak üzere dört reseptörü bulunan Ang II’nin bir çok etkilerini AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden gerçekleştirdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, AT<sub>1</sub> reseptörlerinin VDKH’lerinde çok sayıda, adventisyada düz kasa oranla daha düşük seviyede ve endotelyumda ise saptanamayacak oranda az olduğu bulunmuştur (1). AT<sub>1</sub> reseptör aktivasyonu vazokonstriksiyon, su ve tuz dengesi ve diğer nörohumoral sistemlerin kontrolüne neden olmanın yanında reaktif oksijen örnekleri (ROS) üretimi, hücrel hipertrofi, hücrel hiperplazi ve apoptozise de neden olur (2).

Ang II’nin vasküler etkilerinin tümü 7 transmembran heliksinden oluşan G proteinine bağımlı AT<sub>1</sub> reseptörü aracılığıyla ortaya çıkmaktadır (3). Ang II’nin AT<sub>1</sub> reseptörlerine bağlanarak aktive ettiği heterotrimerik G proteinleri, intrinsek tirozin kinaz aktivitesinden yoksun olmasına rağmen; tirozin kinaz inhibitörleri ile

yapılan çalışmalar, Ang II'nin etkileri için serin ve treonin üzerinden tirozin fosforilasyonunun gerektiğini göstermiştir (1, 4,5)

Ang II'nin VDKH'leri üzerinde AT<sub>1</sub> reseptörü aracılığıyla farklı sinyal iletim yollarını kullanarak p38 mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyal iletim yolunu aktive ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (1,3,6). Yapılan çalışmalarda Ang II ile uyarım sonrasında hemen işleyen sinyal iletiminde G proteinleri üzerinden tirozin kinazların ve tam kanıtlanmış olmamakla beraber fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ile fosfolipaz D (PLD)'nin NAD(P)H oksidaz sistemini aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan NAD(P)H oksidaz sisteminin ROS üreterek p38 MAPK'ı aktive ettiği gösterilmiştir (1,2,3,6).

Ang II ile uyarım sonrası VDKH'lerinde AT<sub>1</sub> reseptörleri üzerinden G proteinleri aktive olduktan sonra Src adı verilen adaptör bir protein aktive olur. Bu da gelişme faktörü bağlayıcı protein olan Grb2 üzerinden sos'u aktive eder. Sos ise Ras üzerindeki GDP-GTP değişimini katalizleyen bir guanin nükleotid değiştirici faktördür. Ras, sinyal transdüksiyonunda merkezi bir oyuncudur. Ras'ın belkide en iyi karakterize edilmiş efektörü MAP kinaz yoluna öncülük eden Raf'tır. Raf'ın bu şekilde aktivasyonu *in vivo* ortamda MEK'i (MAP/ERK kinaz) fosforile eder. MEK'ler tirozin ve treonin birimleri üzerinden fosforile edilerek aktive olurlar. MEK'lerin aktivasyonunda MAPK'ları aktive eder. Bu şekilde aktif hale geçen MAPK hücre proliferasyonunda rol alan çeşitli enzimleri ve nükleer proteinleri fosforile eder (1,7).

Şu ana kadar yapılan çalışmalar Ang II'nin AT<sub>1</sub> reseptörü yoluyla hem NAD(P)H oksidaz üzerinden ROS üretimi yoluyla hem de Ras-MAPKKK (Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz Kinaz) yolu üzerinden p38 MAPK'ı fosforile ettiği gösterilmiştir (1). Ancak NAD(P)H oksidaz sisteminin hangi etki mekanizması ile AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden aktive olduğu kesin olarak anlaşılamamıştır (1).

Bu çalışmanın amacı, kendi laboratuvar şartlarımızda primer olarak kültüre edilmiş vasküler düz kas hücrelerinde Ang II uyarımı altında p38 MAP kinazın aktivasyonunda rol alan NAD(P)H oksidaz ve Ras'ın rolünü belirlemektir. Bunun için önce primer kültürü yapılmış vasküler düz kas hücreleri süre ve doz bağımlı olarak Ang II ile uyarıp p38 MAPK yolunun fosforilasyonu izlenmiştir. Bu sayede Ang II'nin p38 MAPK'ı aktive eden en iyi konsantrasyon ve süre bulunmuştur. Ang II'nin bu etkilerinin AT<sub>1</sub> reseptörleri üzerinden olduğunu göstermek amacıyla hücreler AT<sub>1</sub> selektif inhibitörü losartan ile baskılanmış ve Ang II uyarımının AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden olduğu gösterilmiştir.

Daha sonra p38 MAPK fosforilasyonu üzerine NAD(P)H oksidaz rolünü belirlemek için VDKH'leri daha önce literatürde belirtilen süre ve konsantrasyonda NAD(P)H oksidaz sistemi inhibitörü difenileniyodonyum (DPI) ile inkübe edilip etkileri ortaya konmuştur. En son olarak da Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK fosforilasyonunun Ras üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya koymak için VDKH'leri uygun süre ve konsantrasyonda Ras inhibitörü farnesiltiyosalisilik asit (FIS) ile inkübe edilip etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür bilgisi dahilinde incelenip yorumlanmıştır.

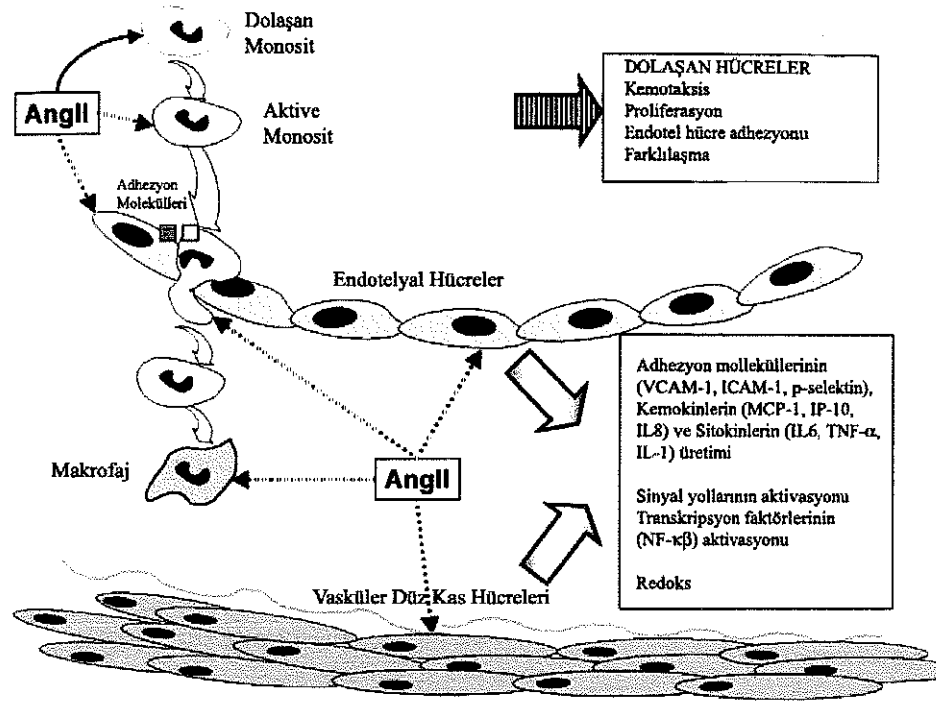
## GENEL BİLGİLER

### 2.1.Vasküler Düz Kas Hücreleri ve Anjiyotensin II

Vasküler duvar, hücresele (endoteliyal hücreler, vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar) ve hücresele olmayan (ekstraselüler matriks) bileşenlerden oluşmuş esnek ve aktif bir organdır (1). Vasküler duvar fizyolojik ve patofizyolojik uyarılara cevap olarak bileşenlerini arttırma, azaltma veya yeniden yapılandırma şeklinde değişikliğe uğrayan bir organdır (8) Vasküler düz kas hücre (VDKH; vascular smooth muscle cell; VSMC)'leri farklı büyüme faktörlerine cevap verebilme açısından tüm hücreler arasında en esnek hücrelerdir (9). Sağlam arterial media, düz kas hücreleri ve matriks; kasılma-gevşeme, büyüme, gelişme, yeniden düzenlenme veya onarım gibi damar duvarının birçok yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden ve aterosklerozis, restenoz veya hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıkların patogenezesinden sorumludur (10-13). Birçok lokal ve sistemik faktör düz kas hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlemektedir. Anjiyotensin II (Ang II) ve endotelin 1 (ET-1) gibi vazoaaktif peptidler vazokonstriksiyonu ve büyümeyi uyarırken, nitrik oksit, prostasiklin ve natriüretik peptid tip-C gibi vazorelaksasyon faktörleri siklik nükleotid düzeylerini arttırarak vazodilatasyona neden olurlar (14,15,16).

Multifonksiyonel bir peptid olan Ang II'nin, vasküler düz kas hücreleri üzerinde birçok etkileri vardır (Şekil 2.1.1). Ang II vasküler motor tonusu, hücre büyümesi ve apoptosizi düzenler; hücre göçü ve ekstraselüler matriks depolanmasını etkiler ve proinflammatuvar bir etki gösterir. Ayrıca Ang II, diğer büyüme faktörleri (platelet kökenli büyüme faktörleri gibi) ve vazokonstriktörlerin (ET 1 gibi) üretimini uyaran bir peptiddir (1).

Ang II, damar duvarın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün kontrolünde temel rol oynamaktadır ve vasküler hastalıkların altında yatan patolojik mekanizmaları ile damar basıncının fizyolojik düzenlenmesinde önemli bir rol



**Şekil 2.1.1.: Ang II'nin vasküler yapılar üzerine etkileri.** Ang II damarsal yapılarda endotelial hücreler, vasküler hücreler ve doku içinde bulunan makrofajlar üzerine bir çok etkileri vardır. Ang II ayrıca dolaşan hücrelerin kemotaksisi, proliferasyonu, adhezyonu ve farklılaşmasına da katkıda bulunur. Ang II hem endotelial hem de VDK hücrelerinde adhezyon moleküllerinin, kemokinlerin ve sitokinlerin üretimini artırır ve sinyal iletim yollarını aktive eder (17).

üstlenmektedir. Ang II'nin çok yönlü etkileri spesifik reseptörler aracılığıyla olmaktadır. Son derece karmaşık hücre içi sinyal yolları Ang II'nin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını takiben uyarılmaktadır (1). Hücre içi sinyal iletim yolu; bilginin hücre membranı reseptöründen hücre içi proteinlere iletilmesini sağlayan moleküler yollarının birbirleri ile birleşmesini sağlayarak kasılma, hücre büyümesi, mitojenez, apoptozis, farklılaşma, migrasyon ve diğer özelleşmiş hücre fonksiyonlarını düzenler (1). Sinyal iletim yollarının tanımlanması VDKH'nin fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlarının düzenlenme mekanizmalarının anlaşılması için önemlidir (1).

## 2.2. Anjiyotensin II

### 2.2.1. Anjiyotensin II'nin Tarihçesi

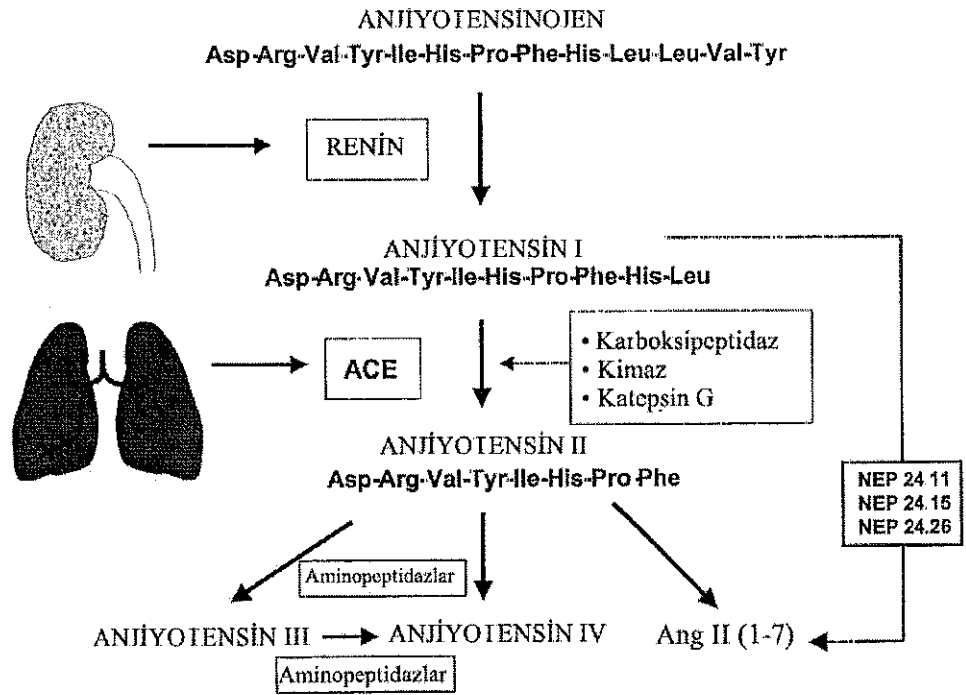
Braun-Menendez ve arkadaşları 1940 yılında, Goldblatt türü hipertansif bir köpeğin iskemik böbreğinin renal venöz kanından vazokonstriktif bir madde izole ettiler. Yine aynı zamanda ve bağımsız olarak Page ve Helmer tarafından sağlam hayvanlara renin enjeksiyonundan sonra benzer bir bulgu ortaya kondu. Bu grup daha sonra anjiyotensinojen olduğu kanıtlanan "renin aktivatörü" olarak adlandırdıkları bir madde izole ettiler. Daha sonra bir oktapeptid olarak izole edilen bu basınç maddesi Arjantin'de "hipertensin" Amerikada ise "anjiotonin" olarak adlandırıldı. Braun-Menendez ve Page 1958 yılında, çok güçlü bu basınç oktapeptidi için melez bir adlandırma olan anjiyotensin üzerinde görüş birliğine vardılar. Bu büyük buluştan sonra anjiyotensinojen, anjiyotensin dönüştürücü enzim (Angiotensin converting enzyme, ACE) ve anjiyotensin I, II ve III gibi ang II'nin oluşumuna yol açan kaskadın çeşitli bileşenleri tanımlandı (18). 1954 yılında Peart ve arkadaşları ile Skeggs ve arkadaşları Ang II'nin yapısını ve onun Ang I ile ilişkisini tanımladılar (19). 1990'ların başlarında Ang II'nin vasküler proinflatuar ve proliferatif etkileri gösterilmiştir. Son dönemlerdeki hızlı ilerlemeler bu işlemi daha anlaşılabilir hale getirmiştir (20).

### 2.2.2. Anjiyotensin II'nin Yapısı ve Biyosentezi

Renin anjiyotensin sistemi (RAS) temelde renal ve adrenal korteks tarafından sentezlenen hormonların aktif rol oynadığı; sodyum dengesi, ekstraselüler sıvı volümü, potasyum dengesi, arteriyel kan basıncının düzenlenmesi, vasküler tonus ve sempatik sinir sistemi üzerine önemli fonksiyona sahip bir sistemdir (21,22). RAS'ın biyolojik etkileri primer olarak yüksek derecede aktif bir oktapeptid olan Ang II aracılığıyla (22). Ang II, miyokardiyal enfarktüs sonrası miyokardın ve hipertansiyonlu hastalarda damarsal yapıların yeniden düzenlenmesinde (remodeling) temel rol oynamaktadır (1).



Renin, şekil 2.2 1.'de gösterildiği gibi anjiyotensinojenden bir dekapeptid olan anjiyotensin I (Ang I)'in salınımını katalizleyen ve böbreğin jukstaglomerüler hücrelerinden salınan çok spesifik bir proteazdır (23,19). Ang II klasik (renal) yolla sistemik ve doku RAS'ı yoluyla lokal olarak üretilmektedir. Klasik RAS' ta dolaşımda bulunan renal kaynaklı renin, dekapeptid olan Ang I'i oluşturmak için hepatic kaynaklı anjiyotensinojeni N- terminalinden keser. Ang I, akciğerde dipeptidil karboksipeptidaz olan anjiyotensin-konverting enzim (Angiotensin-converting enzyme; ACE) tarafından aktif olan Ang II'ye dönüştürülür (24-27). Ayrıca Ang I, üç doku nötral endopeptidaz (NEP 24 11, NEP 24.15, NEP 24 26) tarafından heptapeptid olan Ang-(1-7)'ye de çevrilebilir (28). Ang II aminopeptidazlar tarafından Ang III ve Ang IV'e yıkılır.



**Şekil 2.2.1: Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması.** Dolaşımdaki renal kökenli renin, hepatic kökenli anjiotensinojeni parçalar ve dekapeptid anjiotensin I (AngI)'i oluşturur. Akciğerdeki ve dokulardaki ACE Ang I'i Ang II'ye dönüştürür. Ang II; Ang III, Ang IV ve Ang II (1-7)'ye metabolize edilir. Kimaz, karboksipeptidaz ve katepsin G gibi bazı non-ACE bileşikler Ang I ve Ang II'yi parçayabilir (1).

RAS temelde bir dolaşım sistemi olarak kabul edilmiştir. Ancak RAS'ın birçok bileşeninin dokularda da varlığı saptanmıştır (29,30). Renin için substrat olan anjiyotensinojen 57,000 dalton molekül ağırlığında % 14 karbonhidrat içeren  $\alpha$ -2 globülin yapısında bir glikoproteindir (21) Karaciğer tarafından sentezlenen anjiyotensinojenin mRNA'sı ve proteini düz kas hücrelerinde, endotel ve perivasküler yağ dokusunda bulunmuştur (23,31,32,33). ACE molekül ağırlığı 140000 dalton ağırlığında olan bir dipeptidil karboksipeptidazdır (21,23). En önemli substratları Ang I ve bradikininidir (23). ACE, enkefalinleri ve substans P'yi de parçalar, fakat bu etkinin fizyolojik önemi ortaya konamamıştır (23). ACE dolaşım enzimi olarak plazmada, intertisyumda ve hücre içinde bulunmaktadır (1). Doku ACE kalp, beyin, adrenal bez, böbrekler, karaciğer, üreme organları ve kan damarları gibi bütün major organlarda bulunmaktadır (34). Ayrıca doku ACE, uterusda da fonksiyoneldir (35,36) ACE dolaşımın her yerinde vasküler endotelial hücrelerin lümenal yüzeyi üzerinde lokalizedir (23). Doku ACE aktivitesi, major organ gelişim sırasında yüksek konsantrasyonda bulunmakta ve daha sonra bu aktivite azalmaktadır (36). Renin hariç, RAS'ın tüm bileşenlerinin damarsal yapılarda üretildiği gösterilmiştir. ACE, kültüre edilmiş vasküler düz kas hücreleri ve endotel hücreleri de olduğu kadar adventisyada da yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (29,37). Vasküler renin olmamasına rağmen, intertisyumda Ang II'nin lokal üretimi doku ACE tarafından düzenlenmektedir. Bu da muhtemelen dolaşımdaki renine bağlıdır. Doku ACE'nin fonksiyonu tam bilinmemesine rağmen bölgesel kan akımının düzenlenmesine katkıda bulunabilir. Son dönemlerde insan ön kolunda yapılan çalışmada gösterildiği gibi *in situ* üretilen Ang II, vazokonstriksiyon için dolaşan Ang II' den daha önemlidir (38).

Ang II oluşumunun ACE bağımlı yollarına ek olarak ACE bağımsız yolların da patolojik durumlarda önemli katkılarına olabileceği gösterilmiştir. Serin benzeri proteaz olan kimotripsinin (kimaz), insan kalp ve böbreğinde Ang I'in Ang II'ye dönüşümü için önemli bir yol olabileceği gösterilmiştir (39,40). Fonksiyonel kimaz ve ACE bağımsız yol insan damar dokusunda (34,41,42) ve köpek karotid arterinde de (42) gösterilmiştir.

### 2.2.3. Anjiyotensin II Reseptörleri ve Hücresel Fonksiyonları

Ang II etkilerini vücutta heterojen olarak dağılmış olan Ang II reseptörleri aracılığıyla gösterir (22). Ang II reseptörleri vücudun bütün hücrelerinin plazma membranları üzerinde bulunur (23). Ang II memeli hücrelerinde  $AT_1$  ve  $AT_2$  olmak üzere en az iki yüksek afiniteli plazma membran reseptörleri aracılığıyla etkilerini gösterebilmektedir (1). Ang II'nin bilinen etkilerinin çoğu  $AT_1$  reseptör alt tipi aracılığıyla (23). Ang II'nin  $AT_3$  ve  $AT_4$  olmak üzere iki alt tipi daha tanımlanmıştır.  $AT_3$  reseptörü başlangıçta sinir kökenli neuroblastoma 2A hücre dizilerinde saptanmıştır (19).  $AT_3$  reseptörü peptide spesifik olarak en çok Ang II'yi tanımakta iken losartan gibi non peptid ligandı (selektif  $AT_1$  reseptör antagonisti) ve PD123319'u (selektif  $AT_2$  reseptör antagonisti) tanımamaktadır. Bu reseptör alt tipi sadece hücre dizilerinde gözlenmiştir.  $AT_4$  reseptörü kalp, akciğer, böbrek, beyin ve karaciğerde dağılmış olarak bulunmaktadır (19). Ang IV,  $AT_4$  reseptör tipine bağlanmaktadır ve  $AT_4$  reseptörü (43) losartan ve PD123319'u tanımamaktadır (23).  $AT_3$  ve  $AT_4$  reseptörleri tam olarak karakterize edilememesinden dolayı bu reseptör tipleri memeli Ang II reseptörlerinin sınıflandırılmasına girmemiştir (18).

$AT_1$  reseptörü yedi transmembran üniteli G proteini kaplı reseptörlerin süper ailesine aittir (2). G proteini yaklaşık olarak 360 amino asitten oluşan ve 41 kDa molekül ağırlığına sahip bir peptittir (23). VDKH'lerinde Ang II  $AT_1$  reseptörüne bağlandığında, tipik olarak heterotrimerik Gq proteini üzerinden inozitol trifosfat [ $I(1,4,5)P_3$ ] ve diaçilgliserol oluşturan fosfolipaz C'yi aktive eder (18,22,23,27). İnsan  $AT_1$  reseptörü 3. kromozomda lokalize olmuştur (22). Bu zamana kadar  $AT_1$  reseptörünün Ang II'nin birçok fizyolojik etkilerine aracılık ettiği ve bu alt tipin Ang II uyarımlı vasküler fonksiyonların kontrolünde baskın rol oynadığı gösterilmiştir (18).  $AT_1$  reseptörleri düz kas hücrelerinde yüksek oranda, adventisyada düz kasa oranla düşük seviyede ve endotelde saptanamayacak düzeyde az bulunur (44,45).

Kemirgen hayvanlarda  $AT_1$  reseptörünün  $AT_{1A}$  ve  $AT_{1B}$  olmak üzere iki tipi tanımlanmıştır. Aminoasit dizi analizleri bakımından bu iki alt tip reseptör yüksek oranda (% 95'ten fazla) birbirine benzerdir (22,46).  $AT_{1A}$  ve  $AT_{1B}$  reseptörleri ratlarda sırasıyla 17 ve 2'inci kromozomda lokalizedir (22).  $AT_{1A}$  reseptörü amino terminalinde ( $Asn^4$ ) ve ikinci ekstraselüler halkada ( $Asp^{176}$  ve  $Asn^{188}$ ) ekstraselüler glikozilasyon bölgelerini içeren bir glikoproteindir (47).  $AT_{1B}$  reseptörleri adrenal ve ön hipofiz bezinde ana şekilde eksprese edilirken,  $AT_{1A}$  reseptörleri böbrek, akciğer, karaciğer ve VDKH'lerinde baskın şekilde bulunur (22).

G protein kaplı reseptörlerin internalizasyonu reseptörün fosforilasyonu yoluyla olur ve kısmen kaveola aracılığı ile meydana gelmektedir (48,49). G protein bağımlı reseptörlerin intrinsek tirozin kinaz aktiviteleri olmamasına rağmen serin ve treonin birimlerinden G protein reseptör kinaz (GRK) ailesinin üyeleri aracılığı ile fosforillenmektedir (1).  $AT_1$  reseptörleri hem bazal durumda hem de Ang II uyarımına cevap olarak fosforile edilir. Sitoplazmik kuyruğun  $Thr^{332}$  ve  $Ser^{338}$  arasındaki treonin ve serin birimleri reseptör internalizasyonu için önemlidir.  $AT_1$  reseptörü tirozin birimlerinden de fosforile edilir.  $AT_1$  reseptörü içindeki potansiyel tirozin fosforilasyon alanları karboksi terminali içindeki 302, 312, 319 ve 339 amino asitlerini içerir (48). Janus kinazları (JAK ve TYK), Src ailesi kinazları ve fokal adhezyon kinaz (FAK)'ı içeren çeşitli tirozin kinazlar  $AT_1$  reseptörlerini tirozinden fosforile edebilir (1).

