

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDE ANG II VE
EGF UYARIMI SONUCU P42/P44 MAPK YOLUNUN
AKTİVASYONUNDA AT1R VE EGFR
TRANSAKTİVASYON İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Mustafa KIRÇA

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2013

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDE ANG II VE
EGF UYARIMI SONUCU P42/P44 MAPK YOLUNUN
AKTİVASYONUNDA AT1R VE EGFR
TRANSAKTİVASYON İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Mustafa KIRÇA

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Taraından Desteklenmiştir. (Proje No: 2011.02.0122.010)

Kaynak Gösterilmek Şartıyla Tezimden Yararlanılabilir.

Antalya, 2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 26.06.2013

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Aslı BAYKAL ATAMAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Onay: Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Ang II uyarımlı sinyal iletim mekanizmaları ve vasküler patolojilerdeki rolü yıllardır araştırılmaktadır. Ang II, vasküler düz kas hücrelerinde mitojenik aktivite, proliferasyon, hiperplazi ve inflamatuvar bileşenlerin üretimini artırmak ve migrasyonu uyarmak gibi etkilerle, hipertansiyon ve aterosklerozun da aralarında bulunduğu kardiyovasküler hastalıkların gelişimine katkı sağlar. Ang II ve benzer şekilde EGF ligandının VDKH'nde hücre büyümesi, apoptozis, inflamasyon ve migrasyon ile sonuçlanabilen ERK1/2 yolağı gibi sinyal yollarını uyardığı bilinmektedir. Mevcut çalışma Ang II uyarımlı EGFR transaktivasyonu olayı ve AT1R ile EGFR arasındaki olası mekanizmaları aydınlatmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmamızda Ang II ya da EGF uyarımlı ERK1/2 ve EGFR-Tyr¹⁰⁶⁸ fosforilasyonları farklı inhibitörler kullanılarak VDKH'nde incelendi.

Deney sonuçlarının analiz edilmesiyle VDKH'nde Ang II veya EGF uyarımı ERK1/2 ve EGFR fosforilasyonunu uyarmaktadır. Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu bir EGFR alt yolak olayıdır. Ang II, AT1R üzerinden EGFR'ı transaktive ederek ERK1/2 aktivasyonuna yol açar. EGFR transaktivasyonu Ang II'nin neden olduğu ERK1/2 fosforilasyonu için vazgeçilmezdir. Ang II uyarımlı EGFR transaktivasyonu HB-EGF salınması ile gerçekleşir. Ang II, MMP aktivitesini artırarak ERK1/2 aktivasyonuna neden olurken EGF aynı etkiyi göstermez.

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışmadan elde edilen veriler ışığında Ang II'nin VDKH'nde EGFR transaktivasyonuna neden olduğu ve bu transaktivasyon olayı neticesinde ERK1/2 yolağının uyarıldığı belirlenmiştir. Yakın gelecekte Ang II'nin kardiyovasküler hastalıklardaki patofizyolojik etkilerini önlemek için EGFR inhibitör(ler)inin klinik olarak kullanılması bu alanda yapılacak olan daha ileri araştırmalar sonucu söz konusu olabilir.

Anahtar kelimeler: VDKH, Ang II, EGF, ERK1/2, EGFR, transaktivasyon

ABSTRACT

Ang II stimulated signal transduction mechanisms and the role of Ang II in vascular pathologies has been explored for years. Ang II contributes to the development of cardiovascular diseases including, hypertension and atherosclerosis by enhancing the mitogenic activity, proliferation, hyperplasia, inflammatory mediators production, and stimulating the migration of VSMCs. It is known well Ang II and, in a similar way, EGF ligand induces signaling pathways such as ERK1/2 which may result in cell growth, apoptosis, inflammation and migration of VSMCs. The present study was conducted to enlighten Ang II-induced EGFR transactivation event and possible mechanisms that links AT1R to EGFR. In our study, Ang II- or EGF-induced ERK1/2 and EGFR-Tyr¹⁰⁶⁸ phosphorylations were emerged by using different inhibitors in VSMCs.

Analysis of experiments' data shows that treatment of VSMCs with Ang II or EGF induces ERK1/2 and EGFR phosphorylation. Ang II-induced ERK1/2 phosphorylation is a downstream event of EGFR transactivation. Ang II transactivates EGFR through AT1R leading to ERK1/2 activation. EGFR transactivation is indispensable for ERK1/2 phosphorylation caused by Ang II. Ang II-induced EGFR transactivation is mediated by the release of HB-EGF. Ang II, but not EGF, causes ERK1/2 activation by increasing the MMP activity.

In conclusion, the results of our study indicates that Ang II leads to EGFR transactivation and subsequent ERK1/2 pathway activation in VSMCs. It may be clinically possible to use EGFR inhibitor(s) as a drug to abrogate the pathophysiological effects of Ang II in cardiovascular diseases after further studies on this topic soon.