Ang reseptörünün ikinci major izoformu olan  $AT_2$ , fetal dokularda yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir ve doğum sonrası hızla azalmaktadır (22,50).  $AT_2$  reseptörü 7 transmembran heliksinden oluşan G proteinine bağımlı ve 363 aminoasitten oluşan bir reseptördür.  $AT_2$  reseptörü  $AT_{1A}$  veya  $AT_{1B}$  reseptörleri ile aminoasit dizilimi bakımından düşük oranda (%34) benzerlik göstermektedir (22).  $AT_2$  reseptör geni X kromozomu üzerine lokalizedir (1,22). Yetişkinlerde  $AT_2$  reseptör ekspresyonu pankreas, kalp, böbrek, böbreküstü bezleri, beyin, vasküler yapılar ve üreme dokularında saptanabilir (22,51,52).  $AT_2$  reseptörü vasküler yapıların adventisya tabakasında baskın olarak bulunmakta iken media

tabakasında da az oranda saptanabilir (53).  $AT_2$  reseptörünün tüm sinyal iletim yolları ve fonksiyonel rolleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu reseptörlerin, intraselüler katyonların düzenlenmesi (özellikle sodyum) (44), hücre büyümesinin inhibisyonu, vazodilatasyon ve apoptozisin uyarılması ile (54-58)  $AT_1$  aracılı fizyolojik etkileri antagonize edebileceği olası görünmektedir (59,60).  $AT_2$  reseptörünün kardiyovasküler hastalıklardaki kesin rolü tanımlanamamıştır.

#### **2.2.4. Anjiyotensin II'nin Vasküler Etkileri**

Ang II, doğrudan vasküler hücrelerde bulunan Ang II reseptörleriyle, dolaylı yoldan diğer faktörlerin salınımı ile etkilerini göstermektedir. Ayrıca hücre içi sinyal iletim yollarını etkileyerek vazoaaktif ajanların ve büyüme faktörlerinin seviyelerini arttırmaktadır. Düz kas hücrelerinin birincil fonksiyonu vazokonstriksiyon olmasına rağmen, son kanıtlar VDKH'lerinin gelişme ve vasküler yeniden düzenlenme boyunca önemli sentez özelliklerine sahip olduğunu ve vasküler media tabakasının hücre dışı matriks bileşenlerinin major bir kaynağı olduğunu göstermiştir (12). Kan damarlarının gelişimi süresince olgunlaşmamış olan düz kas hücreleri proliferasyon ve migrasyon ile karakterize büyüme ve farklılaşmada dinamik bir durumdadır (1). Olgun damarlarda VDKH'leri sessiz ve fibroblast benzeri bir görünümde olurlar ve kontraktil liflerle dolmaya başlarlar (1). Olgun düz kas hücreleri yaralanma ya da hareket meydana gelinceye kadar sessiz kalmalarına rağmen, yük artışına cevap olarak fizyolojik hipertrofiye uğrarlar (12). Ang II, bu gelişim süreci boyunca  $AT_1$  ve  $AT_2$  reseptörü aracılığı ile rol oynamaktadır. Bu reseptörler normal gelişim ve patolojik süreçler boyunca vasküler düz kas hücrelerinde farklı oranlarda sentezlenmektedir. Vasküler hastalıklarda düz kas hücreleri adaptasyon veya tepkisel cevap olarak hiperplazi veya hipertrofiye uğrarlar (61,62,63)  $AT_1$  ve  $AT_2$  reseptörleri hipertansiyon, ateroskleroz ve neointimal formasyon ile ilişkili olarak vasküler yeniden düzenlenmede kritik bir rol oynayabilir. Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II reseptör alt tiplerinin her ikisi de hasara cevap için gereklidir (64).

Ang II'ye ait bütün vasküler cevaplar, hem AT<sub>1</sub> ve AT<sub>2</sub> aracılı etkilerin toplamı hem de Ang-(1-7) gibi RAS'ın biyoaktif son ürünlerinin etkileri ile sonuçlanmaktadır. Ang II, AT<sub>1</sub> reseptörü aracılığı ile vazokonstriksiyon, büyüme, migrasyon, ekstraselüler matriks bileşenlerinin üretimini ve inflamasyonu uyarırken, AT<sub>2</sub> reseptörü aracılığıyla proliferasyon ile hipertrofinin inhibisyonuna ve apoptozis'e katkıda bulunmaktadır (45,59) Ang-(1-7), Ang II'nin doğal olarak meydana gelen kompetitif bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır ve güçlü vazodepressör ve antihipertansif etkilerine sahiptir. Ang-(1-7), uyarıcı bir nörotransmitter olarak vazopressinin salınımını stimüle eder, vazodilatatör prostaglandinlerin salınımı ve sentezini artırır, bradikinin etkilerine ve nitrit oksitin salınımına katkıda bulunur (28). Bunlara ilaveten ACE inhibitörleri ve vazodilatatör peptidlerin dolaşımdaki seviyelerini artırır. Bu da ACE inhibitörleriyle bağlantılı olan antihipertansif etkilere katkıda bulunabilir (65,66). Ang-(1-7)'nin reseptör aracılı vasküler etkileri kesin olmamakla birlikte AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> alt tipleri üzerinden değildir (28). Bu peptidin vasküler fonksiyonunun düzenlenmesindeki fizyolojik ve patofizyolojik rolü kesin olarak bilinmemesine rağmen, AT<sub>1</sub> aracılı etkileri antagonize edebildiği iddia edilmektedir. Bu da Ang-(1-7)'nin vazodilatasyonu artırarak vasküler tonusu düzenlediğini desteklemektedir (1)

### 2.2.5. Anjiyotensin II-Bağımlı Sinyal Yolları

Ang II, kontraksiyon gibi kısa zamanlı vasküler etkilere ve hücre büyümesi, migrasyon, ekstraselüler matriks depolanması, inflamasyon gibi uzun zamanlı biyolojik etkilere yol açan son derece kompleks hücre içi sinyal iletim yollarının düzenlenmesini sağlar. Hücre membranının dış yüzeyindeki ligand-reseptör bağlanması, hücre membranının iç yüzeyinde ki G proteinleri aracılığı ile ( $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt ünitelerinden oluşmuş heterotrimerik proteinler) reseptör ve efektör proteinin etkileşimine neden olmaktadır. AT<sub>1</sub> aracılı sinyal iletim yolları farklı zamanlara ait özelliklerine göre ani, erken ve geç olarak sırasıyla saniyeler, dakikalar ve saatler içinde gelişen olaylar şeklinde (multifazik) meydana gelmektedir. Ang II indüklü fosfolipaz C (PLC) ve Src aktivasyonu saniyeler

içinde ani sinyal iletim olayları olarak, fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), fosfolipaz D (PLD), tirozin kinazlar ve mitojen aktiviteli protein kinazlar erken sinyal iletim olayları olarak meydana gelirken, oksidatif stres oluşumu, proto-onkogen ekspresyonu ve protein sentezi saatler içinde gelişen geç sinyal olayları olarak oluşmaktadır (1).

### **Anjiyotensin II-Uyarımlı Ani Sinyal İletim Olayları**

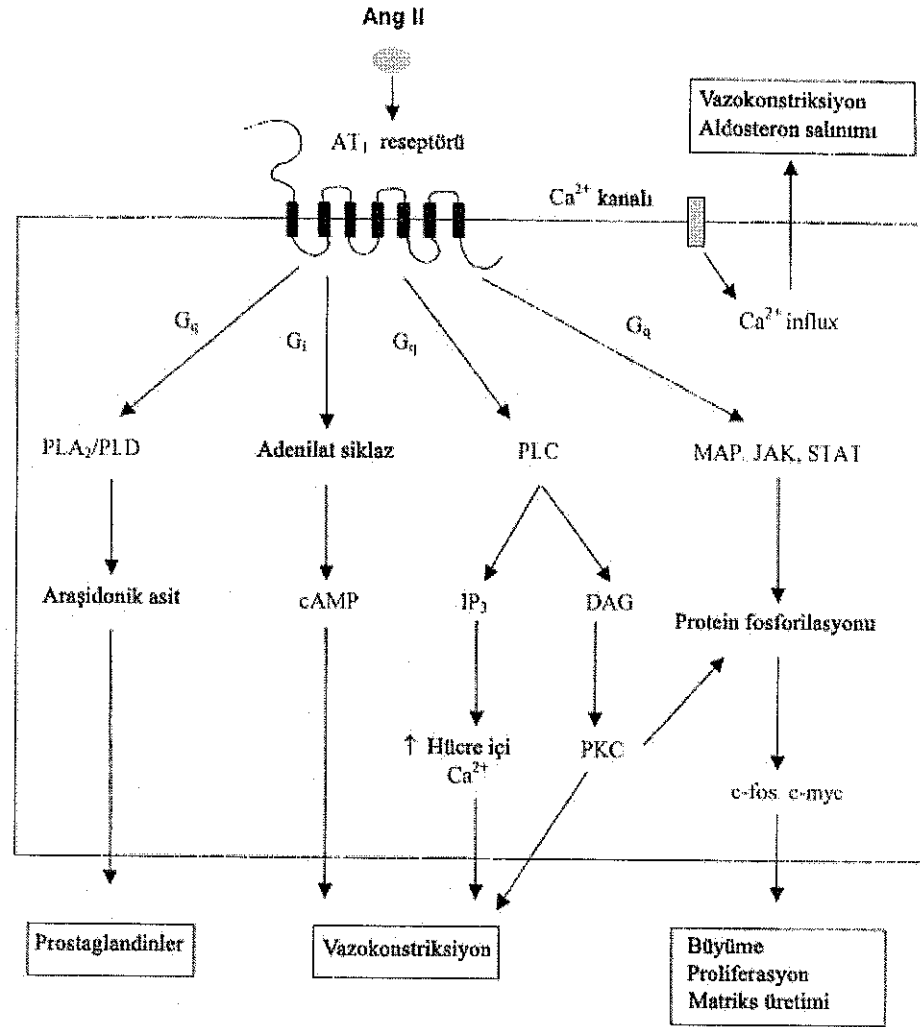
Ang II'nin neden olduğu vasküler kontraksiyon hızlıdır ve Ang II'nin reseptörüne bağlanmasıyla saniyeler içerisinde oluşan çeşitli sinyal iletim yollarını kullanır. Bu ani oluşan sinyal iletim yolları (Şekil 2.2.2.):

- a) G proteinleri aracılığıyla PLC aktivasyonu, fosfatidil inositolün hidrolizi ve bu yolla inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) ve diaçilgliserolün (DAG) oluşumu;
- b) serbest kalsiyumun (Ca<sup>+2</sup>) hücre içine akması ve hücre içi Ca<sup>+2</sup> mobilize olması ile sitosolik serbest Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunun artması;
- c) protein kinaz C (PKC)'nin aktivasyonu;
- d) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pompasının uyarılması ile hücre içi pH'nın değişmesi;
- e) hücre içi serbest Na<sup>+</sup> ve Mg<sup>++</sup>'un değişmesi ve
- f) Src ailesi kinazların aktivasyonudur (1)

### **Anjiyotensin II-Uyarımlı Erken Sinyal İletim Olayları**

Kasılma ile ilişkili hızlı sinyal olaylarına ilaveten AT<sub>1</sub> reseptörleri büyüme migrasyon, ekstraselüler matriks depolanması, büyüme faktörlerinin üretimi gibi VDKH'lerinin uzun dönem fonksiyonunun düzenlenmesi ile ilişkili bir çok hücre içi sinyal iletim yollarını birbirine bağlar. Ang II uyarımından sonra dakikalar içinde başlayan sinyal iletim yolları şunlardır:

- a) Tirozin kinazların fosforilasyonu (janus ailesi kinazlar, fokal adhezyon kinaz ve prolinden zengin tirozin kinaz-2, p130<sup>Cas</sup>, fosfatidil inozitol 3-kinaz);
- b) MAPK'ların aktivasyonu;
- c) PLA<sub>2</sub> ve araşidonik asit metabolizmasının aktivasyonu;
- d) PLD aktivasyonu ve
- e) siklik nükleotidlerin düzenlenmesi (1).



Şekil 2.2.2: Ang II'nin hücre içi sinyal iletim yollarındaki rolü. Ang II AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden G proteinlerini uyarır. G proteinleri de değişik alt birimleri ile değişik hücre içi sinyal iletim yollarının aktivasyonuna neden olur. G<sub>q</sub> alt birimi aracılığı ile PLA<sub>2</sub>, PLD, PLC, MAP, JAK ve Stat sinyal iletim yolları aktive olurken G<sub>i</sub> alt birimi üzerinden adenilat siklaz aktive olur (21).

### Anjiyotensin II-Uyarımlı Uzun Süreli Sinyal İletim Yolları

Ang II damarsal yapılar ve kalp içindeki hücreler arası matris depolanmasına ilaveten hücreSEL büyüme, adhezyon ve migrasyonun uzun dönem kontrolünde etkilidir. Böylece aterosklerozda meydana gelen işlemlere ek olarak



vasküler yeniden düzenlenme ve kalp hipertrofisinde kronik adaptif değişiklikleri etkiler. Uzun dönem Ang II sinyalinin temelini oluşturan hücre içi kaskadlar değişik kinazların aktivasyonuna neden olur. Bu da kronik ve devamlı hücre fonksiyonların düzenlenmesini sağlayan alt basamak hedefleri fosforile eder. Redoks duyarlı yolların uyarılması, proto-onkogen ekspresyonunun indüksiyonu, tirozin kinaz reseptörleri ile etkileşim, diğer büyüme faktörlerinin üretimi ve nükleer sinyal kaskadların uyarılması eninde sonunda hücre büyüme ve farklılaşma ile sonuçlanır (1). Ang II, VDKH kültürlerinde protein sentezini uyararak hücre hipertrofiye neden olur (62, 67) ve diğer büyüme faktörleri gibi, VDKH kültürlerinde hiperplaziyi indükleyebilir (68). Ayrıca Ang II'nin VDKH hücre göçünü aktive ettiği gösterilmiştir (69).

Ang II sitokinler ve kemokinler, makrofaj kemoatraktant protein 1 (macrophage chemoattractant protein 1; MCP-1), interlökin 6 (interleukin 6; IL-6), transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ; TGF- $\beta$ ), trombosit kökenli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor; PDGF), insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (insulin-like growth factor; IGF-1), temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor; bFGF) ve epidermal büyüme faktörü ailesi (epidermal growth factor; EGF) gibi çeşitli büyüme faktörlerini indükler (Şekil 2 1 1). Bu faktörler VDKH proliferasyonu ve migrasyonu artırır ve inflamasyonun ortadan kaldırılmasına yardımcı olur (70). IL-6 matris metalloproteinazların aktivasyonu ile ilişkili olmasına karşın (71) Ang II uyarımı sonrasında VDKH'lerinde matris proteinazlar üzerine direkt etkileri olduğu rapor edilmiştir (70).

Ang II bunun dışında, ekstraselüler matris (ECM) bileşimindeki değişiklikleri tetikler. ECM'nin kontraktil düz kas hücre sentezi az miktardadır fakat vasküler yeniden düzenlenme esnasında elastin, kollajen ve fibronektin sentezi önemli bir miktarda artmaktadır. İlginçtir ki ekstraselüler ortamdaki bu değişiklikler VDKH'lerinde proliferasyonu ve migrasyonu desteklemektedir (70).

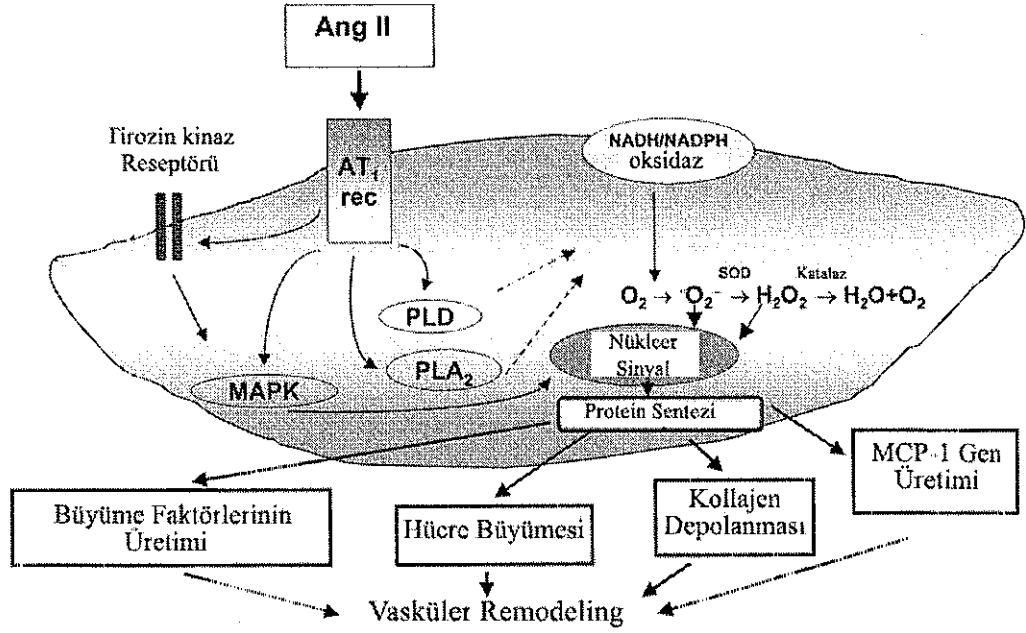
## 2.3. Reaktif Oksijen Radikalleri (Reactive Oxygen Species, ROS)

### 2.3.1. ROS ve Metabolizması

Şimdiye kadar biriken kanıtlar oksidatif stresin hiperlipidemi, diyabetes mellitus, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı ve kronik kalp yetmezliği gibi hastalıklarla ilişkili olan kardiyovasküler fonksiyon bozukluğunun başlaması ve ilerlemesinde major bir rol oynadığını göstermektedir. Oksidatif stres, endojen antioksidan sisteme karşı reaktif oksijen radikallerinin artması ile meydana gelen bir durumdur. ROS damarsal yapılarda her bir hücre tipi üzerinde farklı fonksiyonel etkilere sahiptir ve hem fizyolojik hem de patofizyolojik roller oynayabilir (72).

Süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen örnekleri, hücreler arası ve hücre içinde ikinci mesajcı olarak etki ederek fizyolojik (vasküler tonus ve hücre büyümesi) ve patofizyolojik (inflamasyon, iskemi-perfüzyon, hipertansiyon ve ateroskleroz) bir rol oynayabilir. (6,73). Ksantin oksidaz, mitokondriyal oksidaz ve araşidonik asit nonvasküler dokularda oksidatif moleküllerin major kaynaklarıdır. Halbuki mitokondri dışında membranla ilişkili NAD(P)H oksidaz vasküler hücrelerde süperoksit anyonunun önemli bir kaynağı olduğu görülmektedir (74).

Bu enzim elektronları NADH yada NADPH'tan moleküler oksijene transfer eder ve süperoksit anyonu oluşturur (şekil 2 3.1). Vasküler oksidazın tam molekül yapısı bilinmemekle birlikte nötrofil oksidaz ile benzer özellikler gösterir. Nötrofillerde NAD(P)H oksidaz beş alt üniteden oluşur: 22-kDa'luk bir  $\alpha$ -alt ünitesi ( $p22^{phox}$ ); gliserolize 91-kDa'luk bir  $\beta$ -alt ünitesi ( $gp91^{phox}$ ) (bu ikisi birlikte sitokrom  $b_{558}$ 'i oluşturur, elektron transfer elementi); sitozolik bileşenler  $p47^{phox}$  ve  $p67^{phox}$ ; ve düşük moleküler ağırlıklı G proteini olan rac-1 veya rac-2. Aktivasyon sırasında  $p47^{phox}$  ve  $p67^{phox}$  proteinleri membrana transloke olur ve sitokrom  $b_{558}$  ile ilişkiye girerek aktif oksidazı oluşturur (1). VDKH'lerinde  $p22^{phox}$  süperoksit üreten NAD(P)H oksidaz sisteminin kritik bir bileşenidir.



Şekil 2.3.1.: VSMC üzerine ROS'un etkileri. ROS hücre içi sinyal iletim yolları ile büyüme faktörlerinin ve MCP-1 geninin üretimini artırır. Ayrıca hücre büyümesi ve kollojen depolanmasına da neden olur. Bu şekilde ROS vasküler yeniden düzenlenmeye katkıda bulunur (1)

NAD(P)H oksidazın Ang II aktivasyonu geç olmaktadır ve VDKH'lerinde yalnızca Ang II uyarımından 60 dakika sonra saptanır (63,74). Bu etki 24 saat boyunca sürekli olmaktadır. NAD(P)H oksidaz bağımlı sinyal yolları hücre büyümesi gibi Ang II aracılı uzun dönem sinyal olaylarında muhtemelen önemli bir rol oynamaktadır. Buna dayanarak NAD(P)H oksidaz selektif inhibitör olan DPI ile inhibe edildiği zaman VSMC de Ang II ile uyarılmış protein sentezide inhibe olur (74,75). NAD(P)H oksidaz tarafından üretilen süperoksit, SOD tarafından hızlı bir şekilde  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülür.  $H_2O_2$  de peroksidaz ya da katalaz tarafından yakalanır.  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  birbirleri ile daha ileri reaksiyona girebilir veya demir içeren moleküllerle yüksek derecede reaktif hidroksil ( $OH^-$ ) radikalleri oluşturabilir (72)

ROS oluşumu sitokinler ve kalp, vasküler düz kas, endotelial, adventisyal ve mesangiyal hücrelerde  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  üretimini arttıran ve Ang II'yi de içeren birçok büyüme faktörleriyle düzenlenir (72) (Şekil 2.3.2). ROS oluşumu Ang II bağımlı patogeneze sorumlu olabilir fakat katekolamin bağımlı hipertansiyondan sorumlu değildir (72). Oksidatif stres bağımlı hipertansiyon

temelini oluşturan mekanizmaları endotelial kaynaklı NO'nin yıkımı ve  $O_2^-$  ile  $H_2O_2$ 'nin güçlü vasküler mitojenik etkileri ile ilişkili olabilir (72). VSMC büyümesi kısmen ERK-5 aktivasyonu yoluyla olabileceği gözükken redoks duyarlı bir bileşenin sonucudur (72) ROS, VDKH hiperplazi ve hipertrofisini uyarır, halbuki antioksidanlar büyümeyi inhibe eder, apoptozisi tetikler, büyüme faktörleri ve hipertrofik ajanlara cevabı zayıflatır (72) Ang II aracılı oksidatif stresin son zamanlarda hücre-hücre etkileşiminde önemli olan ve aterosklerozis gelişme süreciyle de muhtemelen ilgili olan endotelial vasküler hücre adhezyon molekül-1'i uyardığı görülmektedir (72). Vasküler büyüme için Ang II'nin uyardığı  $H_2O_2$  oluşumunun sinyal yollarıyla bağlantısı son zamanlarda p38 MAPK olarak tanımlanmıştır (75). ERK-5 redoks duyarlı bir kinaz olmakla beraber Ang II'nin bu MAPK yoluyla oksidatif stres bağımlı büyüme de aracı olduğu gözükmektedir (72) Başka redoks duyarlı yollar, Ang II ile birlikte diğer redoks duyarlı yolların hücre büyümesi üzerine olan etkisi hücre yaşam protein kinaz (Akt/PKB)'in fosforilasyonu yoluyla (75).