Key words: VSMC, Ang II, EGF, ERK1/2, EGFR, transactivation

TEŞEKKÜR

Mevcut çalışmanın fikir aşamasından sonuçlanma aşamasına kadar geçen süreçte vaktini ve emeğini esirgemeyen, tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Akın Yeşilkaya'ya ve yüksek lisans eğitimim boyunca öğrenimime katkı sağlayan tüm bölüm hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında değerli birikimlerini esirgemeyen başta Dr. Arzu Çetin olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bizlere ihtiyaç duyduğumuzda anlayışla yardım gösteren Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına da teşekkür etmek isterim.

Eğitimin ilk başladığı yerin aile olduğunu hatırlayarak eğitim ve öğrenim hayatım boyunca bir an olsun maddi ve manevi desteklerinin eksikliğini hissetmediğim, şimdiye kadar yapmış ve halen de yapmakta oldukları herşey için aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Vasküler Duvar ve Vasküler Düz Kas Hücreleri	4
2.2. Anjiyotensin II, Klasik RAS ve Bu Alandaki Yeni Gelişmeler	5
2.2.1. Anjiyotensin II Reseptörleri ve GPCR Etkileşimli Proteinler	7
2.2.2. Ang II ve Vasküler Etkileri	8
2.3. Ang II Uyarımıyla Aktifleşen Sinyal Yolları	9
2.4. EGF Yapı ve Fonksiyonu	10
2.4.1. EGF Reseptörü	11
2.4.2. EGF, HB-EGF ve Vasküler Etkileri	13
2.5. G-Protein Bağımlı Reseptörler ve Reseptör Tirozin Kinazların Etkileşimi	14

2.6.	Ang II ve EGFR transaktivasyonu	15
2.6.1.	EGFR Transaktivasyonu ve Uyardığı Alt Yolaklar	16
2.6.2.	Matriks Metalloproteinazlar ve EGFR Transaktivasyonundaki Roller	17
2.7.	Anjiyotensin II'nin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü	18
MATERYAL ve METOT		21
3.1.	Kullanılan Malzeme ve Kimyasal Maddeler	21
3.2.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu	22
3.3.	Primer Vasküler Düz Kas Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	23
3.4.	Protein Konsantrasyon Ölçümü	25
3.5.	SDS-PAGE ve Western Blot Prosedürü	27
BULGULAR		31
4.1.	Ang II'nin AT1R ve EGFR Üzerinden ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	31
4.2.	Ang II Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda AT1R Üzerinden EGFR Transaktivasyonunda HB-EGF'in Rolü	33
4.3.	EGF Ligandının VDKH'lerinde EGFR Alt Yolağına Etkisiyle ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkisi	35
4.4.	EGF Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda HB-EGF ve MMP Rolünün İncelenmesi	35
4.5.	Ang II Uyarımlı EGFR Fosforilasyonunda AT1R Rolünün İncelenmesi	38
TARTIŞMA		40
SONUÇLAR		45
KAYNAKLAR		46
ÖZGEÇMİŞ		58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KVH	:	Kardiyovasküler hastalıklar
VDKH	:	Vasküler düz kas hücresi/hücreleri
Ang II	:	Anjiyotensin II
RAS	:	Renin-anjiyotensin sistemi
ECM	:	Ekstraselüler matriks
AT1R	:	Anjiyotensin tip 1 reseptörü
AT2R	:	Anjiyotensin tip 2 reseptörü
GPCR	:	G-protein coupled receptor (G-protein bağımlı reseptör)
RTK	:	Reseptör tirozin kinazlar
EGF(R)	:	Epidermal büyüme faktörü (reseptörü)
MAPK	:	Mitojenle aktiveşen protein kinaz
HB-EGF	:	Heparin-bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü
ACE	:	Angiotensin converting enzyme
(P)RR	:	Renin/prorenin reseptörü
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
NO	:	Nitrik oksit
PTPs	:	Protein tyrosine phosphatase
ROS	:	Reactive oxygen species (reaktif oksijen türleri)
GIP	:	GPCR interacting proteins
ATRAP	:	AT1R-associated protein
ARAP1	:	AT1R-associated protein 1
ATIP	:	AT2R-interacting protein
ATBP50	:	AT2R binding protein of 50 kDa
PLC	:	Fosfolipaz C
PLD	:	Fosfolipaz D

JNK	:	c-Jun N-terminal kinazlar
PDGF(R)	:	Platelet derive büyüme faktörü (reseptörü)
IGF-1R	:	İnsüline benzer büyüme faktörü-1 reseptörü
PLA₂	:	Fosfolipaz A ₂
STAT	:	Signal Transducer and Activator of Transcription
FAK	:	Fokal adezyon kinaz
PYK2	:	Prolince zengin tirozin kinaz 2
PI3K	:	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
ADAM	:	A Disintegrin And Metalloproteinase
ET-1/EDN1	:	Endotelin 1
TGF-β	:	Transforming growth faktör β
bFGF/FGF2	:	Temel fibroblast büyüme faktörü
MMP	:	Matriks metalloproteinaz
PKC	:	Protein kinaz C
TKIs	:	Tirozin kinaz inhibitörleri
COX-2	:	Siklooksijenaz-2
HBSS	:	Hank's balanced salt solution
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
STİ	:	Soya tripsin inhibitörü
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
BSA	:	Bovin serum albümini
FBS	:	Fetal bovin serumu
PSA	:	Penisilin-streptomisin antibiyotiği
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
EAC	:	Enzim ayrışma çözeltisi
PBS	:	Phosphate buffered saline
TBS	:	Tris buffer saline

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Arter duvarının yapısı	4
2.2. Ang II üretimi	6
2.3. EGF reseptörünün şematik olarak gösterimi	12
2.4. ADAM enziminin yapısı	17
2.5. Genel bir MMP molekül yapısı	17
3.1. Mikro BCA yönteminin prensibi	26
3.2. BSA standart grafiği	27
4.1. Ang II'nin ERK1/2 fosforilasyonu üzerindeki etkisinde AT1R ve EGFR'nin Rolü	32
4.2. Ang II Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda AT1R Üzerinden EGFR Transaktivasyonunda HB-EGF'in Rolü	34
4.3. EGF Ligandının VDKH'lerinde EGFR Alt Yolağına Etkisiyle ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkisi	36
4.4. EGF Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda HB-EGF ve MMP Rolünün İncelenmesi	37
4.5. Ang II Uyarımlı EGFR Aktivasyonunda AT1R Rolünün İncelenmesi	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3.1.	Ayrışma jeli için kullanılan bileşenler ve oranları	28
3.2.	Toplama jeli için kullanılan bileşenler ve oranları	28

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2003 yılında yayınladığı raporda dünya genelindeki kardiyovasküler hastalıklara (KVH) bağlı olarak yaşamını yitirenlerin sayısı 16,7 milyon kişidir. Bu ölümlerin üçte birden daha fazla bir kısmı orta yaşlı yetişkinleri kapsamaktadır. Gelişmiş ülkelerde ve bazı gelişmekte olan ülkelerde yetişkin erkek ve kadın ölümlerinin ilk iki nedenini kalp hastalıkları ve inme oluşturmaktadır [1].

KVH'nın patogenezinin biri olan hipertansiyonun da görülme sıklığı oldukça fazladır. Dünya genelinde yaklaşık 1 milyar insanın hipertansiyonlu olduğu tahmin edilmektedir [2]. Önceki yıllarda böbrek fonksiyon bozukluğu ve sempatik sinir sistemi aktivasyon artışının hipertansiyona yol açtığı düşünülürken günümüzde damar düz kasında gelişen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin hastalığın fizyopatolojik temelini oluşturduğu düşünülmektedir [3].

Hipertansiyon patogenezi vasküler yeniden düzenlenme, endotelial disfonksiyon ve hiperreaktivite ile karakterize vasküler değişiklikleri içerir. Bu bozuklukların altında yatan hücresel olaylar bozulmuş vasküler düz kas hücresi (VDKH) büyümesi, apoptozis, fibrozis, hiperkontraktilite ve kalsifikasyondur. Makrofaj infiltrasyonu ve redoks sensitif pro-inflamatuvar gen artışı ile ilişkili inflamasyonda vasküler yeniden düzenlenmeye katkıda bulunur [4]. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres doğrudan hipertansiyona yol açmasa bile patogeneze katkı sağlar [5]. Damar düz kasındaki düzenin bozulması ve bunun sonucunda damarın fizyolojik kasılma-gevşeme fonksiyonunda ve kan akımındaki bozulma ise hipertansiyon gelişiminden sorumlu olan fonksiyonel değişikliklerdir [3]. Kardiyovasküler hastalıklara yol açan bir diğer önemli unsur da ateroskleroz olup batı tarzı yaşam stiline yaygınlaşmasıyla bütün dünya da artan bir trende sahiptir [6]. Bu sebeple KVH'da hipertansiyon ve ateroskleroz patogenezinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucu anjiyotensin (Ang) II molekülünün yukarıda sayılan patolojik durumlarda kritik bir rolü olduğu pek çok çalışmada gösterilmiş olup halen bu konu üzerindeki çalışmalar devam etmektedir [7-10]. Ang II molekülü, renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) aktif bir bileşeni olup su-tuz dengesi, kan basıncı, vazomotor tonus, hücre büyümesi, apoptozis/anoikis, hücre migrasyonu ve ekstraselüler matriks (ECM) birikimini düzenleyen pleiotropik ve multifonksiyonel bir peptittir. Aynı zamanda pro-inflamatuvar bir ajan olup vazoaaktif bileşiklerin ve büyüme faktörlerinin üretilmesini de uyarır [11]. Sağlıklı hayvanlara kıyasla hastalıklı hayvanların damar media tabakasında Ang II reseptörünün yoğunluğu 5 kat daha fazladır [12, 13]. Ang II ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir role sahiptir [14]. Bu özelliklerine bağlı olarak hipertansiyon, ateroskleroz, kalp

yetmezliği ve anjiyoplasti sonrası restenoz olaylarında da rol aldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [15-19].