Damarsal yapılarda en önemli ROS'lerden biri oksijenin univalent reaksiyonu ile oluşan süperoksit anyonu ( $O_2^-$ )'dur (76). Bu reaksiyon NAD(P)H oksidaz ve ksantin oksidazı içeren çeşitli enzim sistemleriyle meydana gelir. Nitrik oksit ile  $O_2$  reaksiyonu ROS'un vücuda en zararlı üyesi olan peroksinitrit'i oluşturur. Süperoksit dismutaz (SOD) tarafından  $O_2^-$ 'in dismutasyonu ROS'un daha stabil formu olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşturur. Bu da daha sonra katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından  $H_2O$ 'ya enzimatik bir şekilde çevilir.  $H_2O_2$  yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikali (OH $\cdot$ )'ne dönüştürülmüş olan küçük geçiş metalleriyle de reaksiyona girebilir, ya da miyeloperoksidaz tarafından hipoklorik asid (HOCl) formuna metabolize edilebilir. Vasküler hücrelerin hemen hemen bütün tiplerinde  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  üretilir (77)

### 2.3.2. Enzimatik Olarak Süperoksit Üretimi

NAD(P)H oksidaz, XO, nitrik oksit sentaz (NOS) ve MPO içeren bir çok enzimatik sistem damar yapılarında  $O_2^-$  ve onun türevlerini üretir. Bu proteinlerin

her biri damarsal yapıların normal fizyolojik durumlarıyla değiştiği için relatif olarak önemli görünmektedir (72)

NAD(P)H oksidaz bir çok alt üniteden oluşur: elektron transfer ünitesi (gp91<sup>phox</sup>, nox-1 yada nox-4), p22<sup>phox</sup> ve düzenleyici alt üniteleri (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> ve iac-1). Bu alt ünitelerin ekspresyon şekilleri vasküler hücreler arasında değişmektedir (78). Enzim aktivasyonu spesifik hücre içi sinyallerin uyarılması ile kısa süreli ve enzim alt ünitelerinin düzenlenmesi yoluyla uzun süreli etkiler meydana getirir (79,80,81). Düşük Ang II konsantrasyonlarında bile (0.1 nM/L) NAD(P)H oksidaz kökenli ROS artar, bu da bu enzim sisteminin fizyolojik olarak önemli olduğunun kanıtıdır (82)

Uygun koşullarda NOS, NO eklendiğinde O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretebilir NOS tetrahidrobiopterine (H<sub>4</sub>B) bağımlı bir şekilde NO sentez etmek için L-arginini bir substrat olarak kullanır. L-arginin ve H<sub>4</sub>B konsantrasyonları eğer düşerse, ya da H<sub>4</sub>B okside olursa NOS serbest kalmaya başlar ve önemli miktarlarda süperoksit üretir (83). NAD(P)H oksidaz'ın aktivasyonu H<sub>4</sub>B'nin oksidasyonuna ve endotelial NOS'tan yüksek miktarlarda süperoksit üretimine neden olarak hipertansiyon oluşmasını sağlar (84).

Bir ubiquitin olan ksantin oksidoredüktaz, ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz olmak üzere fonksiyonel olarak farklı iki değişebilir formda bulunur (85). Ksantin oksidaz ile oluşturulmuş ROS iskemi/repürfizyon, hiperkolesterolemi ve kronik kalp yetmezliğindeki endotelial disfonksiyonu içeren değişik klinikopatolojik durumlardan da sorumlu olabilir (85,86).

Son zamanlarda vasküler patolojilerde MPO'nun rolü de aydınlatılmıştır. MPO fagositlerde bol miktarda bulunur ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den HOCl ve diğer oksidize örneklerin oluşumunu katalize eder (87) MPO, NO'ü reaktif oksijen örnekleri oluşturmak için kullanır, böylece NO biyoaktivitesi azalır ve oksidatif stres artar (88,89).

### 2.3.3. VDKH'leri Üzerine ROS'un Etkileri

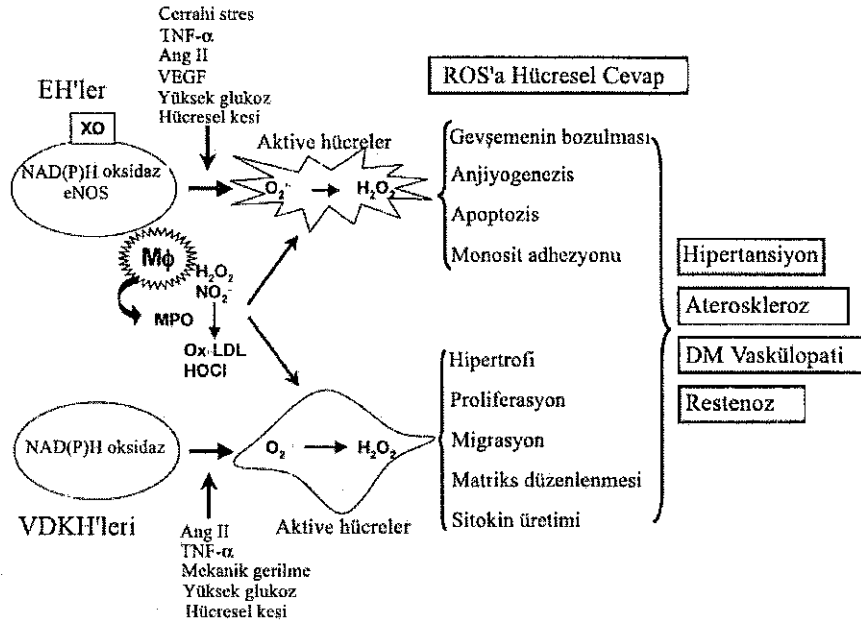
VSMC'nin bir çok fonksiyonu ROS'un üretimine bağlıdır. Belki bu işlemler üzerinde en iyi çalışılan hücre büyümesidir, fakat ROS inflamatuvar mediatörlerin ve matris bileşenlerinin ekspresyonu gibi migrasyonda neden olur. Bunlara ilaveten ROS VSMC de kasılmada da rol oynayabilir (72)

#### VDKH Büyümesi

Büyüme için fenotipi tahrip edilmiş olan sentetik VDKH'leri; hipertansiyon, ateroskleroz ve balon anjiyoplasti sonrasında restenoz gibi kardiyovasküler hastalıklarda da bulundu. ROS üretimi hipertrofik ve proliferatif VSMC büyümesinin ikisine de yol açan bir çok işlemde yakından gereklidir (72). Vazoaktif bir peptid olan Ang II'nin VDKH'lerinde hipertrofiye neden olabildiği birçok yıldır bilinmektedir (Şekil 2.3.2.). Ang II bağımlı VDKH hipertrofisi katalaz ve p22<sup>phox</sup> antisensinin kullanılmasıyla inhibe edildi. Bu nedenle büyümeye cevaptan NAD(P)H oksidaz kökenli ROS suçlanmıştır (72).

ROS, PDGF ve trombin gibi agonistlere cevapta da tam proliferatif bir rol oynar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin VDKH'lerinde proliferasyona neden olan etkileri kritik bir şekilde konsantrasyona bağımlıdır (90). Bununla birlikte PDGF ya da trombin ile VDKH proliferasyonu için de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gereklidir (91,92). Bu proliferasyon N-asetil sistein (NAC) veya DPI ile inhibe edilir. Endojen üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, VSMC'nin yaşam ve proliferasyonunun düzenlenmesinde de önemli olabilir, çünkü katalaz'ın overekspresyonu apoptozis oranını artırırken bazal düz kas proliferasyonunu inhibe eder (93).

ROS'un yukarıda tanımlanan etkileri VDKH'leri için pozitif olmasına rağmen, ROS VDKH'lerinde apoptozis ve farklılaşmaya da neden olur. Li ve ark. glukoz/glukoz oksidaz yada dietilmalat'a VDKH'lerinin cevabının hidroksil radikallerinin oluşumu yoluyla apoptozise neden olduklarını gösterdi (94). Oysa Su ve ark. endojen ROS'un VDKH olgunlaşma ve farklılaşmasını artırdığını rapor ettiler (95) Bu farklı gözükten etkiler VDKH'lerin gösterdiği gibi ROS'un



**Şekil 2.3.2.: ROS'un kaynakları ve hücresel etkileri.** NAD(P)H oksidazdan kaynaklanan ROS VDKH'lerinde hipertrofi, proliferasyon, migrasyon, matriks düzenlenmesi ve sitokin üretimine neden olur. Bunların sonucunda da hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet ve restenoz'a neden olur (72)

yapısı ve miktarları ile açıklanabilir. Yüksek konsantrasyonda  $H_2O_2$  (500  $\mu$ mol/L – 1 mmol/L) apoptoze neden olur, oysa orta derecedeki konsantrasyonlar (100  $\mu$ mol/L) hücre döngüsünde G1 fazında duraklamaya neden olur (96)

### Migrasyon

VDKH migrasyonu major vasküler patogenez bileşenlerinden biri olarak kabul edilir. VDKH migrasyonunun kesin mekanizmaları belli olmamakla beraber, ROS'un bu işlemde rolü olduğu açıkça gösterilmiştir. Sundaesan ve ark. PDGF bağımlı VDKH kemotaksisinin katalaz overekspresyonu tarafından inhibe edildiğini gösterdiler (91). Bu Weber ve ark tarafından PDGF ile uyarılmış VDKH migrasyonunun NAC, DPI, ebselen ve dominant negatif rac tarafından inhibe edildiğinin gösterilmesiyle de son zamanlarda saptandı (97). Bu da NAD(P)H oksidaz yoluyla  $O_2^-$  üretiminin VDKH migrasyonu için agonist olduğunun kanıtıdır. ROS bağımlı VDKH migrasyonundan sorumlu sinyal moleküllerini tanımlamak büyük bir ilgi uyandıracaktır (72).

## **Matriks Düzenlemesi**

Matriks matelloproteinaz'lar (MMP'leri) tarafından ekstra selüler matriks yıkım ve yeniden düzenlemesi fizyolojik ve patofizyolojik vasküler düzenlemede önemli olaylardır. Son çalışmalar MMP'lerin aktivitesinin ROS tarafından düzenlendiğini ortaya çıkardı. Rajagopalan ve ark. insan VDKH'lerinden sekrete edilen pro-MMP-2 ve pro-MMP-9'un ROS tarafından aktive edildiğini gösterdi (98). ROS'un düzenlediği ve MMP aktivitesi tarafından meydana getirilen iç mekanizmaların Fu ve ark. tarafından sağlanması MPO kökenli HOCl'nin sistein birimlerinin oksijenasyonu ile MMP-7'yi aktive ettiğini bulmalarını sağladı (99). Bu MMP proenziminin iyi bilinen proteolitik parçalanmasından farklı bir mekanizmadır. MMP'lerin gen ekspresyonu ROS tarafından düzenlenir. Mekanik uzamaya karşı vasküler düz kaslar hücrelerinde MMP-2 mRNA, NAD(P)H oksidaz kaynaklı ROS duyarlı bir şekilde artar. Bu yüzden ROS bir çok düzeyde matriksin yeniden düzenlenmesini kontrol eder (100).

## **İnflamatuvar Gen Ekspresyonu**

Ateroskleroz, çeşitli sitokinlerin vasküler lezyonların ilerlemede önemli bir rol oynadıkları inflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Sitokin gen ekspresyonu ile meydana gelen major mekanizmalardan biri nükleer faktör- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ )'nin aktivasyonunun artmasıdır. NF- $\kappa\beta$ , ROS duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ile interlökin-6 (IL-6)'yı içeren proinflamatuvar genlerin ekspresyonunda merkezi bir role sahiptir (101). VDKH'lerinde Ang II ve TNF- $\alpha$ 'nın ROS bağımlı bir şekilde NF- $\kappa\beta$ 'yı uyararak bu genleri arttırdığı görüldü (102,103,104).

## **Kontraksiyon**

$O_2^{\cdot-}$ 'nin NO inaktivasyonu ile vazomotor tonusu düzenlediği iyi bir şekilde saptanmıştır. Bununla birlikte VDKH'leri üzerinde ROS'un direkt etkisi tartışmalıdır.  $H_2O_2$  pulmoner, kroner ve mezenterik arterlerde vasorelaksasyona neden olur (105,106). Buna karşı ksantin oksidaz tarafından üretilmiş ROS, aortada vasokonstrüktördür ve ROS bağımlı kontraksiyon, hipertansif ratlarda



kendiliğinden artar. Ayrıca Ang II'nin aortada yaptığı kontraksiyon katalaz tarafından inhibe edilir. Bu görünen farklılıklar, kötü vasküler çalışmalar yada özel sistemlerde üretilmiş ROS'un konsantrasyonu nedeniyle olabilir. Konsantrasyon üzerine ROS'un etkilerini tam olarak açıklamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (72)

## 2.4. MİTOJEN AKTİVELİ PROTEİN KİNAZLAR (MAPK)

### 2.4.1. MAP Kinazların Özellikleri ve Düzenlenmeleri

1989 ve 1991 yılları arasında ilk MAPK sekansları, memeli MAP kinazları ERK1, ERK2 ve ERK3 tanımlanmaya başlamıştır (107) ERK1 ve ERK2'nin aktiviteleri iki substratla rutin olarak ölçülmektedir. Bunlar miyelin temel protein (miyelin basic protein; MBP) ve mikrotübül-ilişkili protein-2 (Microtubul-associated protein 2; MAP2)'dir (108). MAP "mitojen-aktifli protein" kelimelerinin baş harflerinden oluşmuştur ve 1980'lerin ilk dönemlerinde ilk kez mitojen- uyarımlı tirozin fosfoproteinleri olarak tanımlanmıştır (109)

Mitojen aktive edici kinazlar serin/treonin protein kinazların bir ailesidir ve hücre içi protein fosforilasyonları ile hücre dışı sinyallerin nukleusa iletimine aracılık ederler. Bu yolla transkripsiyonel faktörleri aktive olarak gen ekspresyonları artar ve hücresele cevap oluşur.

Memeli MAP Kinazları 6 ana alt sınıfta toplanmıştır (110);

- 1- ERK 1/2 (sırasıyla p42-kDa MAPK ve p44-kDa MAPK olarak da bilinir); ERK 1/2 mitojenik ajanlar ile uyarım sonrasında proliferasyona yönelir. Hedef transkripsiyon faktörleri Elk1, c-Myc ve p90 ribosomal S6 kinazdır.
- 2- c- Jun N-terminal kinazlar (JNK) 1,2,3 ve Stres Aktive edici Protein Kinazlar (Stress- Activated Protein Kinase; SAPK); JNK'lar stresle aktive olan protein kinazlardır ki bunlar c-Jun transkripsiyon faktörünü, AP1 transkripsiyon faktörünün bir komponentini aktive ederler.

- 3- p38 MAPK; p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  olarak adlandırılan 4 tane p38 izoenziminden oluşur. p38, JNK uyarımına benzer şekilde uyarılır fakat fonksiyonları JNK'lerden farklıdır.
- 4- ERK6; p38 benzeri MAPK.
- 5- ERK3
- 6- ERK5 (Big MAPK 1 olarak da adlandırılır)

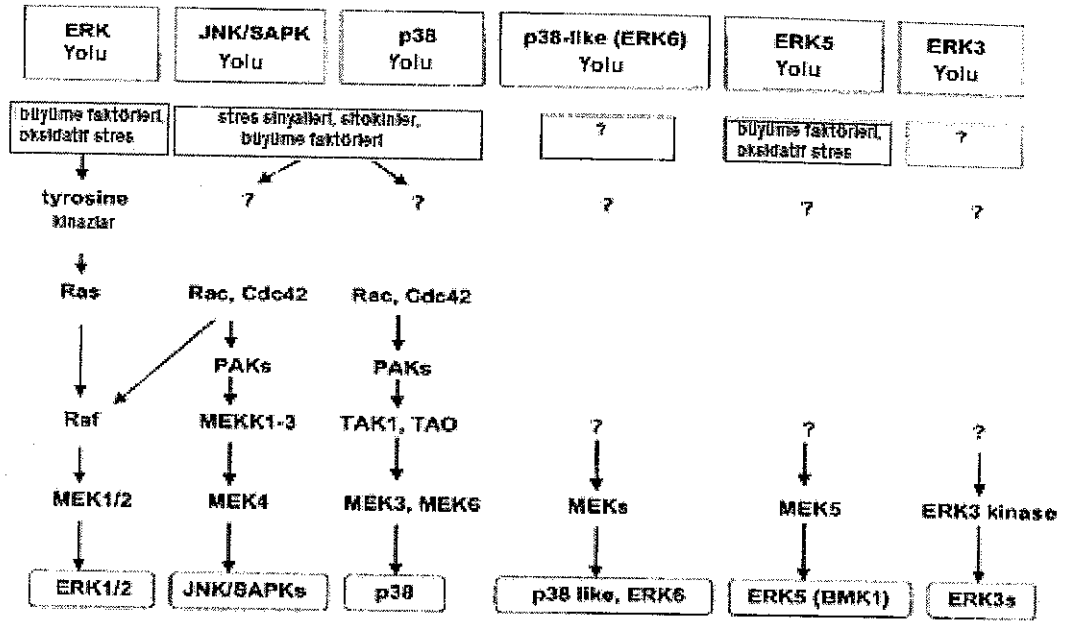
MAPK bağımlı sinyal yolları hücre büyümesi, apoptosiz, hücrel farklılaşma, transformasyon ve vasküler kontraksiyondan sorumludur (111,112). ERK1/2 büyüme ve farklılaşma uyarılarına cevap verirken, JNK ve p38 MAPK genellikle sitokinlere ve hücrel strese cevap verir (111-114).

MAPK; hücre büyümesi, transformasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi çeşitli fizyolojik işlemleri kontrol eder. Bu kinazların aktive olabilmesi için treonin ve tirozin birimlerinin her ikisinin de fosforile olması gerekir. Spesifik MAPK fosfatazlar tarafından inaktive olurlar. MAPK sinyal yolunda fosforilasyon ve defosforilasyonun birlikte denge halinde olmasıyla MAPK aktivitesi düzenlenir ve bu şekilde hücreler çevresel değişikliklere hızlı bir şekilde adapte olur (115).

MAPK sinyal yolunda birbirini ardı sıra takip eden 3 tane aktiviteli kinaz olduğu bilinmektedir. Bunlar; MAP kinazlar, MAPK'yı fosforilayıp aktive eden MAPK kinazlar (MKK veya MEK) ve MEK'i aktive eden MAPK kinaz kinaz (MKKK veya MEKK)'lardır. MAPK'ların ana hedefleri diğer protein kinazlar, fosfolipazlar ve transkripsiyon faktörleridir (115).

#### **2.4.2. p38 MAPK**

Stresin aktive ettiği bir serin/treonin protein kinaz olan p38 MAPK, MAPK süper ailesine aittir. Ultraviyole ışık, radyasyon, ısı, şok, yüksek osmotik stres, proinflamatuvar sitokinler ve bazı mitojenleri içeren çeşitli hücre dışı uyarılar kinaz aktivasyon kıvrımı içindeki bir TGY motifini fosforile eder.



Şekil 2.4.1 : Memeli MAPK Sinyal Yollarının Şematik Gösterimi. PAK, p21 aktive edici kinaz (p21-activated protein kinase); TAK, IGF- $\beta$  aktive edici kinaz (IGF- $\beta$ -activated kinase); TAO, (thousand and one amino acid kinase); BMK, Büyük MAP kinaz (big MAP kinase) (1)

Bu fosforilasyon sonucunda p38 MAPK aktive olarak stresle düzenlenen bir protein kinaz kaskadının tetiklenmesini sağlar p38 MAPK apoptozis, sitokin üretimi, transkripsiyonel ve sitoskeletal düzenlenme de majör bir rol oynadığı görülmektedir. Bu nedenle p38 MAPK sepsis, iskemik kalp hastalığı, artrit, HIV enfeksiyonu ve Alzheimer hastalığının nedenlerinden sorumlu olabilir (116).

p38 MAPK ilk olarak lipopolisakkaritle uyarılmış makrofajlarda tirozinden fosforlanmış bir protein olarak tanımlandı. Daha sonra osmotik şok durumu altında aktive olduğu bilinen maya HOG1 (High Osmolarity Glycerol Responsive 1) kinaz ile önemli derecede benzerlik gösterdiği bulundu. İnsan p38 $\alpha$  MAPK homologları lipopolisakkaritle (LPS) uyarılmış monositlerden salınan TNF (tümör nekrozis faktör)- $\alpha$  ve interlökin (IL)-1 salınımını bloke ettiği bilinen piridinil imidazol bileşiklerinin (sitokin baskılayıcı antiinflamatuvar ilaçların) hedefi olarak tanımlandı. p38 MAPK proteinleri bu yüzden CSBP-1 ve -2 (sitokin baskılayıcı anti-inflamatuvar ilaçları bağlayan proteinler) olarak adlandırıldı. İlk

p38 MAPK'in (p38 $\alpha$ ) klonlanmasından sonra p38 $\beta$  (SAPK2b olarak da adlandırılır), p38 $\gamma$  (ERK-6/SAPK-3 olarak da adlandırılır) ve p38 $\delta$  klonlandı. Bunlar amino asit açısından sırasıyla %73, %63 ve %62 oranında p38 $\alpha$  ile benzerlik gösterir. Buna ilaveten p38 $\alpha$  ve  $\beta$ 'nin ikisi ek alternatif formlara sahiptir. Bu nedenle p38 MAPK'in 6 izoformunun olduğu kabul edilir. İzofomlar ekspresyon, aktivasyon ve substrat spesifitesi açısından aralarında fonksiyonel farklılıklar gösterir. p38 $\alpha$  lökosit, karaciğer, dalak, kemik iliği, tiroid ve plasentada aynı anda eksprese edilir. Buna karşı p38 $\gamma$  primer olarak iskelet kaslarında eksprese edilirken, p38 $\beta$  beyin ve kalpte en yüksek düzeyde eksprese edilir. p38 $\delta$  ise akciğer, böbrek, GIS, testis, over, adrenal ve hipofiz bez gibi endokronolojik olarak aktif organlarda salgı bezi epitelyumu boyunca güçlü bir şekilde eksprese edilir. LPS uygulanması p38 $\alpha$ 'yı aktive eder fakat p38 $\beta$  da herhangi bir aktivasyon yapmaz. Halbuki transkripsiyon faktörleri MEF2-A ve -C p38 $\alpha$  ve  $\beta$ 'yi etkili bir şekilde fosforile ederken p38 $\gamma$  veya  $\delta$ 'da aktivasyona neden olmaz (116,117)

#### 2.4.3. p38 MAPK Yolunun Üst Basamak Düzenlenmesi

MAPK aktivasyonuna yol açan üst basamak sinyal kaskadının temel organizasyonu bütün ökaryotlar arasında yüksek derecede korunmuştur. MAPK'lar genellikle kinaz alt birimi VIII içindeki fosforilasyon dudağı veya aktivasyon kıvrımı olarak tanımlanmış yüzeyde açık olan bir bölgeden fosforile edilerek aktive olur. Fosforilasyon bir Thr-Xxx-Tyr ikili fosforilasyon motifi içindeki treonin ve tirozin birimleri üzerinden meydana gelmektedir. Merkezi Xxx birimi Erk MAPK ailesinin bütün üyelerinde bir glutamat, JNK ailesinin üyelerinde bir prolin ve p38 MAPK ailesinin üyelerinde bir glisin amino asidinden oluşmaktadır. Fosforile bu alanlar üst basamak kinazlar için muhtemelen çok önemli bir spesifiteye sahiptir (117).

MAPK'ları direkt olarak fosforile eden kinazlar MAP kinaz kinazlar olarak adlandırılmıştır ve MAPKK, MEK yada MKK olmak üzere değişik şekillerde kısaltılmıştır. MKK-3 ve MKK-6, p38 MAPK'in *in vivo* ve *in vitro*

majör üst basamak aktivatörleri olarak kabul edilmişlerdir. MKK-6 tüm p38 MAPK izotiplerini fosforile ediyor gözükmemektedir, halbuki MKK-3 yalnızca p38  $\alpha$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ 'yi fosforile eder. MKK-4 JNK'ların üst basamak bir aktivatörü olmakla beraber *in vitro* veya kültüre hücre dizilerinde eksprese edildiği zaman p38 MAPK'ı aktive edebilir fakat *in vivo* fizyolojik bir aktivatör olduğu düşünülmemektedir. Bununla birlikte yeni bir gen-hedefi çalışması MKK-4 -/- nakavt fibroblast hücrelerde TNF, anisomisin yada hiperosmotik strese cevapta JNK ve p38 MAPK'ın her ikisinde de fosforilasyon defektleri olduğunu göstermiştir. Bu nedenle son zamanlarda MKK-4'ten P38 MAPK'a *in vivo* bir yolun mümkün olabileceği vurgulanmaktadır (118)

MKK-3 ve -6 gibi MAPK'lar MAP kinaz kinaz kinazlar olarak adlandırılan üst basamak kinazlar tarafından kendi kendilerini düzenler. Bu güne kadar MEKK-1, MEKK-2, MEKK-3, MUK (*MAP upstream kinase*), MLK (*mixed lineage kinase*), TPI-2 (*tumor progression locus-2*), MTK-1/MEKK-4, TAK-1, ASK-1 (*apoptosis signal-regulated kinase*) ve IAO (*thousand and one amino acid protein kinase*) gibi adlarla adlandırılan MAPKKK süper ailesinin üyeleri stresle aktive edilmiş MAPK yollarının aktivasyonundan sorumludur. p38 MAPK yolunu aktive eden her bir MAPKKK'nın bu kaskad içinde ne gibi fonksiyonlar gösterdiği açık bir şekilde tanımlanamamıştır. Fakat şu ana kadar yapılan çalışmalara göre MEKK-1, MEKK-2, MEKK-3, MUK, MLK ve Tpl-2 p38 MAPK dan ziyade öncelikli olarak JNK'yı aktive ediyor görünmektedir. Öte yandan TAK-1, MTK-1/MEKK-4, IAO ve ASK-1 p38 MAPK yolunun daha etkili aktivatörleridir (119). Kanıtlar Rac ve Cdc42 içeren Rho ailesinin GTP bağlayan proteinleri gibi düşük moleküler ağırlıklı guanozin 5'-fosfat bağlayan proteinler JNK ve p38 MAPK üst yollarında bulunduğunu göstermiştir (117).