Ang II, yukarıda belirtildiği gibi birçok fizyolojik cevabı regüle eder. Ang II'nin etki ettiği ana hücre VDKH'dir [20]. Klasik olarak bilindiği üzere Ang II hücresel düzeydeki etkilerini anjiyotensin tip 1 (AT1R) ve tip 2 (AT2R) reseptörleri ile gerçekleştirir. AT1R, VDKH'lerinde bol miktarda eksprese edilir ve Ang II'nin (pato)fizyolojik etkilerine aracılık eden reseptör tipidir [21, 22]. Ang II, bir G-protein bağımlı reseptör olan (GPCR) AT1R'e bağlanarak çeşitli sinyal iletim yollarını uyarır. Bunlardan birisi de KVH patogenezinde yer alan, damar media tabakasındaki VDKH proliferasyonuna yol açan p44/42 MAPK aktivasyonudur. İlginç bir şekilde Ang II'nin çeşitli reseptör tirozin kinazları (RTK) doğrudan reseptöre bağlanmasa bile aktive ettiği pek çok çalışmada gösterilmiştir [20, 23, 24]. Ang II bir RTK olan epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) doğrudan bağlanmasa bile reseptör dimerizasyonuna yani aktivasyonuna neden olur ve hücreyi proliferasyona götüren p44/42 MAPK yolunu uyarabilir [20]. Fakat Ang II'nin bu sinyal iletim yolunda doğrudan AT1R üzerinden mi p44/42 MAPK'ı aktive ettiği yoksa EGFR transaktivasyonu üzerinden mi aktive ettiği kesinlik kazanmamıştır. Ayrıca EGFR transaktivasyonu içinde farklı mekanizmalar önerilmekte olup kesin olan mekanizma için tartışmalar sürmektedir. Liu ve ark. transaktivasyon için Src-bağımlı bir tirozin fosforilasyonu önerirken bir başka çalışmada ise Hao ve ark. matriks metalloproteinaz aracılı bir yol önerilmiş olup bu yolda heparin-bağlayan EGF benzeri büyüme faktrninn (HB-EGF) rolüne vurgu yapılmıştır [25, 26].

EGF reseptörleri immnositokimyasal olarak insan aterosklerotik plaklarındaki intimal düz kas hücrelerinde gösterilmiştir. EGF reseptörü ayrıca kültüre rat aortik düz kas hücrelerinde de gösterilmiş olup proliferasyon ve DNA sentezine aracılık edebilir. İn vitro koşullarda EGF ve HB-EGF ligandları düz kas hücrelerinde mitojenik aktiviteye yol açabilir. Ayrıca HB-EGF in vitro ortamda düz kas hücrelerinin migrasyonunu uyarabilir [27]. Periferel kandaki monositler, makrofajlar ve aterosklerotik lezyonlarda EGF için reseptörlerin rollerinin anlaşılması, aterogenez ve diğer kronik inflamatuvar işlemlerde EGF süper ailesi üyelerinin önemini artırır.

Literatür bilgisi ışığında çalışmamızın hipotezi, vasküler düz kas hücrelerinde Ang II uyarımının AT1R zerinden EGFR transaktivasyonuna neden olduğudur. Hipotezimizi test etmek amacıyla, bu çalışmada Ang II ve EGF ile uyarılan hücrelere çeşitli inhibitörler uygulayarak ERK1/2 (p44/p42 MAPK) ve EGFR transaktivasyonunun hücre içi sinyal iletim yollarındaki rollerinin anlaşılmasına katkı sağlamak amaçlandı. Böylelikle Ang II uyarımı sonucu ERK1/2 yolunun aktivasyonunun doğrudan AT1R üzerinden veya EGFR transaktivasyonu üzerinden dolaylı gerçekleştiği gösterilmeye çalışıldı. Ayrıca bu reseptör transaktivasyonunda MMP ve HB-EGF'nin olası rollerinin de aktivasyona etkisi incelenmeye çalışıldı.

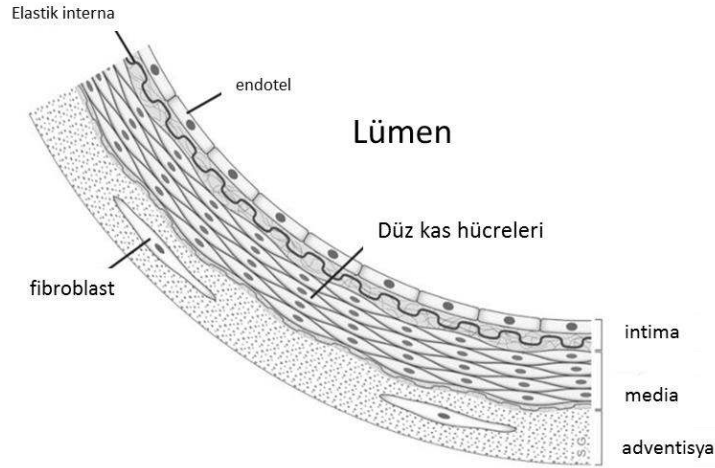
Çalışmamızın sonucunda hedeflenen amaç kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon patolojisinde rol oynayan hücre içi sinyal iletim mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlamak ve bu mekanizmalarda rol oynayan EGFR transaktivasyonu ile ERK1/2 yolunun ilişkisinin aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Bunun anlaşılması, KVH patogenezinin tam olarak aydınlatılması, KVH'lardaki risk

faktörlerinin etkileri, hastalığın prognozu ve tedavisinde yeni hedeflere katkı sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Duvar ve Vasküler Düz Kas Hücreleri