#### 2.3.4. p38 MAPK Aktivasyonunun Alt Basamak Etkileri

HücreSEL fizyolojinin düzenlenmesinde hızlı bir şekilde artarak görev yapan p38 MAPK rolü bilinmekle beraber, p38 MAPK'ın direkt substratları daha

Tablo 2.4.1 : p38 MAPK'nın vasküler düz kas hücrelerindeki etkileri (84).

Gen Ekspresyonu
Transkripsiyon faktör aktivasyonu
Protein sentezi
Sinyal İletimi
Adrenajik yolak
Araşidonik asit yolağı
Sitokin yolakları
Nitrik oksit yolağı
Hücre Biyolojisi
Apoptozis
İskelet sistemi ve hareket
Farklılaşma / büyümenin durması / proliferasyon
Isı şok ve oksidatif stres cevapları
Nötrofil aracılı inflamasyon
Hastalıklar
Kardiyak durum ve hipertrofi
İnfeksiyon hastalıkları
İskemi / reperfüzyon
Nöronal patoloji
Yara iyileşmesi ve dokunun yeniden düzenlenmesi

yeni tanımlanmaya başlanmıştır p38 MAPK yolu tarafından düzenlenen bazı genel etkiler tablo 2.4.1 de verilmiştir (117).

#### Gen Ekspresyonu

p38 yolu birçok transkripsiyon faktörünün aktivesini ve genin ekspresyonunu kontrol eder p38 MAPK yolu fosforillenir ve aktive transkripsiyon faktör (ATF)-1/2, CHOP/GADD153 (büyüme duraklaması ve DNA zararı), çoklu CREB'ler (*cyclic AMP response element-binding proteins*), ELK-1, Ets-1, MAX, MEF-2A, MEF-2C, NF- $\kappa$ B, HSF (*heat shock transcription factor*)-1 ve SAP-1'i içeren birçok transkripsiyon faktörünün aktivitesini artırır. Bazı transkripsiyon faktörlerinin p38 MAPK'nın direkt substratları olduğu bilinmekle birlikte, diğerleri alt basamak protein kinazlar tarafından aktive edilirler. Bunlar MAPKAP-2 (MAP kinaz aktveli protein kinaz-2) gibi p38 MAPK fosforilasyonunu ile kendi kendilerini aktive ederler. Buna ilaveten bazı diğer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu p38 MAPK aktivitesine bağımlı olduğu bilinmektedir (fas ligand promotor ve osmotik response enhancer element-driven gen ekspresyonu gibi), fakat proksimal kinazlar daha aydınlatılamamıştır.

Tablo 2.4.2.: p38 MAPK'nın substratları ve sonraki hedef proteinler (84).

İlk Substrat	Sonraki Substrat
MAPKAP-2/3 (MK2/3)	CREB Hsp27 LSP1 SRF Tirozin hidroksilaz
MNK1/2	eIF4E
MSK1	CREB
PRAK	
3pK	
RSK-B	CREB, fos

p38 MAPK'nın direkt substratları ve onların alt basamak hedefleri tablo 2 4 2 de liste halinde verilmiştir (117)

### Hücre Sinyali

Hücresel düzeydeki etkilerine ilaveten p38 MAPK sitokinler, katekolaminler, nitrik oksit (NO) ve araşidonik asit ürünlerinin üretimini düzenlemek yoluyla organ ve doku seviyesinde strese karşı cevabın düzenlenmesinde yardımcı bir rol üstlenir (117).

**Adrenarjik Yol:** K1omafin ve feokromasitoma hücrelerinde p38 MAPK yolu transkripsiyondan bağımsız bir mekanizma yoluyla katekolaminlerin biyosentezini arttırır. MAPKAP-2, katekolamin sentez yolunda çok erken bir adım olan tirozin hidroksilazın fosforilasyon ve aktivasyonunu katalize eder (117).

**Araşidonat Sinyali:** Araşidonik asit (prostaglandinler, lökotrienler ve diğer eikasonoidler) metabolitleri inflamatuvar cevapların uyarılması ve baskılanmasında anahtar mediatörlerdir. PLA<sub>2</sub>, fosfolipidlerden araşidonik asit salınımını primer olarak düzenleyen bir enzimdir. Nötrofillerin TNF- $\alpha$ 'ya ve düz kas hücrelerinin ET-1'e maruz kalması üzerine, bu enzim p38 MAPK bağımlı fosforilasyon ve aktivasyon yoluyla artar (120,121).

**Sitokin Sinyali:** p38 MAPK bazı sitokinlerin hem üretimi hem de hücresel cevabında rol oynar. TNF- $\alpha$  ve IL-1 üretimindeki rolü bilinmekle birlikte p38 MAPK IL-4, IL-6, IL-8 ve IL-2'nin üretiminde de rol oynar. p38 MAPK bazı sitokinlerin hücresel cevabında kritik bir rol oynar. Mesela insan nötrofilleri GM-

CSF, TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 'ya maruz bırakıldıkları zaman p38 MAPK aktivasyonu olur (117)

**NO Sinyali:** p38 MAPK iki noktada NO'in üretiminde gereklidir. Birincisi p38 MAPK NO sentaz için bir substrat olan arjinin'in taşınmasını aktive ederek hücre içi konsantrasyonunu artırır, bu da NO üretimini artırır (122). İkincisi NO sentazın uyarılabilir formunun gen ekspresyonunun artışı için gereklidir (123).

#### **Sitoiskeleteal Dinamikler**

Bir çok hücre tipinde (epitel, düz kas, endotel hücreleri) migrasyon, p38 MAPK inhibitörü olan SB 203580 ile bloke edilir. Daha yeni tanımlanmaya başlanmasına rağmen tüm p38 MAPK substratlarının bu olaydan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çeşitli sitoiskeleteal proteinler (*microtubule associated protein tau, actin associated protein hsp27 ve intermediate filament proteins h-caldesmin, vimetin ve creatin polipeptides* 8) p38 yolunun substratlarıdır. p38 MAPK'nın katalizlediği bu fosforilasyonlardan hanginin en önemli olduğu belirsizdir. Bunlardan yalnızca hsp27 fosforilasyonunun etkisi geniş bir şekilde çalışılmıştır. p38 MAPK'nın aktivasyonu MAPKAP-2 yoluyla küçük ısı şok proteini hsp27'nin fosforilasyonuna neden olur (117).

#### **2.4.4. MAPK Fosfatazlar Tarafından Stres Kinaz Yollarının Fizyolojik İnaktivasyonu**

MAPK fosfataz (MKP)'lar aktivasyon kırımındaki treonin ve tirozin kalıntılarının her ikisinde kritik bir şekilde MAPK ailesi üyelerini bazal inaktif durumlarına dönüştüren çift spesifiteye sahip protein fosfatazlardır. Şu ana kadar bu grubun MKP-1 (CL-100), MKP-2 (hVH2, TYP-1), MKP-3 (Pyst1, rVH6), MKP-4 (Pyst3), MKP-5, PAC1, hVH2 (B-23), hVH5 (M3/6) ve Pyst1 olmak üzere dokuz üyesi rapor edildi. MKP-1 ilk izole edilen MKP'dir. MKP-1'in ERK, JNK ve p38 MAPK'ı defosforile ettiği gösterildi. Belirli MAPK için MKP'lerin substrat spesifitesi yeni çözülmeye başlanmasına rağmen Franklin ve ark. MKP-1'in p38 MAPK ve JNK'ları ERK'lerden daha güçlü bir şekilde inhibe ettiğini buldular. Benzer bir şekilde MKP-5 te, p38 MAPK ve JNK'yı inaktive ederken



ERK'leri inhibe etmez. Halbuki MKP-4 ve MKP-3/6 ERK'leri p38 MAPK ve JNK'lardan daha güçlü bir şekilde defosforile eder. Stres kinaz yollarının hücre yaşamı ve apoptoziste gibi zıt roller de oynamasından dolayı MKP spesifitesinin ek ayrıntıları, onların düzenlenmesi ile karışıklığın anlaşılmasında yardımcı olabilir (117)

## GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. Materyal ve Kimyasal Malzemeler

#### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kollajenaz Tip 1A, Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), elastaz pankreatik tip E, penisilin (100 U/ml)-streptomisin (100 µg/ml), soya tripsin inhibitör 1S (STI), tripsin EDTA solusyon (10X), akrilamit, bisakrilamit, amonyum persülfat (APS), tetramethylethylenediamine (TEMED), TRIS, kalsiyum klorid (CaCl<sub>2</sub>), bovine serum albumin ve Ras inhibitörü olan FTS Sigma'dan satın alındı.

Hücre kültürü işlemi için kullanılan petriyer (20 mm), flaklar (12.5, 25 ve 75 cm<sup>2</sup>) ve plastik tüpler (15 ve 50 ml) gibi sarf malzemeleri R & D Falcon firmasından satın alındı.

Medyum saklama amacıyla Simax marka otoklavlanabilir cam şişeler kullanıldı.

Vasküler düz kas hücre (VDKH) kültüründe aktivatör olarak kullanılan Anjiyotensin II Sigma'dan, inhibitör olarak kullanılan DPI Calbiochem'den satın alındı. AT<sub>1</sub> reseptör antagonisti losartan, Merck Sharp & Dohme firması tarafından hibe edildi.

VDKH kültüründeki hücrelerin immünohistokimyasal analizler için Dako marka immünohistokimya kiti kullanıldı. Bu işlemde kullanılan α-aktin ve Von Willebrand faktörüne karşı olan primer antikorlar ile bunlara karşı olan sekonder antikorlar Sigma'dan alındı.

Protein ölçümleri için Bio-Rad marka protein ölçüm kiti (Bio-Rad katalog no 500-001) ve standardı kullanıldı. Western blot işlemleri Bio-Rad marka Mini-Protean Western Blot seti kullanılarak yapıldı. Sinyallerin saptanması için HRP (Horse-Radish Peroxydase) substrat (kemiluminesans geliştirici, Bio-Rad marka katalog no 170-5040) kullanıldı. Proteinlerin membrana transferi için Bio-Rad marka por genişliği 0.45 µm olan nitroseluloz membranlar kullanıldı.

Membranlardaki sinyallerin filme aktarılmasında yüksek kaliteli Amersham marka film, filmlerdeki sinyallerin geliştirilmesinde ise Illugater marka developer ve fiksatif kullanıldı.

Gliserol, sodium dodecyl sulphate (SDS), glisin ve 2-merkaptoetanol Amresco'dan satın alındı.

Ethylene diaminetetraacetic (EDTA), bromofenol blue ve metanol Merck'den alındı. L-glutamin ve Hepes (N-(2-hidroksietil) piperazin-N-(2-etansulfonikası)), Bio Ind'ten satın alındı.

p38 MAPK proteinine spesifik fosforile rat primer p38 MAPK antikorı ve tavşan kökenli fosforile rat primer p38 MAPK antikoruna spesifik sekonder antikor Chemicon firmasından temin edildi.

### 3.1.2. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

Spektrofotometre	: Thermo Labsystems Multiskan Spectrum, 1500
UltraSantrifüj	: Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R
Santrifüj	: Nüve NF 800
İnkübatör	: SL Shel Lab CO <sub>2</sub> İncubator
Sonikatör	: Bandelin sonopuls UV 2070
Çalkalayıcı	: Stovall, The Belly Buttum
pH Metre	: Schott CG 840
Su Banyosu	: B. Braun Biotech International

Hassas Terazi : Shimadzu AW 120  
Güç Kaynağı : Power Pack 300, Bio-Rad  
İnverted mikroskop : Zeiss, Olympus  
Kültür Kabini : Hera Safe Kendro D-63505

Plastik ve cam malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilisasyon Merkezinde steril edildi

Deneyde kullanılan 250-350 g ağırlığındaki erkek wistar ratlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi

Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyon işlemleri, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde yapıldı.

Primer hücre kültürü işlemleri ve protein ölçümleri Akdeniz Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvar'ında yapıldı.

İmmünohistokimya ve Western Blot teknikleri Biyokimya ve Histoloji Anabilim Dallarında yapıldı

### **3.2. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu (124)**

#### **3.2.1. Transfer Medyumunun Hazırlanması**

Dokunun kültür ortamına steril ve canlı bir şekilde taşınması için transfer medyumunu hazırlandı. Bunun için 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> 10 ml HBSS içinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edildi ve üstüne steril HBSS eklenip final hacim 100 ml'ye tamamlandı. Final hacimde % 2 oranında olacak şekilde penisilin (100 U/ml)-streptomisin (100 µg/ml) eklendi ve + 4 °C'de saklandı.

### 3.2.2. Vasküler Düz Kas Hücre İzolasyon Yöntemi

Akdeniz Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında 250-350 g ağırlığındaki erkek Wistar ratları steril koşullar altında eter anestezisi uygulanarak bayıltıldı. Toraks ve abdomen açıldı. Torasik ve üst abdominal aort disseke edilerek buz içerisindeki steril petri kabına aktarıldı. Petri içerisine transfer medyumu konuldu ve steril enjektöre çekilen 4-5 ml transfer medyumu ile aortanın iç çeperi yıkandı. Petri kutusu içindeki aorta UV ile steril edilmiş ayrı bir odaya alındı. Aort, buz üzerinde ve disseksiyon mikroskobu altında transfer medyumu içeren temiz bir parafinli petri kabına aktarıldı. Aorta segmentleri temizlenirken kaymaması için iki ucundan toplu iğneler yardımıyla parafin bloğa tutturuldu. Steril mikro cerrahi set yardımıyla aortanın dış kısmındaki yağlar ve venöz yapılar temizlendi. Aorta boylamasına kesilerek hafif gerilmiş vaziyette uçlarından toplu iğneler ile parafin bloğa tutturuldu. Aortanın iç kısmındaki tek katlı epitel dokusu pamuklu bir çubuk ile hafifçe sıyrıldı. Bu şekilde aortun tek katlı epitel dokusu ortamdaki uzaklaştırıldı. Mikroskop altında tek katlı epitel hücreleri ortamdaki uzaklaştırdıktan sonra aort ters çevrildi. Aortun dış kısmında kalan yağ parçaları ve kapiller damarlar tamamen temizlendikten sonra steril bir bistüri yardımıyla aortanın dışı kazındı. Bu şekilde, aort dış duvarındaki adventisya dokusu da ortamdaki tamamen uzaklaştırılmış oldu. Tek katlı epitel tabakası ve adventisya aort üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra aorta transfer medyumu ile yıkandı ve içinde steril transfer medyumu bulunan 15 ml'lik plastik tüpe alındı. Daha sonra plastik tüp buz içerisinde hücre kültürünün yapılacağı ortama hızlı bir şekilde aktarıldı.

### 3.3. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü (124)

#### 3.3.1. Enzim Ayırma Solüsyonunun Hazırlanması

Enzim ayırma solüsyonu ise final hacim 4 ml olacak şekilde steril HBSS solüsyonu içerisinde ( $\text{Ca}^{+2}$ - $\text{Mg}^{+2}$  içermeyen) 0.2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  ( $\text{CaCl}_2$ ; 10 ml HBSS

solüsyonu içerisinde 2 352 mg  $\text{CaCl}_2$  çözülerek 0.22  $\mu\text{m}$ 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4  $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı), 15 mM HEPES pH 7.2-7.3 (10 ml HBSS içerisinde 143.1 mg HEPES çözülerek 0.22  $\mu\text{m}$ 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4  $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı), 0.0625 mg/ml elastaz (5 ml HBSS içinde steril 5 mg tip E pankreatik elastaz, çözülerek 0.5 ml'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20  $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı), 0.25 mg/ml soya tripsin inhibitör (5 ml HBSS solüsyonu içerisinde 5 mg STİ Tip IS tartılıp çözülerek 0.22  $\mu\text{m}$ 'lik steril filtreden geçirildi ve +4  $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı), 0.5 mg/ml kollejenaz (12.5 ml HBSS içinde 100 mg kollajenaz çözülerek 0.5 ml'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20  $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı), 2.0 mg/ml bovine serum albumin (5 ml HBSS solüsyonu içerisinde 80 mg albumin çözülerek 0.22  $\mu\text{m}$ 'lik steril filtreden geçirildi ve +4  $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı) çözülerek hazırlandı. Bu stoklardan tablo 3.3.1'deki gibi hacimler alınarak 4 ml enzim ayrışma solüsyonu hazırlandı.

**Tablo 3.3.1.: Enzim Ayrışma Solüsyonu Bileşenleri ve Miktarları**

Soya Tripsin İnhibitör	1 ml
HEPES	1 ml
$\text{Ca}^{+2}$	0.5 ml
Bovine Serum Albumin	0.5 ml
HBSS	0.5 ml
Elastaz	250 $\mu\text{l}$
Kollajenaz	250 $\mu\text{l}$
Toplam	4 ml

### 3.3.2. Medyum (Besi Yeri) Hazırlanması

Hücre besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanıldı. 500 ml'lik besiyeri hazırlamak için; L-glutamin 0.584 g/L, HEPES 25 mM olacak şekilde, ayrı ayrı 10 ml saf DMEM'de çözülerek hazırlandı. Hazırlanan her iki solüsyon 0.22  $\mu\text{m}$ 'lik steril filtrelerden geçirildi 425 ml

medyum üzerine 50 ml fetal bovine serum (FBS) (% 10), 5 ml (% 1) penisilin-streptomisin (10,000 U penisilin, 10 mg streptomisin) ve steril filtrelerden geçirilen 10 ml'lik L-glutamin ile 10 ml'lik Hepes ilave edildi. Sonuçta toplam 500 ml'lik besi yerleri hazırlandı. Hazırlanan 500 ml'lik besi yeri solusyonu 100 ml'lik Simax marka otoklavlanabilir cam şişelere aktarılarak + 4 °C de saklandı.

### 3.3.3. Düz Kas Hücre Kültürü Metodu

Transfer medyumunu içindeki temiz aorta, UV ile steril edilmiş kültür kabini içerisindeki 15 ml'lik doku petri kaplarına transfer edildi. Ortamdaki transfer medyumunu otomatik pipet ile çekilerek atıldı. Petri kabı içerisinde aort iki adet steril bistüri yardımıyla çok küçük parçalara ayrıldı. Bu şekilde aort dokusunun enzim ile reaksiyona girecek yüzey alanı artırılmış oldu. Toplu iğne başı gibi küçük parçalara ayrılmış olan aort üzerine enzim ayırma solusyonu (4 ml, 37 °C) eklendi. Doku petri kabının kapağı kapatıldı ve etrafı parafilm ile sarıldı. Aort vasküler düz kas dokusundan enzimler yardımıyla düz kas hücrelerini ayırma için petri kabı 45 dakika, 37 °C'lik etüvde hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra doku petri kabı etüvden çıkarıldı ve steril kültür kabini içerisine alındı. Daha sonra düz kas hücrelerinin mekanik etkiyle birbirinden ayrılmasını kolaylaştırmak için doku 8-10 kez 14 µm'lik çelik kantül uçlu 10 ml'lik plastik enjektöre çekilerek iyice süspansede edildi. Ortamdaki enzim aktivelerini inhibe etmek için doku petri kabına enzim ayırma solusyonunun iki katı olacak şekilde 8 ml medyum eklendi. Petri kabı içerisindeki tüm sıvı 15 ml'lik steril plastik tüplere alındı ve 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra steril ortamda pellet üstündeki tüm süpernatant kısım ortamdaki çekilerek uzaklaştırıldı. Dipte kalan pellet 10 ml medyum ile tekrar süspansede edilerek 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet'in üzerindeki süpernatant kısım atılarak ortamda dilüe halde kalan ve dokuyu yıkan enzimler (elastaz, kollejenaz) tamamen uzaklaştırılmış oldu. Plastik tüpün dibinde kalan hücre pelleti 3 ml DMEM ile süspansede edilerek 12,5 cm<sup>2</sup>'lik doku kültür flaskına transfer edildi. Hücre kültür flaskı nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> ve % 95 atmosfer havası içeren

inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi. Primer kültürü yapılan VDKH'leri, 48 saat sonra invert kontras mikroskobu altında incelendi. Bundan sonra herhangi bir enfeksiyonun olup olmadığını ve hücrelerin tutunup tutunmadığını kontrol etmek için hücreler her gün rutin olarak takip edildi. Doku kültür flaskı üzerinde hücrelerin tutunmaya başladığı ilk gün veya hücreler ekildikten en geç 4-5 gün sonra ortamdaki doku parçalarını ve hücre artıklarını uzaklaştırmak için sadece bir kez olmak üzere hücreler 3 ml medyumunu ile yıkandı. Yıkanan hücrelere 5 ml medyum konuldu ve tekrar nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> ve % 95 atmosfer havası içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi. Doku kültür flaskı içindeki medyum bundan sonra 24-72 saat aralıklarla rutin olarak değiştirildi.

### 3.3.4. Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon)

Hücre kültür flaskı içinde % 80-90 oranında üreyen hücreler steril kültür kabini içine alındı. Hücrelerin bulunduğu hücre kültür flaskının medyumunu çekildi ve hücreler 37 °C'ye getirilmiş 5 ml kalsiyum ve magnezyum içermeyen HBSS (0.4 g/L potasyum klorid, 0.06 g/L potasyum fosfat, 8.0 g/L sodyum klorid, 0.04788 g/L sodyum fosfat, 1.0 g/L D-glukoz içermektedir) ile 1 kez yıkandı. HBSS ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra flaskın içine 5 ml 1X tripsin-EDTA (solüsyon % 0.05 tripsin ve % 0.02 EDTA içermektedir) konuldu ve 37 °C'lik etüvde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra flask 2-3 defa zemine hafifçe vurularak yapışmış hücrelerin ayrılması sağlandı. Flask içerisindeki tripsin-EDTA solüsyonu üzerine 5 ml medyum eklendi ve hafifçe çalkalandı. Hücre kültür flaskı içerisindeki tüm solüsyon steril bir şekilde 15 ml'lik plastik santrifüj tüpüne alındı. Tüp 200 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı ve dipte kalan pellet 1 ml medyum ile süspanse edildi. Süspanse edilen hücrelerden 1-2 damla thoma lamı üzerine damlatıldı ve hücreler 5 farklı alanda sayılarak ortalaması alındı. Çıkan değer 10<sup>6</sup> ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı. Daha sonra süspansiyon her bir flaskta 2X10<sup>5</sup> hücre ve son hacim 5 ml medyum olacak şekilde flasklara bölündü. Yeni kuşak flaskların medyumunu 24 saat sonra değiştirildi.



### 3.3.5. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi

Hücre kültür flaskı içerisindeki hücreler 2-3 ml kalsiyum ve magnezyum içermeyen HBSS ile 1 kez yıkandı. Yıkanan hücrelerin üzerine 5 ml 1X tripsin-EDTA konularak 5 dakika 37 °C'lik etüvde tripsinize edildi. Bu süre sonunda flask içine 5 ml medyum konuldu ve tüm süspansiyon 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne transfer edildi. Tüp 200 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet üzerindeki süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve dipte kalan pellet 3 ml medyum ile süspanse edildi. Bu hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak, 100 µl % 0.5'lik tripan blue ile süspanse edildi. Süspansiyondan thoma lamı üzerine damlatıldı ve hücreler mikroskopta 20X'lik büyütmeyle incelendi. Membranı mavi boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edildi.

### 3.4. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

#### 3.4.1. İmmünohistokimya Preparatları Üzerine Hücrelerin Stabilizasyonu

İmmünohistokimya preparatlarının hazırlanmasında ticari kit kullanıldı. Bu hazır ticari kit içerisindeki fare kökenli α-düz kas spesifik aktin antikoruna düz kas boyamaları için, fare kökenli Von Willebrand faktör antikoruna endotel boyamaları için, antibody dilüent antikor dilüsyonları için ve fare kökenli horse radish peroksidaz enzimiyle işaretli IgG2a antikoruna sekonder antikor olarak kullanıldı.

İmmünohistokimya için kullanılacak lamalar % 70'lik alkolden geçirildi, distile su ile yıkandı, kurutuldu ve otoklavlanarak steril hale getirildi. Lamalar üzerine steril ortamda 2 alan işaretlendi. 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flaskı içerisindeki hücreler 2-3 ml kalsiyum magnezyum içermeyen HBSS ile 1 kez yıkandı. Bu hücrelerin üzerine 5ml 1X tripsin-EDTA konularak 5 dakika 37 °C'lik etüvde tripsinize edildi. Süre sonunda flask içine 5 ml medyum konuldu ve 200 g'de 5

dakika santrifüj edilmek için tüm sıvı 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne transfer edildi. Santrifüj edildikten sonra pellet üzerindeki süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve dipte kalan pellet 2 ml medyum ile süspanse edildi. Lam üzerindeki işaretli alanlara bu süspansiyondan 100 µl konuldu. Hazırlanan lamlar büyük steril petri kaplarına konularak ağzı kapalı olacak şekilde etüvde inkübe edildi. Bir gün sonra lamlar üzerindeki hücre yoğunlukları kontrol edildi ve preparatların medyumunu değiştirildi. Lamlar üzerine hücreler tamamen yüzeyi kapladıktan ve tutunduktan sonra üzerilerindeki hücre medyumunu çekildi ve kalsiyum magnezyum içermeyen HBSS ile 1 kez yıkandı. Tekrar steril PBS ile yıkanan lamlar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Lamlar üzerinde tutunan hücre olup olmadığını anlamak için hemotoksilen eozin boyasıyla preparatların bir kısmı boyandı ve hücre dağılımlarına bakıldı. Kurutulan preparatlar -20 °C'ye kaldırıldı.

#### **Preparatlar immünohistokimyasal analizler için 4 gruba ayrıldı.**

Birinci grupta 1/800 ve 1/1600 dilüsyonda  $\alpha$ -aktin primer antikoru vasküler düz kas hücrelerini göstermek için kullanıldı.

İkinci grupta 1/500 ve 1/1000 dilüsyonda Von Willebrand faktör primer antikoru kullanılarak ortamdaki endotel hücrelerinin olup olmadığı gösterilmeye çalışıldı.

Üçüncü grupta 1/800 ve 1/1600 dilüsyonlarında sekonder antikor olan fare kaynaklı IgG2a çalışılarak izotip kontrolü yapıldı.

Dördüncü grupta kontrol için PBS kullanılarak normal boyama kontrolü yapıldı.

### 3.4.2. İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu Çalışma Prosedürü

**TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer Salın, 10 X konsantre):** Stok TBS tamponu hazırlamak için 60.55 g Tris ve 87.66 g NaCl tartılarak 800 ml distile su içinde çözüldü TBS stok solüsyonunun pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlandı ve final hacim 1000 ml olacak şekilde üzeri distile su ile tamamlandı. 1X TBS için stok (10X ) solüsyondan 100 ml alınıp 1 L'ye tamamlandı

**Aşağıdaki çalışma prosedürü takip edilerek immünohistokimyasal karakterizasyon işlemi yapıldı.**

1. Daha önce hazırlanmış olan preparatlar oda ısısında 5 dakika aseton tanklarına konularak inkübe edildi.
2. Aseton tanklarından çıkarılan preparatlar 20 dakika oda ısısında kurumaya bırakıldı
3. Kurutulan preparatlar TBS ile oda ısısında her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez yıkandı.
4. Yıkama sonrasında preparatlar 5 dakika bloklama solüsyonuyla bloklandı
5. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra lamlar üzerine primer antikor damlatılıp 45 dakika beklendi
6. Preparatlar TBS ile oda ısısında her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkandı
7. Yıkamadan sonra preparatlar üzerine sekonder antikor eklenip 30 dakika beklendi.

8. Preparatlar bir kez daha TBS ile oda ısısında her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkandı
9. Preparatlar üzerine biyotin-HRP kompleksinden oluşan enzim konularak 30 dakika sekonder antikora bağlanması için inkübe edildi.
10. İnkübasyondan sonra enzime özgün substrat olan Amino Etil Karbizol (AEC) ortama konulup 3-5 dakika inkübe edildi.
11. Preparatlar bir kez daha TBS ile yıkandı ve kurutuldu Kuruduktan sonra kayser jelatin ile kapatılıp karanlıkta buz dolabında saklandı.
12. Preparatlar mikroskop altında incelenip fotoğraf filmlerine aktarıldı

### **3.5. Kültüre edilmiş VDKH'nin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması**

#### **3.5.1. Lizis (Triton X-100) Tamponunun Hazırlanması**

Lizis tamponu hazırlamak için 200 ml 0.5 M NaF (sodyum florid), 50 ml 1 M HEPES, 50 ml 3 M NaCl (sodyum klorür), 2 ml 0.5 M MgCl<sub>2</sub> (magnezyum klorid), 4 ml 0.25 M EGTA, 10 ml 0.1 M PMSF (fenilmetansulfonilflorid), 10 ml 0.1 M Na-O-Va (sodyum orto vanadat), 20 ml 0.5 M Pyrophos, 10 mg/ml'lik leupeptin'den 1 ml, 10 mg/ml'lik aprotinin'den 1 ml, 10 mg/ml'lik pepstatin-A'dan 100 µl, 100 ml % 10'luk gliserol ve 12 ml Triton X-100 konularak son hacim 1 litre olacak şekilde bidistile su ilave edilerek hazırlandı

#### **3.5.2. PBS (Fosfat Tamponlu Salin, 10X konsantre)**

Stok PBS (10X) hazırlamak için 2 g KCl, 80 g NaCl, 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılıp 800 ml bidistile su içinde çözüldü. Stok PBS'in pH'sı 7.4'e

ayarlanarak son hacim 1 litreye tamamlanır. Kullanım esnasında 1/10 oranında bidistile su ile dilüe edilir.

### 3.5.3. VDKH Üzerine Kullanılan Aktivatörler

#### Anjiyotensin II

1 mg toz şeklindeki Ang II  $10^{-4}$  M olacak şekilde 9.5 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve 50 µl'lik alikotlara bölünüp  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Ang II ile inkübasyon esnasında 2 ml serum içermeyen medyum içine 20 µl pipetlenerek 100 nM'lık son konsantrasyon elde edildi.

### 3.5.4. VDKH Üzerine Kullanılan İnhibitörler

#### Losartan

$10^{-3}$  M losartan hazırlamak için 4.6201 mg tartılıp 10 ml PBS içinde çözüldü ve 250 µl'lik alikotlara bölünüp  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. VDKH'nin inhibisyonu esnasında 2 ml serum içermeyen medyum içine 20 µl pipetlenerek  $10^{-5}$  nM'lık son konsantrasyon elde edildi.

#### DPI

Karanlık ortamda toz halindeki 10 mg NAD(P)H inhibitörü olan DPI 1 mM olacak şekilde 31.7 ml DMSO içinde çözüldü ve 50 µl'lik alikotlara bölünüp  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta saklandı. VDKH'nin inhibisyonu esnasında 2 ml serum içermeyen medyum içine 20 µl pipetlenerek 10 µM'lık son konsantrasyon elde edildi.

#### FIS

Toz halindeki 10 mg Ras inhibitörü FIS havayla temas etmeyecek şekilde 2.79 ml %0.1'lik DMSO'da çözüldü. Çözülen FIS azot gazı altında 50 µl'lik alikotlara bölündü ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. VDKH'nin inhibisyonu esnasında 2 ml

serum içermeyen medyum içine 20 µl pipetlenerek 100 µM'lık son konsantrasyon elde edildi.

### 3.5.5. Lizat Hazırlama Metodu

6 ile 10'uncu kuşak arasındaki %80-90 oranında konfluent olan vasküler düz kas hücreleri her kuyucukta eşit sayıda hücre olacak şekilde 6-kuyucuklu petrilere pasajlandı. 6-kuyucuklu petrilere % 80-90 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi.

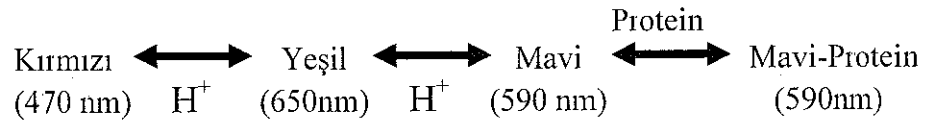
- ▣ % 80-90 yoğunluğa ulaşan VDK hücreleri medyum ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra bir kez serum içermeyen DMEM ile yıkandı
- ▣ 6-kuyucuklu petri içindeki VDK hücreleri serum içermeyen 2 ml DMEM (pH 7,4) ile 24 saat inkübe edildi.
- ▣ 6-kuyucuklu petrilere o an yapılacak olan deneye uygun aktivatör (Ang II) ve inhibitörler (losartan, DPI veya FTS) ile belirli zaman periyotlarında inkübe edildi.
- ▣ İnkübasyon süresi bittiği zaman hücreler buz üzerine alınarak medyumları hızlı bir şekilde pipetlenerek ortamdaki uzaklaştırıldı.
- ▣ Ortamda kalan medyum iyice temizlemek için hücreler 1 ml 1X PBS ile 2 kez yıkandı ve PBS ortamdaki uzaklaştırıldı.
- ▣ Hücrelerin üzerine buz soğukluğunda 200 µl lizis tamponu eklendi.
- ▣ 6-kuyucuklu petri içerisindeki hücreler, özel hücre kazıyıcısı yardımıyla kazındı ve 1.5 ml'lik plastik tüplere aktarıldı.

- ❑ Buz içerisinde konan plastik tüpler ultrasonik homojenizatör ile % 70-80 güçte 10 saniye sonike edildi.
- ❑ Sonikatör yardımıyla tam olarak parçalanmış hücrelerin organel ve membran artıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için +4 °C'de, 14000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi.
- ❑ Santrifüj sonrası temiz süpernatant kısmı western blott ve protein analizi için başka tüplere ayrıldı. Bu tüpler bir hafta içinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### 3.6. Lizatların Protein Miktarının Tayin Edilmesi

#### 3.6.1 Bradford Protein Ölçüm Yönteminin Prensibi (125)

Bradford protein ölçüm yönteminin temeli, *Coomassie Brilliant Blue G-250* boyasının üç formu arasındaki dengeye dayanır. Kuvvetli asidik ortamda bu boya iki defa protonlanmış, çok stabil ve kırmızı renkli bir formda bulunur. Boya proteine bağlandıktan sonra protonlarını kaybederek stabil ve mavi renkli bir forma dönüşür. Oluşan bu mavi rengin 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması Bradford protein ölçüm yönteminin temelini oluşturur.



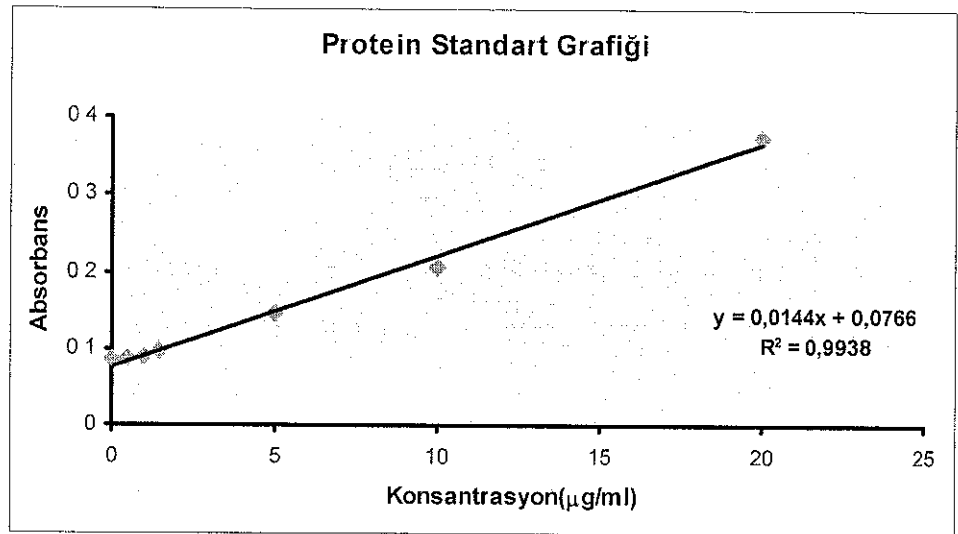
#### 3.6.2. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğin Hazırlanması

Protein standart grafiğinin çizilmesinde kitin içinde hazır olarak verilen 1.34 mg/ml'lik *Bovine Gamma Globulin* kullanıldı. Stok solüsyonu -20 °C de

saklandı. Bu stok solüsyondan 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 1.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dilüsyonlar hazırlanarak protein standart grafiği çizildi.

Protein ölçümü için kitin içinde hazır olarak verilen konsantre boya reaktifi kullanıldı. 450 ml'lik boya reaktifi içinde *Coomassie Brilliant Blue*, fosforik asit ve metanol bulunmaktadır.

Protein standartlarının ölçümü için 48- kuyucuklu petrilere 300 µl standart ve 75 µl boya reaktifi pipetlenerek karıştırıldı. 48-kuyucuklu petrilere oda ısısında 5 dakika inkübe edildikten sonra bir saat içinde reaktif körüne karşı 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Protein standartları çift olarak çalışıldı ve elde edilen sonuçların ortalamaları alındı. Okunan absorbans değerlerine göre konsantrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.6.1). Elde edilen denklem yardımıyla protein sonuçları µg/ml olarak hesaplandı.



Şekil 3.6.1 : Protein Standart Grafiği

### 3.6.3. Numunelerin Protein Miktarının Tayini

VDKH kültürlerinden uygun inkübasyonlar sonucu hazırlanan lizatların protein konsantrasyonları ölçüldü. Hazırlanan her bir lizattan 15 µl alınıp üzerine



285 µl bidistile su konuldu ve karıştırıldı. Bu şekilde numune 1/20 oranında dilüe edildi. Bu dilüsyonun üzerine 75 µl konsantre boya reaktifi pipetlendi. Hazırlanan numuneler iyice çalkalandıktan sonra oda ısında 5 dakika inkübe edildi ve bir saat içinde reaktif körüne karşı 595 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Numuneler çift çalışıldı ve elde edilen absorbanların ortalamaları alındı. Elde edilen absorban değerleri, standart grafiğinin yardımı ile örneklerin mililitresindeki mikrogram protein miktarının tayininde kullanıldı.

### **3.7. p38 MAPK Fosforilasyonunun SDS-PAGE ve Western Immünoblot Analizi**

Rat aortik düz kas hücre kültürlerinde uygun süre ve konsantrasyonlarda Ang II uyarımı sonrasında MAPK fosforilasyonunu göstermek ve bu fosforilasyon üzerine AT<sub>1</sub> reseptör blokörü losartan, NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI ve Ras blokörü FTS’nin rolünü saptamak için western blot tekniği uygulandı.

#### **3.7.1. SDS-PAGE Solüsyonların Hazırlanması**

**Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu:** 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid tartılarak 100 ml bidistile su içinde çözüldü.

**Ayrışma jeli tamponunu (resolving buffer; 1.5 M Tris, pH 8.8):** 9 085 g Tris tartıldı ve 20 ml bidistile su içinde çözüldü. Tamponun pH’sı 1.5 M HCl ile 8.8’e ayarlandı ve final hacim bidistile su ile 50 ml’ye tamamlandı. 0.2 g SDS tartılarak ayrışma jeli tamponunun içinde çözüldü. Solüsyon +4 °C’de saklandı.

**Yükleme jeli tamponu (stacking buffer; 0.5 M Tris, pH 6.8):** 6.05 g Tris tartıldı ve 40 ml distile su içinde çözüldü. Tamponun pH’sı 1N HCl ile 8.8’e ayarlandı. 0.4 g SDS tartılarak yükleme jeli tamponunun içinde çözüldü. Solüsyon +4 °C’de saklandığında 1 ay stabildir.

**Amonyum persülfat (%10; APS):** 0.5 g amonyum persülfat tartılarak 5 ml bidistile su içinde çözüldü. Hazırlanan % 10'luk APS 500 µl'lik alikotlara ayrılarak - 20 °C'de saklandı.

**TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin):** Hazır solüsyon olarak satın alınan TEMED amonyum persülfattan serbest radikalleri oluşmasını ve akrilamid ile bis akrilamidin polimerizasyonunu sağlamak için kullanıldı.

### 3.7.2. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması

Bu çalışmada, % 10'luk ayrışma ve % 5'lik yükleme kısımlarından oluşan iki farklı akrilamid jel kullanıldı. Bu iki farklı jel Tablo 3.7.1. de belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3.7.1. : Ayrışma ve yükleme jeli tamponlarının miktarları.

	Ayrışma jeli (%10)	Yükleme jeli (%5)
Distile Su	3,125 ml	1,525 ml
Resolving buffer (pH: 8,8)	1,875 ml	-
Stacking buffer (pH: 6,8)	-	0,625 ml
Akrilamid	2,5 ml	0,325 ml
% 10 APS	0,025 ml	0,0125 ml
TEMED	0,005 ml	0,0025 ml

### Jelin Dökülmesi İşlemi

- 1- Jelin döküleceği camlar distile su ile yıkandıktan sonra % 70'lik alkolden geçirildi ve kurutuldu.
- 2- İnce ön ve kalın arka cam uygun şekilde birleştirildi ve kışkaçlar yardımı ile sıkıştırıldı.

- 3- Camlar jel dökme aparatına dikey olarak yerleştirildi ve üsteki mandala tutturularak iyice sıkıştırıldı. Camlar arasına distile su pipetlenerek camların sızdırıp sızdırmadığı kontrol edildi.
- 4- Camlar arasındaki su dökülerek camlar kurutma kağıdıyla kurutuldu.
- 5- Tablo 3.7.1'deki miktarlarda ayrışma jelinin ilk 3 solüsyonu karıştırıldı ve 5 dakika beklendi. Süre bitiminde ilk önce APS ve sonra TEMED eklenerek jel alt üst edildi. Jel hızlı bir şekilde camlar arasına üstten 1.5 cm kalacak şekilde pipetlendi. TEMED polimerizasyon başlangıcında önemli bir rol oynadığından jel karışıma en son eklendi.
- 6- Jelin üzerindeki boş bırakılan kısma yavaş yavaş distile su pipetlendi. Bu şekilde jel üst yüzeyinin düzgün olması sağlandı.
- 7- Oda ısısında jelin donması için 60 dakika beklendi. Bu süre bitmeden 20 dakika önce yükleme jelinin (üst jel) tablo 3.7.1.'de belirtilen ilk 3 solüsyonu karıştırıldı. Süre sonunda alt jelin üzerindeki distile su boşaltıldı ve kurutma kağıdı ile kurutulduktan sonra iki cam arasına 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi.
- 8- Yükleme jelinin ilk üç solüsyonu karıştırıldıktan 15-25 dakika sonra karışıma APS ve TEMED eklendi. Hızlı bir şekilde karıştırılarak iki cam plak arasına tarağın içinde hava kalmayacak şekilde pipetlendi.
- 9- Yükleme jelinin donması için oda ısısında 20-30 dakika beklendi. Jel tamamen donduktan sonra camlar kısıkağların içerisinden çıkarıldı. Camlar üzerindeki jel artıkları temiz bir kağıt peçete ile silindi.

10- Camlar elektroforez için cihaza yerleştirildi ve cihazın kısıkaçları kapıtılarak camların sağlam bir şekilde durması sağlandı. Üzerinde pozitif ve negatif kutupların bulunduğu elektroforez cihazı elektroforez tankına yerleştirildi.

### **3.7.3. Elektroforez Çalışma Tamponu (Elektroforez Running Buffer, 5X Stok Solüsyon)**

15 g Tris, 72 g Glisin ve 5 g SDS tartılıp 1000 ml distile su içinde çözüldü. Çalışma esnasında bu stok solüsyon 1/5 (180 ml stok solüsyonu / 720 ml bidistile su) oranında dilüe edilerek elektroforez tankı içerisine yavaş bir şekilde boşaltıldı.

### **3.7.4. Elektroforez Yapılacak Numunelerin Hazırlanması**

**Numune Tamponu (Loading Dye, Laemli, 5X konsantre):** 10 ml gliserol, 10 ml % 10 SDS, 1,25 ml 1 M pH 6.8 Tris, 7.5 ml  $\beta$ -merkaptotanol ve brom fenol blue karıştırılıp 50 ml distile suya tamamlandı. Hazırlanan Laemli tamponu numune ile 1/5 oranında dilüe edilir.

### **Elektroforeze Konacak Örneklerin Hazırlanması**

- Daha önce protein miktarları tayin edilmiş lizatlardan her bir kuyucuğa yüklenen 25  $\mu$ l içerisinde 5-15  $\mu$ g protein ve toplam volüm 60  $\mu$ l olacak şekilde temiz ependorflara pipetlendi.
- Numuneler lizis tamponu ile 60  $\mu$ l'ye tamamlandı. Üzerine 15  $\mu$ l 5X laemli numune tamponu pipetlendi ve numuneler boya ile iyice karıştırıldı.
- Hazırlanan numuneler 5 dakika kaynayan suda inkübe edildi.

### 3.7.5. Elektroforez İşleminin Yapılması

- Çalışma tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankı içerisinde bulunan camların arasındaki taraklar çıkartıldı.
- Kuyucuklara ince uçlu enjektör ile hava enjekte edildi Bu şekilde kuyucuklar jel kalıntılarından temizlendi.
- İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan 5 µl protein standartı pipetlendi.
- Diğer kuyucuklara numuneler her kuyucukta 25 µl olacak şekilde pipetlendi.
- Numunelerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra uygun kutuplar bağlanarak tankın kapağı kapatıldı. Tank güç kaynağına bağlandı. Akım 80 V, 65 mA olacak şekilde numuneler elektroforez ile yürütüldü.
- Yaklaşık 2 saat sonra yükleme boyası jelden çıktığında elektroforez işlemi sona erdirildi.
- Jelin içinde bulunduğu camlar dikkatlice birbirlerinden ayrıldı
- Yükleme jeli ile yürütme jeli arasındaki çizgiden jel kesilerek yükleme jeli atıldı.
- Geniş bir kaba buz soğukluğundaki blotting tamponu konuldu Proteinleri içeren ayırma jelinin dört tarafı camlardan hafifçe kaldırıldı Jelin üzerinde bulunan cam blotlama tamponu içine jel alta gelecek şekilde daldırılarak jelin camdan ayrılması sağlandı.

### 3.7.6. Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması

**Blotlama Tamponu (Blotting Buffer 1 L, 10X stok solüsyon):** 12,11 g Tris, 30 g Glisin, 1 g Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) tartıldı ve 1 L distile suda çözüldü Kullanım esnasında 10X tampon 1X haline dönüştürülürken % 10 metanol eklendi. Metanol transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi için gereklidir.

Akdeniz Üniversitesi  
Rektörlüğü Kütüphanesi  
Demirbaş No. T. 1865

## Blotlama İşleminin Aşamaları

1. Jelin içinde bulunduğu buz soğukluğundaki blotting tamponu içerisine nitroselüloz membran, kurutma kağıtları ve süngerler konuldu. İyice ıslanmaları için 2-5 dakika tamponda bekletildi.
2. Blotlama aparatının arasına en alta transfer tamponu ile doyurulmuş sünger konuldu. Blotlama aparatının alt kısmı (siyah taraf) negatif uç olarak kabul edildi.
3. Süngerin üzerine blotlama tamponu ile doyurulan 2 adet kurutma kağıdı konuldu.
4. Jel kurutma kağıdının üzerine alt-üst kısımlarına dikkat edilerek yerleştirildi ve diğer iki kurutma kağıdının üzerine konuldu.
5. Jelin üzerini kaplayacak şekilde nitroselüloz membran yerleştirildi.
6. Membranın üzerine 3 adet blotlama tamponu ile doyurulan kurutma kağıdı konuldu.
7. Kurutma kağıtlarının üzerine blotlama tamponu ile doyurulan bir sünger daha konuldu ve boş bir tüp sandviç içindeki hava kabarcıklarını almak için silindir şeklinde süngerin üzerinden geçirildi. Sandviç aparatı üzerinden sıkıştırılarak kapatıldı.
8. Hazırlanan sandviçin kutupları aynı yere gelecek şekilde elektroforez tankına yerleştirildi ve tank blotlama tamponu ile dolduruldu.

9. Blotlama oda ısısında 200 mA'de magnetik balık ve magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak yapıldı Her 30 dakika bir tankın ısınmasını engellemek için buz kabı değiştirildi.
10. 60-90 dakika sonra sandviç tanktan çıkartıldı ve membranlar TBS içine konularak yıkandı.

### 3.7.7. Membranların Antikor ile İşaretlenmesi

**TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer Salın, 10X):** 60.55 g Tris ve 87.66 g NaCl 800 ml bidistile suda çözüldükten sonra pH, HCl ile 7.4'e ayarlandı Son hacim 1000 ml olacak şekilde üzeri bidistile su ile tamamlandı Çalışma esnasında TBS stok solüsyondan (10X ) 100 ml alınıp 1 L'ye tamamlandı.

**TBST (1X):** TBS stok solüsyondan (10X) 100 ml alınıp 1 L'ye tamamlandı. Bu solüsyon içine 1 ml Tween-20 eklendi ve iyice karıştırıldı.