Vasküler duvar esnek ve aktif bir organ olup hücrel ve hücrel olmayan yapılardan oluşur. Vasküler yapıdaki temel hücreler endoteliyal hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlardır [28]. Kalpten kanı periferik dokulara taşıma görevine uygun olarak elastik bir yapıya sahip olan arterler şekil 1’de görüldüğü gibi içten dışa doğru 3 tabakadan oluşur: intima, media ve adventisya. Bu organ statik olmayıp bileşenleri (pato)fizyolojik uyarılara yanıt olarak artma-azalma şeklinde değişikliğe veya yeniden yapılanmaya uğrarlar [28]. İntakt arteriyel media aterosklerozis, restenoz ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde, damar duvarının kasılma-gevşeme, büyüme, gelişme, yeniden düzenlenme ve onarımını içeren birçok yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden sorumludur [28].



Şekil 2.1. Arter duvarının yapısı [29].

VDKH’leri, temel fonksiyonları kontraksiyon, kan damarı gerilimi, kan basıncı ve kan akımını sağlamak olan yüksek derecede özgülleşmiş hücrelerdir. Erişkin kan damarındaki VDKH’leri düşük proliferasyon hızına ve sentetik aktiviteye sahiptirler. Diğer hücre tiplerinden farklı olarak VDKH’leri kontraktıl fonksiyonları için gerekli olan kendine özgü kontraktıl proteinleri, iyon kanallarını ve sinyal moleküllerini eksprese ederler. Aynı zamanda VDKH’leri lokal ortam değişikliklerine yanıt olarak

geriye dönüşümlü şekilde hücre boyutunda, ekstraselüler matriks üretiminde, kontraktil protein ekspresyonunda ve migrasyon yeteneklerinde değişiklik yapabilme esnekliğine sahip olan hücrelerdir [3, 30, 31]. Hasar durumunda VDKH'lerinde proliferasyon ve migrasyonun yanı sıra kollajen, elastin ve proteoglikanları içeren ekstraselüler matriks komponentlerinin sentez hızında artışla karakterize olan yeniden farklılaşma süreci başlar. Yeniden farklılaşma ateroskleroz, stent takılması veya by-pass sonrası restenoz ve hipertansiyon gelişiminde rolü olan temel patofizyolojik mekanizmadır [3, 32].

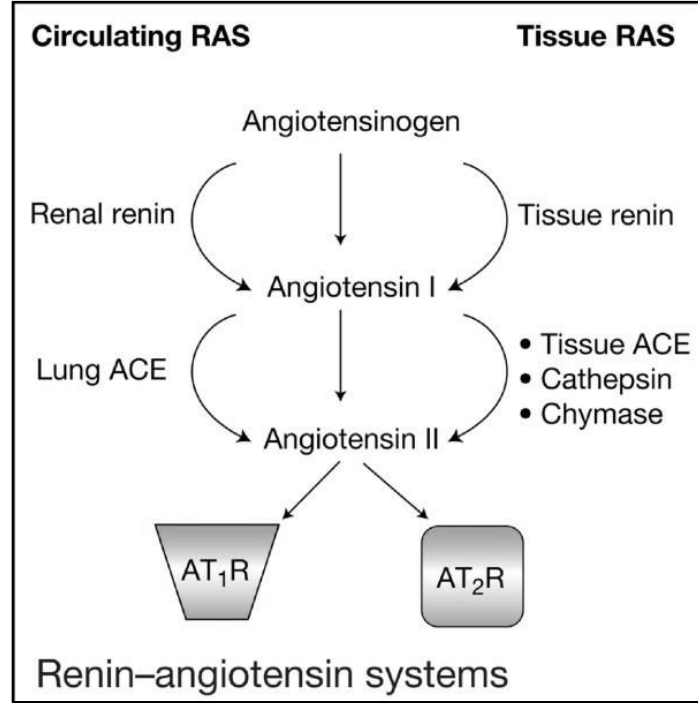
2.2. Anjiyotensin II, Klasik RAS ve Bu Alandaki Yeni Gelişmeler

Ang II oligopeptidinin vasküler sistemde etki ettiği ana hücre tipi yukarıda özelliklerinden bahsedilen VDKH'leridir. Ang II üretiminin temelde iki kaynağı vardır. Bunlardan birincisi klasik renin-anjiyotensin sistemi denilen sistemdir. Klasik olarak RAS, anjiyotensinojenden Ang II molekülünün iki basamakta enzimatik olarak oluştuğu endokrin bir sistem olarak düşünülmektedir. Kan basıncı düştüğünde renal kaynaklı olan 37 kDa'luk renin enzimi salgılanır ve bu enzim hepatik kaynaklı anjiyotensinojen oligopeptidinin N- terminalinden 3 amino asit birimini uzaklaştırarak anjiyotensin I molekülünü oluşturur. Anjiyotensin I, akciğerde bulunan "Angiotensin Converting Enzyme" (ACE) tarafından 2 amino asit birimi uzaklaştırılarak 8 amino asitlik aktif Ang II molekülüne dönüşür. Ang II üretiminin ikinci kaynağı ise Ang II'nin kardiyovasküler sistemde lokal olarak üretilmesidir [21]. Şekil 2'de Ang II üretimi şematize edilmiştir.