**Bloklama Çözeltisi (% 5' lik Süt Tozu):** %5'lik bloklama çözeltisi için 0,5 g yağsız süt tozu tartılarak 10 ml TBST içerisinde çözüldü. Solüsyon magnetik karıştırıcıda karıştırılarak tam olarak çözünmesi sağlandı.

**Fosfo- p38 MAPK Primer Antikoru:** Primer antikor -20 °C'de saklandı. Deney esnasında 1:2000 dilüsyon kullanıldı. 10 ml TBS içinde 0,5 g yağsız süt tozu çözüldü ve 5 µl primer antikor eklendi.

**HRP (Horse-Radish Peroxydase) konjuge α-mouse Sekonder Antikoru:** Enzim işaretli, tavşan kökenli sekonder antikor +4 °C'de saklandı 1:2000 oranında dilüe edilerek kullanıldı. 10 ml TBS içinde 0,5 g yağsız süt tozu çözüldü ve 5 µl primer antikor eklendi

**ECL (Enhanced Chemiluminescence):** ECL-1 ve ECL-2 olmak üzere kit içinde hazır olarak bulunan kromojenik solüsyon çalışma esnasında 1/1 oranında karıştırılarak kullanıldı.

■ **Membranları Antikorlarla İşaretleme Prosedürü**

- Membran TBS ile 2-3 defa yıkandıktan sonra temiz ve membranın sığabileceği büyüklükte bir petri kabında alındı.
- Membranın üstünü örtecek şekilde bloklama çözeltisi ilave edildi ve 1 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- Membran 10'ar dakika TBST ile 3 kez yıkandı. Bu arada fosfo-p38 MAPK antikoruna hazırlandı.
- Gece boyunca membranlar fosfo-p38 MAPK primer antikoruna ile +4 °C'de hafifçe çalkalanarak inkübe edildi.
- Antikoru içeren çözelti inkübasyondan sonra döküldü ve membranlar 10'ar dakika 3 kez TBST ile hafifçe çalkalanarak yıkandı. Bu şekilde zayıf olarak bağlanan ve bağlanamamış antikorların membran üzerinden temizlenmesi sağlandı.
- TBST ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra HRP işaretli sekonder antikor ile membranlar 1 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi.
- Bu süre sonunda membranlar tekrar TBST ile 10'ar dakikada 3 kez yıkandıktan sonra bağlı olmayan sekonder antikorlar ortamdan uzaklaştırılmış oldu.
- Yıkama işlemi sonunda membranlar üzerindeki yıkama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı. Membranlar pens yardımıyla alındı ve üzerindeki solüsyon temiz bir kurutma kağıdına emdirildi.



- Membranlar hızlı bir şekilde temiz ve düzgün bir yüzeye yerleştirildi. Membranların üzerine ECL-1 ve ECL-2 1/1 oranında karıştırılarak tüm yüzeyi kaplayacak şekilde hafifçe pipetlendi. Membranlar bu şekilde 3 dakika bekletildi.
- Membran üzerindeki ECL sürenin sonunda temiz bir kurutma kağıdına emdirildi. Membranlar hızlı bir şekilde naylon streç film üzerine yerleştirildi.
- Membranın üzeri de streç film ile kaplandıktan sonra membran film kasetinin içerisine bantlandı.
- Kaset hızlı bir şekilde karanlık odada götürüldü.

### **3.7.8. Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması**

Kemilüminesans sinyallerin aktarılmasında yüksek afiniteli film kullanıldı (Hyperfilm). Developer, total hacim 500 ml olmak üzere 1/10 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Fiksatifte aynı şekilde total hacim 500 ml olmak üzere 1/10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

### **Membrandaki Sinyalleri Filme Aktar ma İşlemleri**

- Karanlık odaya götürülen kasetteki membranların üzerine karanlıkta film konuldu ve kasetin kapağı iyice kapatıldı.
- Membrandaki sinyallerin filme geçmesi için 5 dakika beklendi. Bu arada developer ve fiksatif 20 x 30 cm'lik tabanı düzgün plastik kaplara boşaltıldı.

- 5 Dakika sonunda kaset açıldı ve membran üzerindeki film karanlık ortamda developer'ın içine konuldu. Filmin üzerinde sinyaller görününceye kadar hafifçe sallandı
- Sinyaller görününce film hızlı bir şekilde developer içinden alınarak fiksatif içerisine konuldu
- Film tam olarak fikse olduktan sonra fiksatiften çıkarılarak distile su içerisine konuldu. Film distile suda iyice yıkandıktan sonra kuruması için temiz bir yere asıldı.

Filmler üzerindeki sinyaller membranlardaki protein standartları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### **3.7.9. Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi**

Filme aktarılan sinyaller tarayıcı ile taranarak bilgisayar ortamına alındı. Bilgisayar ortamında Windows XP işletim sisteminde çalışan *Igdoc 1000* programı ile grafik haline dönüştürüldü. Kontrol bandın yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve her grupta diğer bandlar 100 birim üzerinden değerlendirildi.

## BULGULAR

### 4.1. VDK Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Olarak Tanımlanması

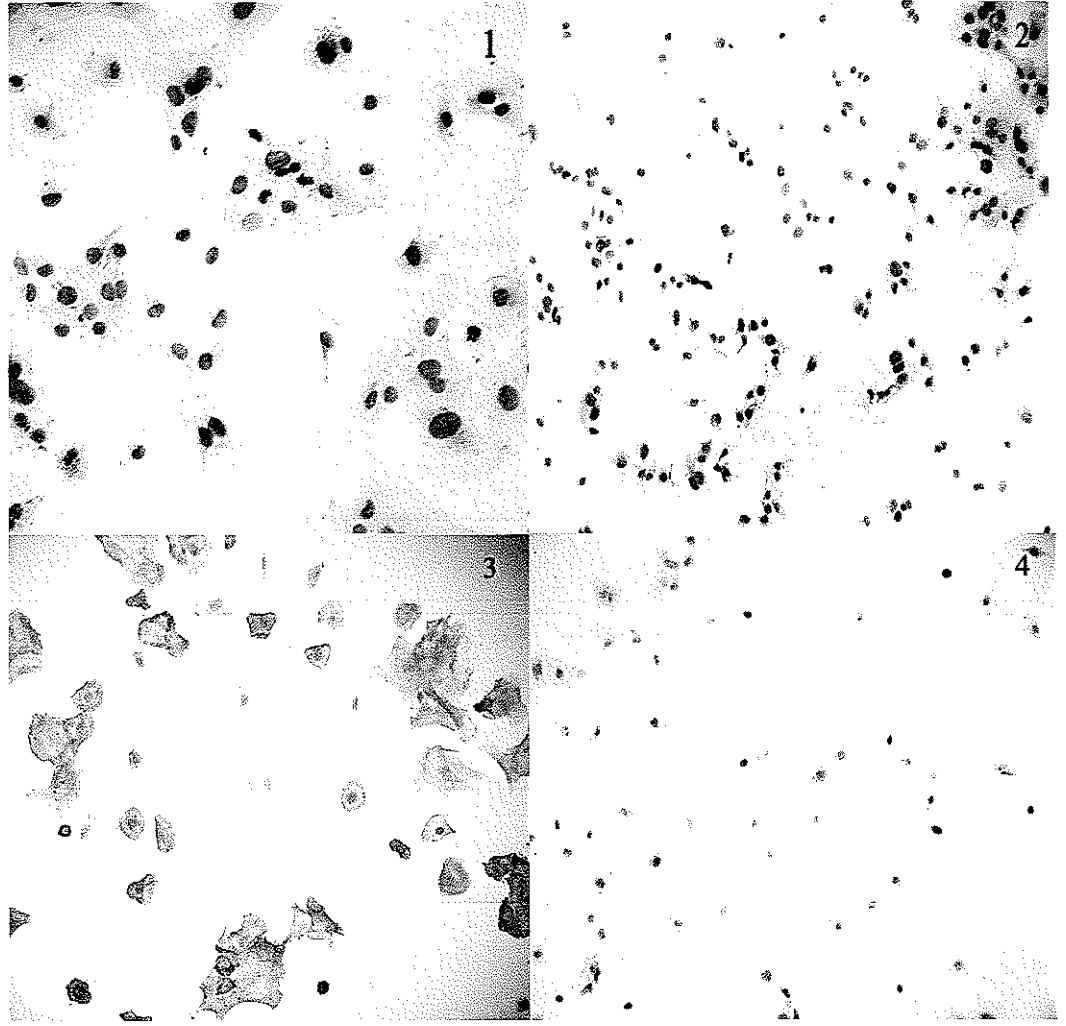
Rat aortasından izole edilen ve primer kültürü yapılan hücrelerinin, vasküler düz kas hücresi olduğunu gösterebilmek amacı ile hazırlanan preparatlara immünohistokimya yapıldı. İmmünohistokimya tekniği, izole edilip primer hücre kültürü ortamına aktarılan hücrelere ikinci kuşak sonunda uygulandı. Primer kültüre aktarılan hücreler lamalar üzerinde üretildi ve immünohistokimyasal karakterizasyon için uygun preparatlar haline getirildi.

Hazırlanan immüno preparatlar 4 gruba ayrılarak çalışıldı.

1- Kontrol Grubu: Yapılan İmmünohistokimyasal analizler için kontrol amaçlı olarak kullanıldı. Bu gruplarında boyama olmaması boyamaların primer antikora spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1.1-1).

2- İzotip Kontrolü: Bu grup boyanmaların sekonder antikordan kaynaklanıp kaynaklanmadığını göstermek amacıyla kullanıldı. Preparatlarda boyama olmaması boyanmaların primer antikora spesifik olduğunu ve sekonder antikordan kaynaklanan boyamanın olmadığını gösterdi (Şekil 4.1.1-2)

3-  $\alpha$ -Aktin Grubu: Yapılan preparatlarda vasküler düz kas hücrelerini gösterebilmek için düz kas hücrelerinin  $\alpha$ -aktin'leri, VDK hücrelerine spesifik  $\alpha$ -aktin primer antikoru ile boyandı. Preparattaki kırmızı boyalı alanlar  $\alpha$ -aktin'e spesifik düz kas hücrelerini göstermektedir (Şekil 4.1.1-3). Şekil 4.1.1-3'deki bu boyamalar izole edip ürettiğimiz hücrelerin vasküler düz kas hücresi olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.1.1.: Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Olarak Tanımlanması.** 1, kontrol gruplarını; 2, izotip kontrolünü; 3, vasküler düz kas hücrelerinin  $\alpha$ -aktin'lerini; 4, endotel hücrelerinin von willebrand faktör boyamalarını göstermektedir. Boyalı alanlar kırmızı renkli görünmektedir.

4- Von Willebrand Faktör Grubu. Rat aortasından izole edilerek primer hücre kültürü ortamına aktarılan hücrelerde endotel hücresi bulunup bulunmadığını göstermek amacıyla, Von Willebrand Faktörüne karşı primer antikor kullanılarak hücreler boyandı. Preparatlarda kırmızı boyalı alanların varlığı ortamda endotel hücresi bulunduğunu gösterir. Şekil 4.1.1-4'te kırmızı boyalı alanların olmayışı izole edilen hücrelerde endotel hücresi bulunmadığını göstermektedir.

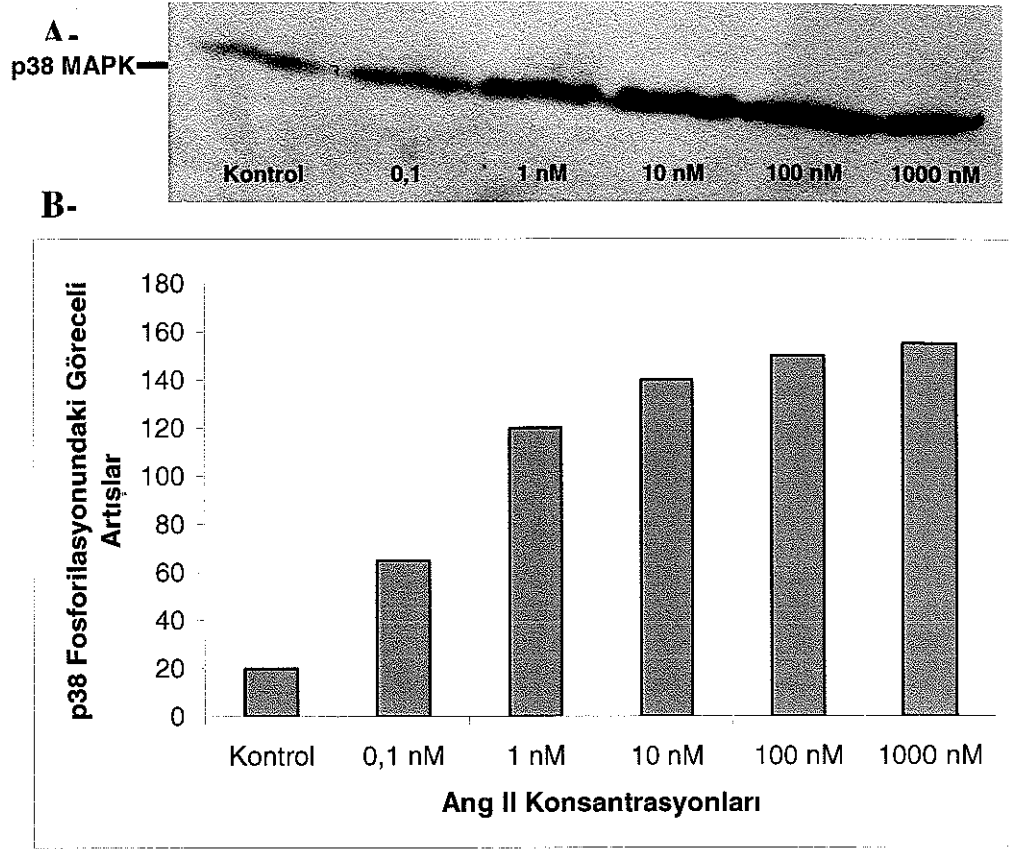
## 4.2. Kültüre Edilmiş Vasküler Düz Kas Hücrelerinin Canlılık Oranı

Primer kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerine western blot için lizat hazırlamadan önce hücre canlılığı testleri uygulandı. Kültüre edilen hücrelerin % 99'nun canlı hücreler olduğu tespit edildi. Hücre cevaplarının standardize etmek açısından üretilen hücrelerin 3-8 pasajları deney aşamasına alındı.

## 4.3. p38 MAPK Fosforilasyonunun Western Blot ile Gösterilmesi

### 4.3.1. VDK Hücrelerinde Ang II Uyarımı sonucunda Konsantrasyon Bağımlı Şekilde p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu

Primer olarak kültüre edilen VDK hücrelerinde Ang II'nin, p38 MAPK'ı aktive eden en iyi konsantrasyonunu bulabilmek için 6 kuyucuklu petri kabı içerisindeki hücre kültürleri 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1000 nM olmak üzere beş farklı Ang II konsantrasyonu ile 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve protein miktarları ölçüldü. Her kuyucuğa eşit miktarda protein düşecek şekilde western blot yapılarak p38 MAPK aktivasyonları incelendi. Western blot sonucunda kontrol gruplarına göre 100 nM'a kadar konsantrasyon artışıyla birlikte fosforilasyon artışı da saptandı. 10, 100 ve 1000 nM konsantrasyonlardaki fosforilasyon artışları birbirine yakın olmasına rağmen p38 MAPK'ın en iyi aktive eden konsantrasyon 100 nM olarak bulundu (Şekil 4.3.1.A). Bu sonuçlar Ang II'nin, VDK hücrelerini doza bağımlı bir şekilde aktive ettiğini göstermektedir. MAPK aktivasyonunu veya inhibisyonunu göstermek amacıyla yapılan tüm deneylerin western blot sonuçları 5 tekrar olarak çalışıldı. Elde edilen western blot sonuçlarının daha iyi anlaşılabilmesi için bant yoğunluklarının dansitometrik analizi yapılarak grafik ortamına aktarıldı (Şekil 4.3.1.B).

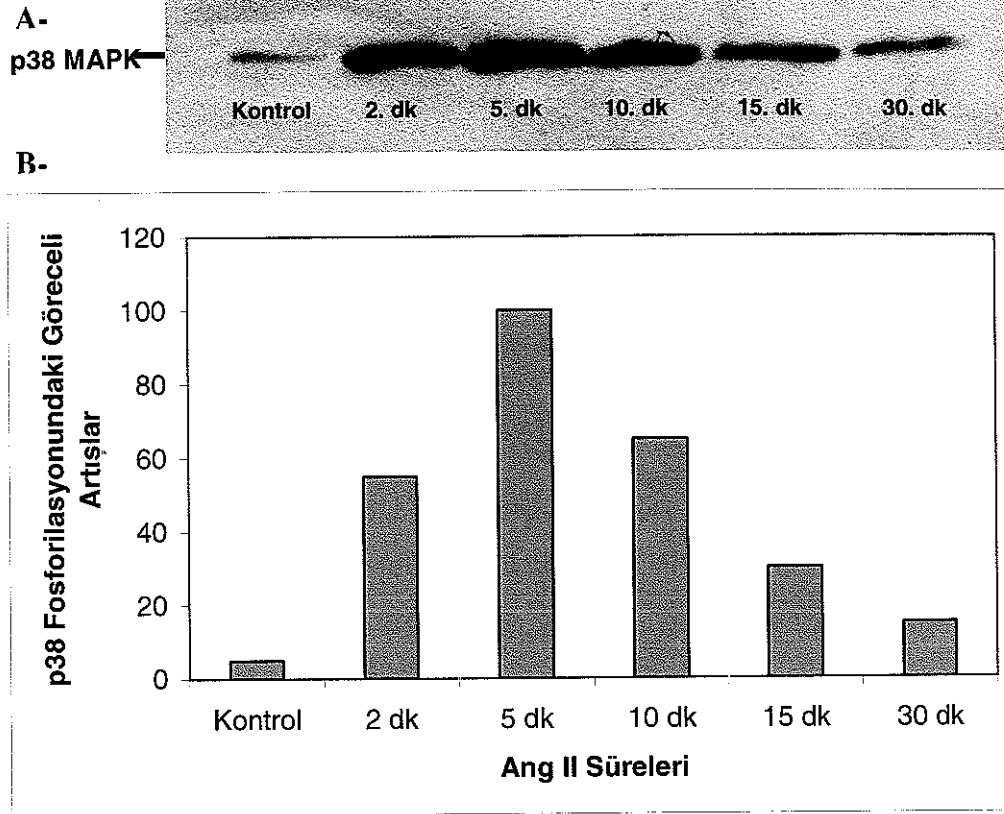


**Şekil 4.3.1.: Ang II'nin farklı konsantrasyonlarının VDKH'lerinde p38 MAPK üzerine etkisi.**

VDKH kültürleri Ang II'nin 0,1, 1, 10, 100 ve 1000 nM konsantrasyonlarında inkübe edildi ve p38 MAPK aktivasyonları incelendi **A.** p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. **B.** Bu p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmesi 100 nM Ang II konsantrasyonunun p38 MAPK'ı en yüksek noktada fosforile ettiği gözlemlendi.

#### **4.3.2. Ang II'nin VDK Hücrelerinde Süre Bağımlı Şekilde p38 MAP Kinazı Fosforilasyonu**

Ang II'nin en iyi p38 MAP kinaz aktivasyon süresini belirlemek için hücreler, 100 nM Ang II ile 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika olmak üzere 5 farklı sürede aktive edildi. Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve protein miktarları ölçüldü. Her kuyucuğa eşit miktarda protein düşecek şekilde western blot analizi



**Şekil 4.3.2.: Ang II'nin VDKH kültürlerinde farklı sürelerde p38 MAPK aktivasyonları.**

Hücreler 100 nM Ang II ile yukarıdaki sürelerde inkübe edildi ve p38 MAPK fosforilasyonları incelendi. **A.** p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi. **B.** p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmesi VDKH kültürlerinde 100 nM Ang II'nin 5. dakikada p38 MAPK'ı maksimum fosforile ettiği gözlemlendi.

yapılarak p38 MAPK aktivasyonları incelendi (Şekil 4.3.2.A) Kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon olurken 2 ve 5. dakikalarda aktivasyon artışı saptandı. 5. dakikada maksimum seviyeye çıkan aktivasyon sonra giderek azaldı ve 30 dakikada bazal seviyedekine yakın bir düzeye geldi. Bu western blot sonuçları 100 nM Ang II'nin p38 MAPK'yı 5. dakika maksimum aktive ettiğini gösterdi (Şekil 4.3.2.A). Şekil 4.3.2.B'de western blot sonuçlarının grafiğe aktarılmış hali gösterilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan western blot deneylerinde Ang II 100 nM konsantrasyonda ve 5 dakika boyunca kullanılmıştır.

### 4.3.3. Ang II'nin VDK Hücrelerinde AT<sub>1</sub> Reseptörü Üzerinden p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu

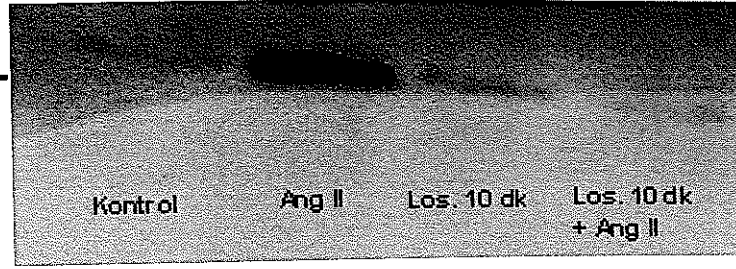
Çalışmanın bu aşamasında Ang II'nin MAP kinaz ailesinin bir üyesi olan p38 MAPK'ı fosforile eden sinyallerinin AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden gerçekleştiği göstermek için AT<sub>1</sub> reseptör antagonisti olan losartan kullanıldı. Kültüre edilmiş VDKH'leri, literatürdeki verilere uygun olarak 10 dakika süre ile 10<sup>-5</sup> M losartan ile inkübe edildi.

Elde edilen western blot sonuçlarına göre birinci band hiçbir uyarım olmadan lizis edilen ve kontrol olarak kullanılan VDKH'lerini göstermektedir. Bu bantta bazal düzeyde bir fosforilasyon gözlemlendi. İkinci bantta VDKH kültürleri 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Bu konsantrasyon ve sürede p38 MAPK'da çok güçlü bir fosforilasyon gerçekleştiği gösterildi. Üçüncü bantta VDKH kültürleri 10<sup>-5</sup> M, 10 dakika losartan ile inkübe edildi. Bu hücreler Ang II ile aktive edilmedi. Bu bantta da bazal düzeyde bir gerçekleştiği gösterildi. p38 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmesi için Ang II aktivasyonunun gerekli olduğu görüldü. Dördüncü bantta VDKH kültürleri yine 10<sup>-5</sup> M, 10 dakika losartan ile inkübe edildi ve ardından hücreler Ang II ile uyarıldı. Hücrelerde Ang II uyarımı olduğu halde AT<sub>1</sub> reseptörü inhibe edildiği için p38 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmediği ve kontrol seviyesinde kaldığı saptandı (Şekil 4.3.3.A).

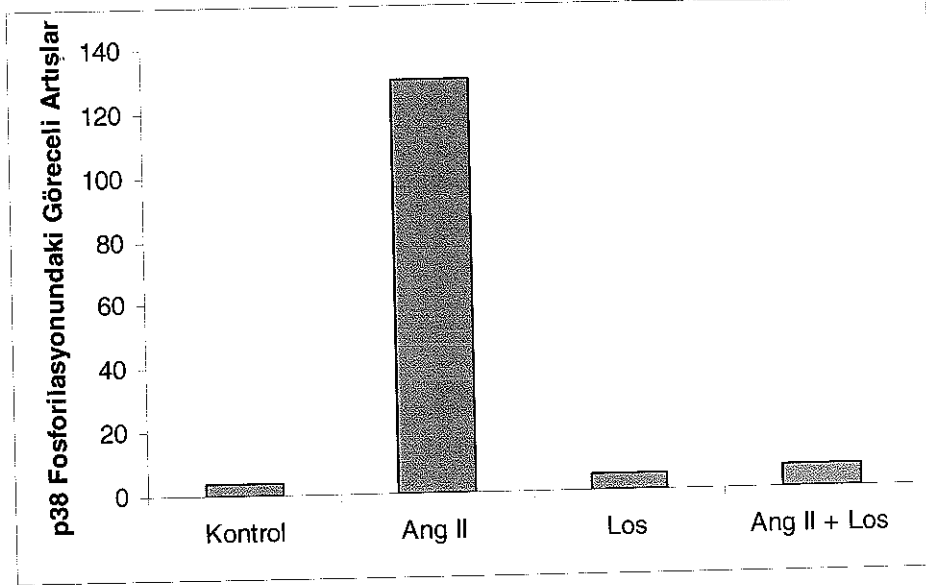
Elde edilen bu western blot sonuçlarına göre VDKH'lerinde Ang II uyarımından sonra p38 MAPK fosforilasyonu AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden gerçekleşmektedir. Losartan 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda ve 10 dakika boyunca uygulandığında AT<sub>1</sub> reseptörünü etkili bir şekilde bloke etmektedir. Şekil 4.3.3.B de western blot sonuçlarının grafiğe aktarılmış hali gösterilmektedir.



A-  
p38 MAPK



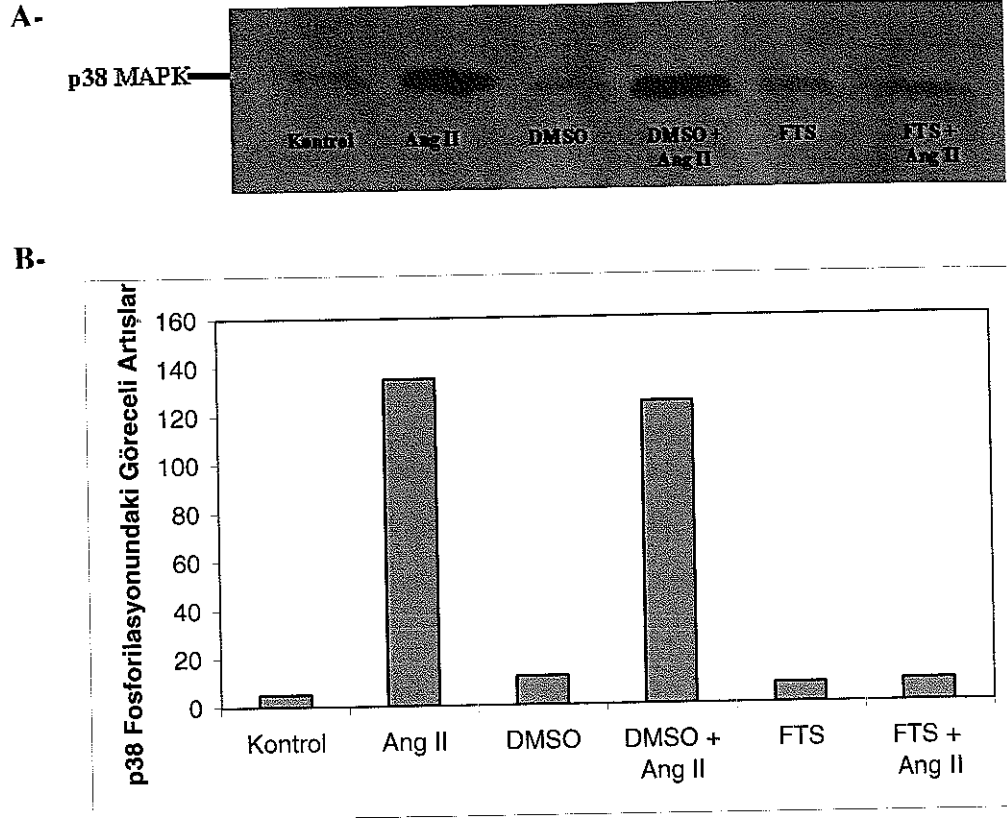
B-



**Şekil 4.3.3.: VDKH kültürlerinde AT<sub>1</sub> reseptörünün rolü** VDKH kültürlerinde hiçbir aktivasyon ve inhibisyonun olmadığı alan kontrol olarak kabul edildi 2 alanda hücreler 100 nM Ang II ile uyarıldı ve p38 MAPK fosforilasyonu izlendi 3 alanda hücreler 10 dakika 10<sup>-5</sup> M losartan ile inkübe edildi ve Ang II uyarımı yapılmadı. 4. alanda hücreler 10 dakika 10<sup>-5</sup> M losartan ile inkübe edildi ve ardından 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. A. p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. B. p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmiştir

#### 4.3.4. Ang II'nin VDK Hücrelerinde MAPKKK Üzerinden p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu

VDKH kültürlerinde Ang II'nin AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden aktive olan G proteinleri üzerinden Ras aracılığıyla MAPKK üzerinden p38 MAPK aktivasyonu incelendi (Şekil 4.3.4)



**Şekil 4.3.4.: VDKH kültürlerinde p38 MAPK aktivasyonunda Ras'ın rolü** **A.** p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. Yukarıda görülen birinci band kontrol olarak kabul edildi. İkinci band da hücreler 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Üçüncü band da VDKH kültürleri 12 saat DMSO ile inkübe edildi. Dördüncü band da hücreler 12 saat DMSO ile inkübe edildikten sonra 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Beşinci banda da hücreler yalnızca Ras inhibitörü FTS ile 10  $\mu$ M konsantrasyonda 12 saat inkübe edildi. Altıncı band da hücreler 10  $\mu$ M, 12 saat RAS inhibitörü FTS ile inkübe edildi ve ardından 100 nM Ang II uyarıldı. Ortamda bulunan RAS inhibitörü FTS, 10  $\mu$ M konsantrasyonda ve 12 saat sürede Ang II uyarımlı p38 MAPK aktivasyonunu tamamen baskıladı. **B.** p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmiştir.

Western blot'ta görülen birinci band kontrol olup ikinci bandta hücreler 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı ve kontrole göre artmış seviyede p38 MAPK aktivasyonu görüldü.

Deneyde kullanılan Ras inhibitörü FTS, DMSO içinde çözündüğünden, DMSO'nun etkisini gözlemek için üçüncü bandta VDKH kültürleri 12 saat DMSO

ile inkübe edildi. Ang II uyarımı olmadığı için MAPK aktivasyonunda bir artış saptanmadı.

Dördüncü bantta hücreler 12 saat DMSO ile inkübe edildikten sonra 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Ortamda Ang II olduğu ve DMSO'nun hücre kültürlerinde herhangi bir aktivatör veya inhibitör etkisi olmadığı için p38 MAPK aktivasyonu görüldü.

Beşinci bantta hücreler yalnızca Ras inhibitörü FTS ile 10  $\mu$ M konsantrasyonda 12 saat inkübe edildi. Ras inhibe olsa dahi ortamda bir aktivatör olmadığı için p38 MAPK fosforilasyonunda bir artış görülmedi.

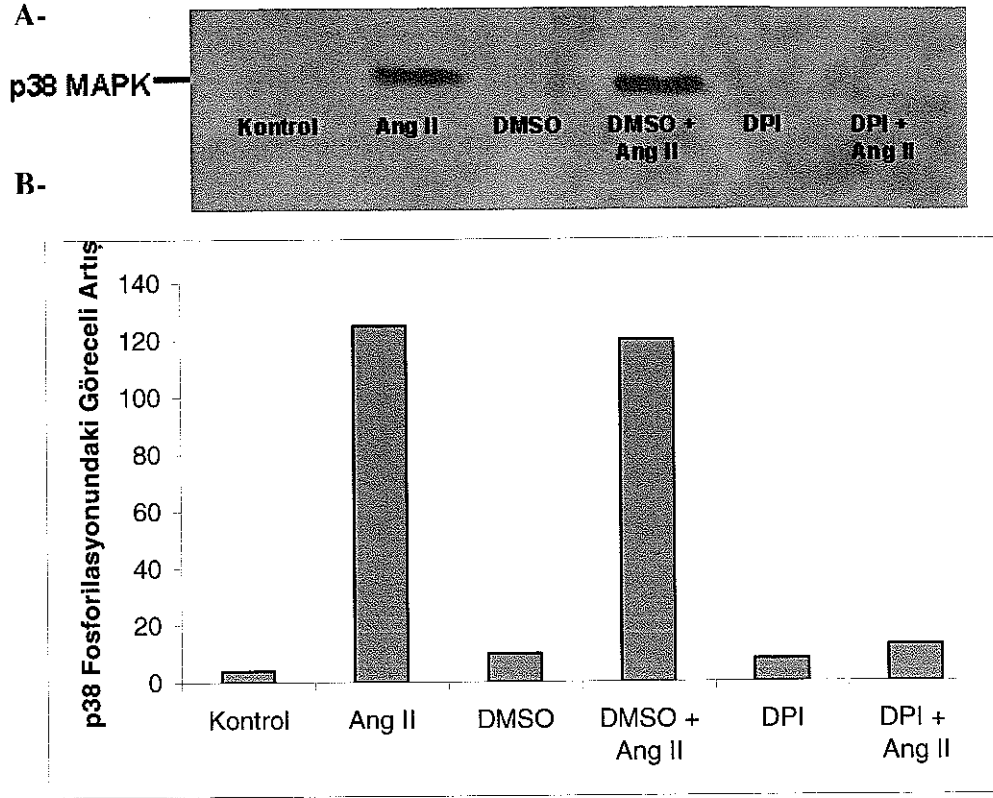
Altıncı bantta hücreler 10  $\mu$ M, 12 saat Ras inhibitörü FTS ile inkübe edildi ve ardından 100 nM Ang II uyarıldı. Ortamda bulunan Ras inhibitörü FTS, 10  $\mu$ M konsantrasyonda ve 12 saat sürede Ang II uyarımlı p38 MAPK aktivasyonunu tamamen baskıladı. Şekil 4.3.4 B'de western blot sonuçlarının grafiğe aktarılmış hali gösterilmiştir.

#### **4.3.5. Ang II'nin VDK Hücrelerinde NADH/NADPH Oksidaz Üzerinden p38 MAP Kinaz Fosforilasyonu**

VDKH kültürlerinde Ang II'nin AT1 reseptörü üzerinden NADH/NADPH oksidaz aracılığıyla p38 MAPK aktivasyonu incelendi (Şekil 4.3.5.A)

Western blot sonuçlarının gösterildiği birinci bantta VDKH kültürleri herhangi bir aktivatör veya inhibitör ile uyarılmadı ve kontrol olarak kullanıldı.

İkinci bantta ise hücreler 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. P38 MAPK aktivitesinde Ang II uyarımından kaynaklanan büyük bir artış saptandı.



**Şekil 4.3.5.: VDKH kültürlerinde p38 MAPK aktivasyonunda NADH/NADPH oksidaz'ın rolü. A.** p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. Birinci alan kontrol olarak kullanıldı. İkinci alanda ise hücreler 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Üçüncü alanda hücreler NADH/NADPH oksidaz inhibitörü DPI'ın içinde çözüldüğü DMSO ile 30 dakika inkübe edildi. Dördüncü alanda ise hücreler üçüncü alandan farklı olarak Ang II ile uyarıldı. Beşinci alanda görülen VDK hücreleri 20  $\mu$ M, 30 dakika NADH/NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübe edildi. Altıncı alanda VDKH kültürleri 20  $\mu$ M, 30 dakika NADH/NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübe edildi ve ardından 100 nM Ang II uyarıldı. **B.** p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmiştir.

Üçüncü bantta hücreler NADH/NADPH oksidaz inhibitörü DPI'ın içinde çözüldüğü DMSO ile 30 dakika inkübe edildi. Ortamda Ang II aktivasyonu olmadığı için kontrol seviyesinde bir fosforilasyon saptandı.

Dördüncü bantta ise hücreler üçüncü alandan farklı olarak Ang II ile uyarıldı ve kontrol gruplarına göre Ang II uyarımından kaynaklanan bir aktivasyon görüldü. Bu sayede ortamda DMSO kaynaklanan herhangi bir inhibisyon veya aktivasyon olmadığı gösterildi.

Beşinci bantta götülen VDK hücreleri 20 µM, 30 dakika NADH/NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübe edildi. Ang II'den kaynaklanan bir aktivasyon olmadığı için fosforilasyon gözlenmedi.

Altıncı bantta VDKH kültürleri 20 µM, 30 dakika NADH/NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübe edildi ve ardından 100 nM Ang II uyarıldı. NADH/NADPH oksidaz inhibitörü DPI, 20 µM konsantrasyonda ve 30 dakika sürede Ang II uyarımlı p38 MAPK fosforilasyonunu tamamen baskılamamasına karşın bir fosforilasyon düşüşü saptandı. Şekil 4.3.5.B'de western blott sonuçlarının grafiğe aktarılmış hali gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Güçlü bir damar kasıcı ajan olan Ang II, vasküler düz kas hücreleri üzerinde birçok etkileri olan çok fonksiyonlu bir peptiddir. Bu peptid kan basıncının, sodyum ve su dengesini, nöronal fonksiyonları ve nörohumoral sistemi düzenlenmesinde önemli rol oynar (1,2) Ayrıca Ang II, damar duvarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün kontrolünde temel rol oynamaktadır (1) Son yıllarda yapılan birçok çalışmada bu peptidin hipertansiyon'un yanısıra ateroskleroz, miyokard infarktüsü, vasküler ve miyokardiyal yeniden düzenlenme ile konjestif kalp yetmezliğinin gelişmesinde de rol oynadığı gösterildi (2) Ang II sinyal iletim yollarının incelenmesi bu kardiyovasküler hastalıkların altında yatan temel mekanizmaların anlaşılması için gereklidir. Kardiyovasküler hastalıklarda p38 MAPK'nın oksidatif stres ile yönlendiriliyor olması ve oksidatif stresin bu tür hastalıklardaki rolü nedeniyle; çalışmamızda Ang II uyarımlı p38 MAPK aktivasyonunda Ras inhibitörü FTS ve NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI'nın rolü incelendi

Bu çalışmada ilk önce rat aort kökenli vasküler düz kas hücreleri izole edildi ve primer kültür ortamına aktarıldı Primer kültür ortamına aktarılan hücrelerin vasküler düz kas hücresi olduğunu gösterebilmek için primer kültürü yapılan hücrelere immünohistokimya tekniği uygulandı İmmünohistokimya için hazırlanan preperatlar  $\alpha$ -aktin ile boyanarak vasküler düz kas hücresi olduğu gösterildi Primer kültürü yapılan hücrelerin arasında endotel hücresi olup olmadığını anlamak için preperatlar von willebrand faktör ile boyandı Bu şekilde primer kültürü yapılan vasküler düz kas hücreleri arasında endotel hücresi olmadığı saptanmıştır. İmmünohistokimya için yapılan bu boyamaların primer antikora spesifik olduğunu göstermek ve sekonder antikordan kaynaklanan istenmeyen boyamaların olmadığını göstermek için ayrıca izotip boyamaları yapıldı Böylece boyamaların primer antikora spesifik olduğu ispatlandı (Şekil 4.1.1).

Daha önce yayımlanan birçok çalışmada Ang II'nin, VDK hücrelerinde p38 MAPK'ı süre ve doza bağımlı bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir (3,126). Hem Ushio-Fukai ve arkadaşlarının hem de Meloche ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda Ang II'nin vasküler düz kas hücrelerinde p38 MAPK'ı 100 nM konsantrasyonda ve 5 dk süre içerisinde aktive ettiği saptanmıştır (3,126). Bu çalışmada da kendi laboratuvar şartlarımızda üretilen vasküler düz kas hücrelerinin Ang II uyarımı sonrasında literatüre uyumlu olup olmadığını saptamak amacıyla konsantrasyon ve süre deneyleri yapılmıştır.

Yaptığımız çalışmada primer vasküler düz kas hücre kültüründe Ang II'nin, p38 MAPK'ı aktive eden en iyi konsantrasyonunu bulabilmek amacıyla hücreler sırasıyla Ang II'nin 0, 1, 10, 100 ve 1000 nM farklı konsantrasyonları ile 5 dk inkübe edilmiştir (Şekil 4.2.1). İnkübasyon sonunda kontrol gruplarına göre konsantrasyona bağımlı bir şekilde 100 nM'a kadar fosforilasyon artışı saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre maksimum aktivite artışı 100 nM konsantrasyonda olduğu belirlendiğinden, p38 MAPK fosforilasyonu için en uygun konsantrasyonunun 100 nM olduğu bulunmuştur.

Primer VDKH kültürlerinde Ang II'nin p38 MAPK fosforilasyonuna neden olan en uygun konsantrasyonun 100 nM olduğu bulunduktan sonra 6 kuyucuklu plaklar içerisindeki vasküler düz kas hücre kültürleri sırasıyla 0, 2, 5, 10, 15 ve 30 dakikalık sürelerde 100 nM Ang II ile aktive edildi (Şekil 4.2.2). Yapılan bu deneyde, kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon olurken 2. dakikada aktivasyon artışı saptanmış, 5. dakikada aktivasyon maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu süreden sonra aktivasyonun düştüğü ve 30. dakika sonrasında bazal düzeye döndüğü görülmüştür. Yapılan ilk iki deney sonucunda VDKH'lerinde 100 nM Ang II'nin p38 MAPK'ı 5. dakikada maksimum aktive ettiği gösterilmiştir. Bulunan bu sonuçların Meloche ve arkadaşlarının ile Ushio-Fukai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (3,126). Bu aşamadan sonra yapılan çalışmalarda Ang II; 5 dakika ve 100 nM konsantrasyonda kullanılmıştır.

Şu ana kadar yapılan birçok çalışmada vasküler düz kas hücrelerinde Ang II'nin, MAPK ailesini AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden aktive ettiği gösterilmiştir (3,9,127) Kubo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada vasküler düz kas hücrelerinin AT<sub>1</sub> reseptör antagonisti olan losartan ile 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda 10 dakikada boyunca inkübe edildiğinde, AT<sub>1</sub> reseptörünün baskılandığını göstermişlerdir (127). Meloche ve arkadaşları da (3) yaptıkları başka bir çalışmada benzer konsantrasyonda losartanın p38 MAPK aktivasyonunu baskıladığını bildirilmişlerdir (Şekil 4.2.3). Elde ettiğimiz sonuçlar hem p38 MAPK'ları aktive eden Ang II sinyallerinin AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden olduğunu göstermiş hem de losartanın bu konsantrasyon ve süresinin AT<sub>1</sub> reseptörünü bloke etmekte yeterli olduğu saptanmıştır. Bulduğumuz bu sonuçlar daha önceden yapılmış çalışmalardaki sonuçları desteklemektedir (3,128).

Ang II uyarımı sonrasında AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden aktive olan p38 MAPK ailesinin hücrel mekanizmaları şu ana kadar yapılan çalışmalarda tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, Ang II uyarımıyla G proteinleri üzerinden aktive olan Ras'ın hem MAPKKK hem de NAD(P)H (tam kanıtlanmamış olmakla birlikte tirozin kinaz, PLA<sub>2</sub> ve PLD) bağımlı yollar üzerinden p38 MAPK'ı aktive ettiği bir kaç çalışmada gösterilmiştir (126,127). Yapılan bu çalışmalarda Ang II ile uyarım sonrası VDKH'lerinde AT<sub>1</sub> reseptörleri üzerinden G proteinleri aktive olduktan sonra Src adı verilen adaptör bir protein aktive olduğu ve bununda gelişme faktörü bağlayıcı protein olan Grb2 üzerinden sos'u aktive ettiği gösterilmiştir (7). Sos ise Ras üzerindeki GDP-GTP değişimini katalizleyen bir guanin nükleotid değiştirici faktördür. Ras, sinyal transdüksiyonunda merkezi bir oyuncudur. Aynı çalışmalarda Ras'ın MAP kinaz yoluna öncülük eden Raf (MAPKKK) ve NAD(P)H oksidazı aktive ettiği bulunmuştur (1,7,116).

Ang II'nin AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden G proteinlerinin aktivasyonu yoluyla p38 MAPK fosforilasyonunda Ras'ın nasıl rol oynadığını incelemek amacıyla primer olarak kültüre edilmiş VDKH'leri, bir ras inhibitörü olan FIS ile inkübe edildi. Gana-Weisz ve arkadaşlarının rat hücrelerinde daha önce yaptıkları bir



çalışmada, hücrelerin 24 saat süre ile FTS'nin 25 µM konsantrasyonunda inkübe edildiği zaman Ras'ı inhibe ettiğini bulmuşlardır (129). Smalley ve Eisen, Colo 853 melanoma hücrelerinde yaptıkları çalışmada FTS'nin 100 µM konsantrasyonunda 24 saatte Ras'ı inhibe ettiğini açıkladılar (130). Zatechka ve Lou'nun yaptıkları çalışmada, FTS'nin 25 µM konsantrasyonunun ras'ı inhibe etmek için yeterli olmadığını ileri sürmüşlerdir (131). Biz bu nedenle çalışmamızda FTS'yi 24 saat 100 µM konsantrasyonda kullanmayı uygun bulduk.

Ras inhibitörü olan FTS, % 0.1 DMSO içinde çözündüğünden, DMSO'nun VDKH de herhangi etkisinin olmadığını göstermek için hücreler ilk önce 24 saat boyunca % 0.1 DMSO ile inkübe edildi (Şekil 4.2.4). Bulduğumuz sonuçlarda primer olarak kültüre edilen vasküler düz kas hücreleri üzerinde DMSO'nun herhangi bir aktivasyon yada inhibisyon yapmadığı bulundu. Bir sonraki aşamada % 0.1 DMSO ile 24 saat inkübe edilmiş hücreler 5 dakika 100 nM Ang II ile uyarılarak DMSO'nun p38 MAPK fosforilasyonuna etkisi incelendi. Bu deneyin sonucunda da, Ang II uyarımında DMSO'nun VDK hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyonuna bir etkisi olmadığı gösterildi (Şekil 4.2.4).

Primer olarak kültüre edilmiş VDKH'leri önce 100 µM, 24 saat Ras inhibitörü FTS ile inkübe edildi. Elde ettiğimiz sonuçlar tek başına FTS'nin bu hücrelerde herhangi bir p38 MAPK fosforilasyon artışına neden olmadığı bulundu. Bu sonuç hem ortamda Ang II aktivasyonu bulunmadığı için hem de FTS'nin bu yolağı inhibe etmesi nedeniyle beklenen bir durumdur. VDKH'lerinde Ang II uyarımından sonra FTS'nin p38 MAPK üzerine etkisini incelemek için hücreler 24 saat, 100 µM FTS ve 5 dakika 100 µM Ang II ile inkübe edildi. Bu uyarım sonucunda da p38 MAPK fosforilasyonunda bir artış saptanmadı. Elde edilen bu sonuçlar VDKH'lerinde FTS'nin GTP-bağlayan küçük bir protein olan Ras'ı inhibe etmesi nedeniyle hem MAPKKK hem de NAD(P)H oksidaz yolunu bloke ettiğini gösterir. Elde ettiğimiz bulgular daha önce yapılmış FTS ile ilgili çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (129,130,131). Zatechka ve Lou 2002 yılında lens dokusunda yaptıkları çalışmada FTS'nin bu inhibisyonu Ras'ın membranla birlikteliğini yada membrana çapalanmasını önleyerek yaptığını ileri sürmüşlerdir

(131). Smalley ve Eisen 2002 yılında yaptığı bir çalışmada melanoma hücrelerinde FTS'nin Ras'ı inhibe ederek p38 MAPK fosforilasyonunu azalttığını rapor etmiştir (130). Gana-Weisz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ras'ın inhibe edilmesiyle ras'ın membrana çapalanmasının bloke edildiğini ileri sürmüşlerdir (129).

Ang II üzerinden aktive olan G proteini sinyallerinin tirozin kinazlar, PLA<sub>2</sub> ve PLD üzerinden NAD(P)H oksidaz sistemini aktive etmek suretiyle ve Ras üzerinden MAPKKK yoluyla p38 MAPK aktivasyonunun gerçekleşebileceği daha önceden yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1). Bizim çalışmamızda Ras inhibe edildiği için hücre içerisinde MAPKKK ve NAD(P)H oksidaz enzimleri aktive olamadığından dolayı da Ang II uyarımı p38 MAPK'ı aktive etmemiştir

Literatürde Ang II uyarımı sonrasında Ras MAPKKK ve NAD(P)H oksidaz yollarının hangisinin p38 MAPK fosforilasyonunda baskın olduğu ve Ras'ın NAD(P)H oksidaz sistemini aktive edip etmediği tam olarak gösterilememiştir. Daha önceden yapılan çalışmalardan Ras'ın doğrudan Raf-1'i fosforilayarak MAPK aktivasyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir (117). Bilinen yolakta VDKH kültürlerinde Ang II uyarımlı p38 MAPK aktivasyonunun Ras bağımlı olduğu ve MAPKKK üzerinden p38 MAPK'ı aktive ettiği gösterilmiştir.

Nickenig, Ang II uyarımının ROS bağımlı yolların aktivasyonu üzerinden NAD(P)H oksidaz'ı aktive ettiğini bildirmiştir (2). Obata ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise NAD(P)H oksidaz tarafında üretilen süperoksit ve hidrojen peroksidaz'ın her ikisinin de p38 MAPK'ı aktive ettiği göstermiştir (85). Hücre içerisinde süperoksit ve hidrojen peroksidaz'ın konsantrasyonunun yükselmesi NAD(P)H oksidaz ile ilişkili olduğu için bu enzimin inhibe edilmesi, hücre içerisinde Ang II indüklü p38 MAPK aktivasyonunu tamamen baskılamış olabilir. FTS kullanılarak Ras'ın inhibe edilmesinin NAD(P)H oksidaz sistemini de baskılayarak p38 MAPK'ı bloke ettiği düşünülmektedir.