Günümüze kadar Ang II'nin RAS'ın efektör peptidi olduğu düşünülmüştür. Bununla beraber son yıllarda RAS hakkındaki genel görüş üç aşamada değişmiştir[4]:

- i. Fonksiyonel olarak aktif doku kökenli RAS'ın keşfi
- ii. Renin/prorenin reseptörünün [(P)RR] tanımlanması
- iii. Fonksiyonel olarak aktif Ang II-türevi peptidlerin bulunması

RAS temelde akut olarak vazokonstriksiyon ile kan basıncını artıran ve kronik olarak ise aldosteron aracılı hacim artışını sağlayan hemodinamik bir regülatuar olarak tanımlanmıştır [33]. Dolaşımdaki RAS'dan bağımsız olarak kontrol edilen doku kökenli RAS varlığı günümüzde bilinmektedir. Doku sistemindeki RAS anjiyotensinojen, renin, ACE, Ang I, Ang II ve Ang II reseptörlerini içeren bütün RAS komponentlerini barındırması ile karakterizedir. Renin hakkındaki görüşler hala tartışılmakta olup lokal olarak dokularda üretildiği ya da dolaşımdan (P)RR ile alındığı kesinlik kazanmamıştır. Fakat dolaşımdan alınıyor olma ihtimali üzerinde durulmaktadır çünkü vasküler duvarda lokal renin üretimi oldukça düşük seviyededir [34]. Lokal RAS sistemi kalp, damarlar, böbrek, adrenal bez, pankreas, merkezi sinir sistemi, üreme sistemi, lenf sistemi ve adipoz dokuda bulunur. Ayrıca RAS bileşenleri gözde de tanımlanmış olup oküler basıncın sağlanmasında fizyolojik olarak önemli olabilir. Hipertansiyon ve diyabetin yol açtığı patolojik vaskülopatiler ile ilişkili olabilir [4]. Lokal RAS otokrin/intrakrin, parakrin ve endokrin yönde hareket eder. Artan doku RAS bileşenleri seviyeleri ateroskleroz, miyokard infarktüs, kardiyak yetmezlik, diyabet ve böbrek hastalıkları gibi kan basıncı yükselmesinden bağımsız kardiyovasküler hastalıklarda görülür.



Şekil 2.2. Ang II üretimi [4].

İntraselüler RAS kardiyovasküler fonksiyona katkı yapabilecek olan bir diğer unsurdur [4, 35]. İntraselüler RAS hücre içerisinde RAS bileşenlerinin varlığı ve Ang II sentezleyebilme yeteneği ile karakterize olan, intraselüler bölgeler aracılığıyla biyolojik etkilere aracılık eden bir sistemdir. Pek çok hücre tipinde Ang II'nin varlığı ve/veya sentezi gösterilmiş olmasına rağmen renin, anjiyotensinojen ve ACE gibi diğer RAS bileşenlerinin hücrelerde lokalize olduğuna dair daha az kanıt vardır. Bununla birlikte anjiyotensinojenin farklı glikozile izoformlarının, reninin birbirine ekli formlarının, ACE'nin intraselüler ve sekrete formlarının, alternatif Ang II üreten enzimlerin (katepsinler ve kimaz) ve intraselüler (P)RR'nün varlığı sitozolik RAS'ın varlığını önermektedir. İntraselüler RAS böbrek, beyin ve kalpte tanımlanmıştır. Ang II'nin floresan füzyon proteini yardımıyla intraselüler overekspresyonu, artmış kan basıncı ve böbrek patolojisiyle koreledir. Bu endojen sistemin (pato)fizyolojik rolü belli değildir [4, 34].

Renin böbrekte jukstaglomerüler aparat tarafından üretilen ve anjiyotensine etki ederek Ang I molekülünü oluşturan proteaz bir enzimdir. Hız sınırlayıcı hidrolitik aktivitesinden dolayı RAS'ın anahtar enzimidir. Renin ayrıca (P)RR'a bağlanarak RAS agonisti olarak davranır. (P)RR, renin ve prorenini bağlayan yeni bir RAS üyesidir. (P)RR'a bağlanan prorenin konformasyonel değişikliğe uğrar ve kardiyomiyositlerde, mezangial hücreler, podositler, distal tübül hücreler, vasküler endotelial ve VDKH'lerinde Ang II'den bağımsız olarak hücre büyümesi ve fibrozisi tetikleyen MAPK yolunu uyarır. Bu reseptörün kesin (pato)fizyolojik etkileri bilinmemekle birlikte özellikle nöral gelişimde önemli olabilir. (P)RR overeksprese eden transgenik hayvanlarda yüksek kan basıncı ya da glomerülosklerozis gelişir ve artmış (P)RR ekspresyonu hipertansiyon modellerinde görülür [4, 36, 37].