Deneylerimizin son aşamasında Ang II uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz sisteminin Ras bağımsız etkilerinin p38 MAPK fosforilasyonu üzerindeki etkilerini incelemek için VDKH'leri NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan DPI ile inkübe edilmiştir. Ushio-Fukai ve arkadaşlarının vasküler düz kas hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada DPI'nın 10  $\mu$ M konsantrasyonda ve 30 dakika süresince kullanıldığında NAD(P)H oksidaz sistemini baskılayarak p38 MAPK fosforilasyonunu inhibe ettiğini buldular (126) Bu nedenle çalışmamızda DPI, 10  $\mu$ M konsantrasyonda ve 30 dakika boyunca kullanılmıştır.

NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI, % 0.1 DMSO içinde çözündüğü için hücreler ilk olarak 30 dakika % 0.1 DMSO ile inkübe edilmiştir (Şekil 4.2 9). Ortamda herhangi bir uyarım bulunmadığı ve DMSO'nun vasküler düz kas hücreleri üzerine aktivasyon yapmadığı için kontrol seviyesinde bir p38 MAPK fosforilasyonu saptanmıştır. İkinci aşamada, 30 dakika % 0.1 DMSO ile inkübe edilmiş hücreler 5 dakika 100 nM Ang II ile uyarılarak p38 MAPK fosforilasyonu incelendi. Bu uyarım sonucunda VDKH'lerinde kontrole kıyasla önemli bir p38 MAPK fosforilasyon artışı gözlemlendi. Bulduğumuz bu sonuçlar % 0.1'lik DMSO'nun vasküler düz kas hücreleri üzerinde herhangi bir aktivasyon ya da inhibisyon yapmadığını göstermektedir.

Vasküler düz kas hücreleri % 0.1 DMSO içinde çözülmüş 10  $\mu$ M DPI ile inkübe edilerek p38 MAPK fosforilasyonu incelendi. Bu inkübasyon sonucunda VDKH'lerinde kontrole oranla p38 MAPK fosforilasyonunda bir artış saptanmadı. MAPK fosforilasyonunda herhangi bir artış olmaması ortamda Ang II gibi bir uyarın olmamasına ve DPI'nın NAD(P)H oksidaz yolağını inhibe etmesine bağlıdır.

Primer olarak kültüre edilmiş VDKH'lerinde Ang II uyarımında NAD(P)H oksidaz'ın etkisini incelemek için hücreler 10  $\mu$ M, 30 dakika NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI ile inkübe edilmiş ve ardından 5 dakika 100 nM Ang II uyarılmıştır (Şekil 4.2 9) NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI'nın, 30 dakika ve 10  $\mu$ M konsantrasyonda Ang II uyarımlı p38 MAPK fosforilasyonu inhibe ettiği saptandı.

Bundan dolayı DPI'nin NAD(P)H oksidaz üzerinden ROS üretimini azalttığı ve bu şekilde p38 MAPK fosforilasyonunu inhibe ettiği söylenebilir. Fakat Ras MAPKKK yolu üzerinden de bir aktivasyon bulunmamıştır. Bu da Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK aktivasyonunun NAD(P)H oksidaz sistemi üzerinden olduğunun, aynı zamanda Ras'ın etkilerini NAD(P)H oksidaz üzerinden gösterdiğinin de kanıtıdır.

Ushio-Fukai ve arkadaşları da vasküler düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda elde ettiğimiz bulgulara benzer sonuçlar bulmuşlardır (126). Elde ettikleri sonuçlara göre, primer olarak kültüre edilmiş VDKH'lerinde Ang II uyarımı sonucu p38 MAPK fosforilasyon artışında  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  gibi reaktif oksijen radikallerinin kritik bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

Laboratuvarımızda bu çalışma ile paralel yürüttüğü başka bir çalışmada Ang II uyarımı sonrasında Ras inhibitörü FTS ve NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI kullanılarak p42/44 MAPK fosforilasyonu incelenmiştir. VDKH'lerinde Ang II uyarımı sonrasında FTS'nin p42/44 MAPK fosforilasyonunu tamamen baskıladığı ancak DPI'nin bu fosforilasyon üzerine herhangi bir etkisi olmadığı saptanmıştır (yayınlanmamış bulgu)

Sonuç olarak, VDKH'lerinde Ang II uyarımı sonucu  $AT_1$  reseptörü üzerinden işleyen Ras-MAPKKK ve Ras-NAD(P)H oksidaz bağımlı yollar p38 MAPK aktivasyonu için önemli basamaklardır. Bu yolların daha iyi anlaşılması kardiyovasküler hastalıkların altında yatan patolojik mekanizmaların ve herhangi bir stres uyarımı sonucunda meydana gelen iskemi, infeksiyon hastalığı ve inflamatuvar artrit gibi hastalıkların hücresel ana mekanizmaların anlaşılması için temeldir. Ayrıca bu yolların hücresel mekanizmalarının çözülmesi bundan kaynaklanan hastalıklar için ilaç geliştirilmesine imkan sağlamaktadır.

Gelecekte hücre içi süperoksit ve hidrojen peroksit gibi ROS'ların ölçülmesi ve p38 MAPK üzerine etkili diğer stres kaynaklı yolların ayrıntılı olarak araştırılması konulara bakış açısını genişletebilir. Ras ve NAD(P)H oksidaz

üzerinden üretilen fizyolojik ve patolojik düzeydeki ROS'ların p38 MAPK aktivasyonu üzerindeki etkilerini gösteren daha ileri çalışmalar bu konunun bütünlüğünün anlaşılmasında yardımcı olabilir.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada primer olarak kültüre edilmiş vasküler düz kas hücrelerinde Ang II uyarımı sonrasında AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden aktive olan p38 MAPK aktivasyonunda Ras ve NAD(P)H oksidaz sinyal iletim yollarının etkisi incelenmiştir.

Rat aortasından izolasyonu ve primer kültürü yapılan hücrelerinin immunohistokimya yöntemiyle  $\alpha$ -aktinleri boyanarak vasküler düz kas hücresi olduğu gösterilmiştir. Daha sonra bazı aktivatör ve inhibitörler kullanılarak p38 MAPK fosforilasyonu western blotting yöntemiyle gösterilmeye çalışılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre;

1- Ang II'nin 100 nM konsantrasyonda primer olarak kültüre edilmiş VDK hücrelerinde maksimum p38 MAPK fosforilasyonu yaptığı gösterilmiştir.

2- Ang II'nin 100 nM konsantrasyonda ve 5 dakika inkübasyon sonunda primer olarak kültüre edilmiş VDK hücrelerinde maksimum p38 MAPK fosforilasyonu yaptığı gösterilmiştir.

3- Primer olarak kültüre edilmiş VDK hücrelerinde Ang II'nin p38 MAPK fosforilasyonuna neden olan sinyallerinin AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir.

4- Ras'ın inhibe edilmesinden sonra Ang II uyarımının primer olarak kültüre edilmiş VDK hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyon artışına neden olmadığı saptanmıştır.

5- NAD(P)H oksidazın inhibe edilmesinden sonra Ang II uyarımının primer olarak kültüre edilmiş VDK hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyon artışına neden olmadığı bulunmuştur.

6. VDKH kùltùrlerinde Ang II uyarımı altında AT<sub>1</sub> reseptòrù üzerinden aktive olan Ras ve NAD(P)H oksidaz'ın ikisinin de aynı yolak üzerinde p38 MAPK fosforilasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu iki yolaktan NAD(P)H oksidaz sisteminin VDK hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyonunda daha etkin rol oynadığı gösterilmiştir.

## ÖZET

Renin-anjiotensin sisteminin aktif bir komponenti olan Anjiyotensin II (Ang II), hipertansiyon, aterosklerozis, kardiovasküler sistem hastalıkları ve kan basıncının kontrolünde önemli bir rol oynar. Ang II'nin vasküler düz kas hücrelerinde AT1 reseptörleri üzerinden G proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla farklı sinyal iletim yollarını uyararak p38 Mitojen aktive edici kinaz (MAPK)'ları aktif hale geçirir. Ang II ile uyarım sonrasında hemen işleyen sinyal iletiminde G proteinleri aracılığıyla Ras aktive olur. Ras, NAD(P)H oksidaz sinyal iletim yolu üzerinden p38 MAPK'ı aktive edebilir.

Bu çalışmamızda ratların aortasından izole edilen vasküler düz kas hücreleri kültür ortamında üretildikten sonra Ang II ile uyarılarak p38 MAPK fosforilasyonunda Ras ve NAD(P)H oksidaz'ın etkisi araştırılmıştır. Rat aortasından izole edilen vasküler düz kas hücrelerinin saflığı immünohistokimyasal teknik kullanılarak  $\alpha$ -aktin varlığı ile gösterilmiştir. Ang II uyarımı ile p38 MAPK fosforilasyonu western blot yöntemi ile, araştırmak istenilen her bir metabolik yol için uygun inhibitörler kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak vasküler düz kas hücre kültürlerinde, Ang II uyarımı Ang II'nin AT<sub>1</sub> reseptörü üzerinden p38 MAPK aktivasyonunu hızlı bir şekilde arttırmıştır. Ang II indüklü p38 MAPK aktivasyonu Ras inhibitörü olan FTS ile tamamen baskılanmıştır. Ang II uyarımlı MAPK aktivasyonu üzerine NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan DPI da p38 MAPK aktivasyonu inhibe etmiştir.



## ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II), is the active component of the renin-angiotensin system which has an important role in atherosclerosis, hypertension, pathogenesis of cardiovascular diseases and regulating blood pressure. It was shown that, in vascular smooth muscle cells (VSMC), by stimulating Gq protein through AT<sub>1</sub> receptors, Ang II activates various signal transduction pathways of p38 mitogen activated protein kinases (MAPKs). These immediate signal transduction processes are, G protein mediated activation of Ras. Ras can activate p38 MAPK through signal transduction pathway of NAD(P)H oxidase.

VSMC cultured, used in the experiments, showed 99% positive immunostaining of smooth muscle  $\alpha$ -actin antibody. This study was aimed to investigate whether or not Ras or NAD(P)H oxidase activation have a role in p38 MAPK phosphorylation after stimulation with Ang II in VSMC cultured. Phosphorylation was shown using western-blott techniques with specific phospho-antibodies against p38 MAPK proteins. In cultured rat vascular smooth muscle cells, angiotensin II (Ang II) induced a rapid increase in p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) activity through the Ang II type 1 receptor. Ang II induced MAPK activity was abolished by the Ras inhibitor, FTS and NAD(P)H oxidase inhibitor DPI.

## KAYNAKLAR

1. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacol Rev.* 52:639-672, 2000.
2. G Nickenig. Central Role of the AT<sub>1</sub>-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens* 16:26-33, 2002.
3. Meloche S, Landry J, Huat J, Haule F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP Kinase pathway regulates Angiotensin II induced contraction of vascular smooth muscle. *Am J Physiol heart Circ Physiol.* 279: 741-751, 2000
4. Hollenberg MD. Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends pharmacol Sci.* 15:108-114, 1994.
5. Leduc I, Haddad P, Giasson E, Meloche S. Involment of a tyrosine kinase pathway in the growth-promotting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cell. *Mol Pharmacol* 48:582-592, 1995.
6. Kathy K. Griendling , Masuko Ushio-Fukai. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept.* 91:21-27, 2000
7. Benjamin Lewin. *Genes VII*. Oxford Universty Press New York January 801-834, 2000.
8. Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzel RB. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 6:88-105, 1997.
9. Bradford CB, Marshall AC. Ang II Signal Transduction in Vascular Smooth Muscle; Role of Tyrozine Kinases. *Circ Res.* 80:607-616, 1997
10. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 10:921-961, 1990
11. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: Relation with structural changes. *Hypertension.* 19 (Suppl 2):II-1-II-9, 1992
12. Katoh Y, Periasamy M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Card Med.* 6:100-106, 1996.

13. Bornfeldt KE. Intracellular signaling in arterial smooth muscle migration versus proliferation. *Trends Card Med.* 6:143-151, 1996.
14. Rubanyi GB. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem.* 46:27-36, 1991.
15. Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 20 (11 Suppl 2):II-3-II-10, 1997.
16. Stein BC, Levin RI. Natriuretic peptides: Physiology, therapeutic potential and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J.* 135:914-923, 1998.
17. M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, M. Rupérez, V. Esteban, Y. Suzuki, S. Mezzano, J.J. Plaza, J. Egido. Role of the Renin-Angiotensin System in Vascular Diseases. *Hypertension.* 38:1382-1387, 2001.
18. De Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend I, Harding JW, Inagami T, Timmermans PB. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension.* 25:924-927, 1995.
19. Inagami T. Recent progress in molecular and cell biological studies of angiotensin receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 4:47-54, 1995.
20. Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Rittenhouse SE. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 7:447-451, 1985.
21. Arık N, Korkmaz M. Primer hipertansiyon patogenezi. *Hipertansiyon*, Arık N (ed), Format Matbaacılık İstanbul. 275-294, 1998.
22. Dinh DI, Frauman AG, Johnston CI and Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci.* 100:481-492, 2001.
23. Reid IA. The renin-angiotensin system: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Am Phys Soci.* 20:236-245, 1998.
24. Skeggs LI, Lentz KE, Gould AB, Hochstrasser H, Kahn Jr. Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. *Fed Proc.* 26:42-47, 1967.
25. Dorer FE, Kahn Jr, Lentz KE, Levine M, Skeggs LI. Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circ Res.* 31:356-366, 1972.
26. Phillips MI, Speakman EA, Kimura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin-angiotensin systems. *Regul Pept.* 43:1-20, 1993.

27. Inagami TA memorial to Robert Tiegerstedt. The centennial of renin discovery. *Hypertension*. 32:953-957, 1998.
28. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counter regulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension*. 1997;30:535-541, 1997.
29. Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: Evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens*. 7:933-936, 1989
30. Danser AH. Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem*. 157:211-216, 1996.
31. Naftilan AJ. Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3:218-227, 1994.
32. Naftilan AJ, Zho WM, Ingelfinger J, Ryan TJ, Pratt RE, Dzau VJ. Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest*. 87:1300-1311, 1991.
33. Morgan L, Pipkin FB, Kalsheker N. Angiotensinogen: Molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol*. 28:1211-1222, 1996.
34. Hollenberg NK, Fisher NDL, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*. 32:387-392, 1998.
35. Schutz S, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am J Pathol* 149:2067-2079, 1996.
36. Esther CR, Marino EM, Howard TE. The critical role of tissue angiotensin converting enzymes as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*. 99:2375-2385, 1997.
37. Ekker M, Tronik D, Rougeon F. Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5155-5158, 1989
38. Saris JJ, van Dijk MA, Kroon I, Schalekamp MA, Danser AH. Functional importance of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension*. 35:764-768, 2000
39. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*. 265:22348-22357, 1990.

40. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens*. 9:277-284, 1996.
41. Takai S, Shiota N, Jin D, Miyazaki M. Functional role of chymase in angiotensin II formation in human vascular tissue. *J Cardiovasc Pharmacol*. 32:826-833, 1998.
42. Shiota N, Okunishi H, Takai S, Mikoshiba I, Sakonjo H, Shibata N, Miyazaki M. Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointima formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation*. 99:1084-1090, 1999.
43. Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KI, Miller-Wing AV, Cook VI, Harding ECE, Harding JW. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept*. 40:409-419, 1992.
44. Zhuo J, Moeller I, Jenkins I, Chai SY, Allen AM, Mitsuru O, Mendelsohn AO. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens*. 16:2027-2037, 1998
45. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn AO. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 13:31S-38S, 2000.
46. Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the type 1 angiotensin II receptor. *FEBS Lett*. 298:257-260, 1992.
47. Desarnaud F, Marie J, Lombard C, Larguier R, Seyer R, Lorca T, Jaid S, Bonnafous JC. Deglycosylation and fragmentation of purified rat liver angiotensin II receptor: Application to the mapping of hormone-binding domains. *Biochem J*. 289:289-297, 1993.
48. Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle. Role of tyrosine kinases. *Circ Res*. 80:607-616, 1997
49. Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II type I receptor. Relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension* 32:459-466, 1998
50. Nahmias C, Strosberg D. The angiotensin AT1 receptor: Searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci*. 16:223-225, 1995.
51. Viswanathan M, Saavedra JM. Angiotensin II receptor subtypes and growth. In *Angiotensin receptors*. Ed J M Saavedra, PBMWM Timmermans. Plenum Press, New York, pp 205-219 1994

52. Touyz RM, Schiffrin EL. Tyrosine kinase signaling pathways modulate angiotensin II-induced calcium transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 27:1097–1103, 1996.
53. Tamura M, Wanaka Y, Landon EJ, Inagami T. Intracellular sodium modulates the expression of angiotensin II subtype 2 receptor in PC12W cells. *Hypertension* 33:626–632, 1999.
54. Hayashida W, Horiuchi M, Grandchamp J, Dzau VJ. Antagonistic action of angiotensin II type-1 and type-2 receptors on apoptosis in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension*. 28:535, 1996.
55. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 272:19022–19026, 1997
56. Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Summers C. The angiotensin II type 2: Receptor: An enigma with multiple variations. *Am J Physiol* 278:E357–E374, 2000.
57. Unger T. The angiotensin type 2 receptor: Variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 17:1775–1786, 1999
58. Siragy HM. The role of the AT2 receptor in hypertension. *Am J Hypertens*. 13:62S–67S, 2000
59. Ciuffo GM, Alvarez SE, Fuentes LB. Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. *Regul Pept*. 74:129–135, 1998.
60. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: An in vivo gene transfer study. *Life Sci* 63:289–295, 1998.
61. Berk BC, Vekshtein BBC, Gordon HE, Tsuda I. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 13:305–314, 1989.
62. Touyz RM, Schiffrin EL. Angiotensin II regulates vascular smooth muscle cell pH contraction and growth via tyrosine-kinase dependent signaling pathways. *Hypertension*. 30:222–229.
63. Touyz RM, Endemann D, He G, Li J-S, Schiffrin EL. Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small arteries in young SHR. 33(1 pt 2):366–373, 1999
64. Zahradka P, Wilson D, Seward L, Yau L, Cheung PK. Cellular physiology of angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells, in *Angiotensin II*

Receptor Blockade: Physiological and Clinical Implications (Dhalla NS, Zahradka P, Dixon I and Beamish R eds), Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA., pp. 41-50 1998.

65. Chappell MC, Pirro NI, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 31:362-367, 1998.
66. Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 31:356-361, 1998.
67. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II Induces Hypertrophy, Not Hyperplasia, of Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 62:749-756, 1988.
68. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II Induces Smooth Muscle Cell Proliferation in the Normal and Injured Rat Arterial Wall. *Circ Res*. 68:450-456, 1991.
69. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central Role of the MAPK Pathway in Ang II-Mediated DNA Synthesis and Migration in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:73-82, 1999.
70. Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI. The Multiple Actions of Angiotensin II in Atherosclerosis. *Regul Pept*. 93:65-77, 2000.
71. Takagishi I, Murahashi N, Azagami S, Morimatsu M, Sasaguri Y. Effect of Angiotensin II and Thromboxane A2 on the Production of Matrix Metalloproteinase by Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Biochem Mol Biol Int*. 35:265-273, 1995.
72. Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 42:1075-1081, 2003.
73. Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Rittenhouse SE. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 7:447-451, 1985.
74. Griending KK, Rittenhouse SE, Brock TA, Ekstein LS, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 261:5901-5906, 1985.
75. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griending KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by Ang II in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 274:22699-22704, 1999.

76. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95, 2002.
77. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494–501, 2000.
78. Hanna IR, Taniyama Y, Szocs K, Rocic P, Griendling KK. NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Antioxid Redox Signal* 4:899–914, 2002.
79. Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression and regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:R277–R297, 2003.
80. Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88:888–894, 2001.
81. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 90:1205–1213, 2002.
82. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141–1148, 1994.
83. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 276:14533–14536, 2001.
84. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111:1201–1209, 2003.
85. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 33:774–797, 2002.
86. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthineoxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106:3073–3078, 2002.
87. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 7:53–58, 2000.



88. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*. 296:2391–2394, 2002.
89. Gaut JP, Byun J, Iran HD, Lauber WM, Carroll JA, Hotchkiss RS, Belaaouaj A, Heinecke JW. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest* 109:1311–1319, 2002.
90. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*. 70:593–599, 1992.
91. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296–299, 1995.
92. Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin: evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274:19814–19822, 1999.
93. Brown MR, Miller FJ Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, Spector AA, Weintraub NL. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 85:524–533, 1999.
94. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett* 404:249–252, 1997.
95. Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani MA, Clark KR, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circ Res*. 89:39–46, 2001.
96. Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griendling KK. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal*. 4:845–854, 2002.
97. Weber DS, Seshiah P, Taniyama Y, Griendling KK. Src-dependent migration of vascular smooth muscle cells by PDGF is reactive oxygen species dependent. *Circulation*. 106(suppl II):II260 Abstract, 2002.
98. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 98:2572–2579, 1996.

99. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7): a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 276:41279–41287, 2001.
100. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res*. 92:80–86, 2003.
101. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725–734, 2002.
102. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83:952–959, 1998.
103. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 84:695–703, 1999.
104. De Keulenaer GW, Ushio-Fukai M, Yin Q, Chung AB, Lyons PR, Ishizaka N, Rengarajan K, Taylor WR, Alexander RW, Griendling KK. Convergence of redox-sensitive and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in tumor necrosis factor-alpha-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:385–391, 2000.
105. Burke IM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol* 252:H721–H732, 1987.
106. Iesaki I, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol*. 277:H978–H985, 1999.
107. Toda I, Shimanuki M, Yanagida M. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 5:60–73, 1991.
108. Ray LB, Sturgill IW, Ray LB, Sturgill IW. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:3753–3757, 1988.
109. Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill IW. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6940–6943, 1989.

110. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:180-186, 1997.
111. Mii S, Khalil RA, Morgan KG, Ware JA, Kent KG. Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270:142-150, 1996.
112. Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31:152-161, 1998.
113. New L, Han J. The p38 MAP Kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med* 8:220-229, 1998.
114. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219, 1998.
115. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and P38 Protein Kinases. *Science* 298:1911-1912, 2002.
116. Kyriakis JM and Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869, 2001.
117. Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: The p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 28:67-77, 2000.
118. Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G, et al. Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274:15115-15126, 1999.
119. Deacon K, Blank JL. MEK kinase 3 directly activates MKK6 and MKK7, specific activators of the p38 and c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases. *J Biol Chem* 274:16604-16610, 1999.
120. Waterman WH, Molski TF, Huang CK, et al. Tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> are abrogated by an inhibitor of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils. *Biochem J* 319:17-20, 1996.
121. Husain S, Abdel-Latif AA. Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in cat iris sphincter smooth muscle cell. *Biochem J* 342:87-96, 1999.
122. Caivano M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. *FEBS Lett* 429:249-253, 1998.

123. Guan Z, Baier LD, Morrison AR. p38 mitogen-activated protein kinase down-regulates nitric oxide and up-regulates prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis stimulated by interleukin-1beta. *J Biol Chem.* 272:8083-8089, 1997.
124. Gunter S, Alexander W, Atkinson WJ, Gimbrone MA. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cell. *J Cell Biol.* 92: 289-298, 1982.
125. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254, 1976.
126. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by Ang II in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 274:22699-22704, 1999.
127. Kubo I, Saito E, Hanada M, Kambe I, Hagiwara Y. Evidence that angiotensin II, endothelins and nitric oxide regulate mitogen-activated protein kinase activity in rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 347:337-346, 1998.
128. Papakonstantinou E, Roth M, Kokkas B, Papadopoulos C, Karakiulakis G. Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38(5):715-728, 2001.
129. Smalley KSM and Eisen IG. Farnesyl thiosalicylic acid inhibits the growth of melanoma cells through a combination of cytostatic and pro-apoptotic effects. *International J Canc.* 98:514-522, 2002.
130. Gana-Weisz M, Haklai R, Marciano D, Egozi Y, Ben-Baruch G and Kloog Y. The Ras antagonist S-farnesylthiosalicylic acid induces inhibition of MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 239:900-904, 1997.
131. D. Steven Zatechka JR and Marjorie F. Lou. Studies of the Mitogen-Activated Protein Kinases and Phosphatidylinositol-3 Kinase in the Lens. 2 The Intercommunications. *Exp Eye Res.* 75:177-192, 2002.