ACE, Ang II üreten ana enzimdir ve aynı zamanda kininleri inaktive eder ve böylece bradikinin aracılı vazodilatasyonu da önler. ACE2, Ang-(1-9) ve Ang-(1-7) peptitlerini oluşturmak için Ang I ve Ang II dönüşümünü katalizleyen, genellikle Ang II'ye zıt etkilere aracılık eden bir enzimdir. Azalmış ACE2 ve müteakip Ang-(1-7) üretimi hipertansiyon, diyabet ve böbrek hastalığında vazokonstriksiyon, vasküler yeniden düzenlenme ve oksidatif hasarla ilişkilidir. Artmış ACE2 aktivitesi ise aksine vazodilatasyonu teşvik eder [4, 38].

Ang II'den türeyen küçük peptidler Ang-(1-7), Ang III, Ang IV ve diğer peptidleri içerir. Ang-(1-7), Ang II'den prolilendopeptidaz, prolilkarboksipeptidaz ya da ACE2 ile veyahut da doğrudan Ang I'den prolilendopeptidaz ya da endopeptidaz 24.11 hidroliziyle oluşur. ACE ile Ang-(1-5)'e metabolize edilir. Ang-(1-7) dolaşımında ve dokularda (beyin, kalp, damarlar, karaciğer, üreme organlarında) bulunur. Genel olarak Ang-(1-7) Ang II etkilerine karşı koyar; vazodilatasyon, büyüme inhibisyonu, anti-inflamatuvar yanıt, antiaritmojenik ve antitrombotik etkiye aracılık eder. Bu etkileri nitrik oksit sentaz (NOS) aracılı nitrik oksit (NO) üretimi, protein tirozin fosfatazların aktivasyonu (PTPs), MAPK'ların ve NADPH oksidazın inhibisyonu aracılığıyla gerçekleştirir [4, 39, 40].

Ang III, aminopeptidaz A tarafından Ang II'den oluşturulan ve Ang II'ye benzer etkileri olan biyolojik olarak aktif bir peptiddir. İnsanlarda ve deney modellerinde Ang III infüzyonu kan basıncını artırmış, vazokonstriksiyonu teşvik etmiş ve aldosteron üretimini uyarmıştır. İn vitro olarak büyümeyi, pro-inflamatuvar mediyatörlerin üretimini ve ekstraselüler matriks depozisyonunu uyarır. Ang III, AT1R ve AT2R'üne bağlanır [4, 41].

Ang II'den aminopeptidaz N ile Ang III'ün N-terminalindeki arjininin uzaklaştırılmasıyla üretilen bir diğer küçük peptidde Ang IV'dür. Ang IV, Ang II'den D-aminopeptidaz ile doğrudan da üretilir. Ang IV renal kan akımını artırır, vazodilatasyonu azaltır ve kardiyak fonksiyonları iyileştirir. Diğer anjiyotensin peptidleri Ang-(3-7), Ang-(1-9) ve Ang-(1-12)'dir. Ang-(3-7) beyin ve böbrekte önemliyen Ang-(1-9) bradikininin etkilerini artırır, NO üretimini ve platelet regülasyonunu artırır. Ang-(1-12) ise kardiyak fonksiyonlarda rolü vardır [4, 42].

2.2.1. Anjiyotensin II Reseptörleri ve GPCR Etkileşimli Proteinler

Anjiyotensin II etkilerini çok çeşitli hücre içi sinyal iletim yollarını kendisine ait reseptörleri kullanarak göstermektedir. Bu reseptörler G-protein bağımlı reseptörler (G-protein coupled receptors; GPCRs) olup Ang II tip 1 reseptörü (AT1R ya da AT1) ve Ang II tip 2 reseptörüdür (AT2R ya da AT2). AT1R'nin losartan gibi bifenil imidazollere yüksek afinitesi varken AT2R ise PD123177 ve onun türevi olan CGP42112 gibi tetrahydroimidazopiridinlere karşı yüksek afiniteye sahiptir [4]. AT1R, G-protein bağımlı reseptörlerden olup 7 transmembran bölge ve 359 amino asit içerir. AT2R ise 363 amino asit içerir ve AT1R ile % 34 homoloji gösterir. Bunlardan başka hücre hattında tanımlanmış AT3 reseptörü ve Ang IV bağlayan AT4 reseptörü de tanımlanmıştır [4, 21]. AT1R $G_{q/11}$, G_i , G_{12} ve G_{13} gibi birçok heterotrimerik G-proteinlerle etkileşime girer ve inozitol trifosfat, diaçilgliserol ya da reaktif oksijen türleri (ROS) gibi ikinci mesajcılar üretir. Ayrıca reseptör ve nonreseptör tirozin kinazları, MAPK'ları, AKT ve protein kinaz C'yi aktive eder [4].

Bilinenin aksine AT2R'nin herhangi bir G-proteinle etkileşmediğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır [43, 44].

Ang II, kendine ait hücre yüzey reseptörlerine bağlanıp uyarması ile kompleks sinyal yollarını aktive eder [21]. Her iki reseptör tipi VDKH fonksiyonlarını düzenler fakat etkileri birbirinden farklıdır. AT1R büyüme, inflamasyon ve vazokonstriksiyon ile ilişkiliyken, AT2R apoptoz ve vazodilatasyonla ilişkilidir [21, 26]. Patolojik durumlarda AT2R ayrıca hipertrofi ve inflamasyonu uyabilir [45].

G-protein bağımlı reseptörler sadece G-proteinlerle değil GPCR etkileşimli proteinler olarak adlandırılan (GPCR interacting proteins; kısaca GIP) aksesuar proteinlerle de etkileşirler. Özellikle AT1R ile alakalı olan ve AT1R-asosiyasyon protein (ATRAP) olarak adlandırılan GIP, AT1R'nin negatif regülatörü olarak davranır ve aorta, kalp, akciğer ve böbrekte eksprese edilir; overekspresyonu ise azalmış hücre proliferasyonuna yol açar. ARAP1 (AT1R-associated protein 1) adlı bir başka GIP ise AT1R'nin geri dönüşümünde gereklidir. AT2R ile ilişkili GIP olan ATIP (AT2R-interacting protein) ve ATBP50 (AT2R binding protein of 50 kDa) reseptör tirozin kinazların transaktivasyonu ve büyüme inhibisyonunda rol alır [34].

2.2.2. Ang II ve Vasküler Etkileri

Ang II etkilerini direkt olarak vasküler hücrelerde bulunan Ang II reseptörleri ile ve indirekt olarak diğer faktörlerin salgılanması ve muhtemelen diğer vazodilatatif ajanların ile büyüme faktörlerinin intraselüler sinyalizasyon yollarına etki ederek gösterir. Gösterilen etkilerin pek çoğu AT1R aracılığıyla olur. Bu etkileri kısa ve uzun süreli etkiler şeklinde ayırmak mümkündür. Ang II kısa sürede gerçekleşen sinyal iletimiyle kontraksiyona yol açarken, uzun süreli etkileri ise hücre büyümesi, migrasyon, ekstraselüler matriks artışı, inflamasyon şeklindedir.

Ang II, AT1R bağlanmasıyla fosfolipaz C (PLC) - inozitol 1,4,5-trifosfat -1,2 diacilgliserol sinyal yolağı; fosfolipaz D (PLD) aktivasyonu; Src fosforilasyonu; fosfolipaz A2 (PLA2) aktivasyonu; MAPK yolağı (p44/42 MAPK, p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) ve ERK5); tirozin kinaz yolağı (PDGFR, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), insüline benzer büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R) ve RhoA/Rho kinaz sinyal yolağı aktivasyonu yaparak vasküler fonksiyonel ve yapısal değişikliklerini meydana getirmektedir. Ang II, etkilerini meydana getirmek için indirekt olarak başka yolları da kullanır: vasküler NADPH oksidaz aktivasyonu ile ROS üretimini artırır. Bundan sonra O_2^- ve H_2O_2 alt yoldaki sinyal moleküllerini oluşturan transkripsiyon faktörleri, tirozin kinaz/fosfataz, Ca^{2+} kanalları ve MAPK'ları stimüle eder [11, 21, 26, 46-50]. Losartan, valsartan, candesartan, eprosartan, irbesartan, tasosartan, telmisartandan oluşan ve sartan ailesi olarak da anılan AT1R antagonistleri, Ang II'nin etkilerini bloke ederek gösterirler. RAS aktivitesini düşürücü etkilerinin yanısıra sempatikolitik ve antiproliferatif etkileri de vardır. Ayrıca aldosteron üzerine dolaylı etkileri nedeniyle natriürezis sağlarlar. Bu ajanlardan losartanın ürikozürük etkisi de vardır. AT2R Ang II'nin apoptozis ve vazodilatasyon etkilerinden sorumludur [21].

Ang II'nin en iyi bilinen etkisi potent bir vazokonstriktör olmasıdır. Bunun yanı sıra, vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde rolü olan hücre büyümesi, apoptozis, migrasyon, inflamasyon ve fibrozis gibi birçok hücresel olayda etkisi olan çok

fonksiyonlu bir hormondur [11]. Fizyolojik koşullarda aldosteron üzerinden sodyum reabsorbsiyonu yoluyla plazma hacmini, sempatik sinir sistemi aktivitesini ve susama yanıtını etkileyerek kan basıncı ve sıvı homeostazisini düzenler. Hipertansiyon, ateroskleroz, vaskülit ve diyabette gelişen vasküler hasarlanma şeklindeki patolojik koşullarda, vazokonstriktör, mitojenik, proinflamatuvar ve profibrotik etkileriyle bu hastalıkların gelişimi ve komplikasyonlarından sorumlu tutulan vasküler tonüste artma, endotelial disfonksiyon, yapısal yeniden modellenme ve vasküler inflamasyonun oluşumunda temel bir role sahiptir [3, 11, 21, 26, 46, 47].

2.3. Ang II Uyarımıyla Aktifleşen Sinyal Yolları

Ang II hipertansiyon, ateroskleroz, sol ventriküler hipertrofi ve miyokard infarktüsü gibi KVH patogeneğinde rol oynayan RAS'ın ana peptid hormonudur [51]. Ang II'nin AT1 reseptörüne bağlanmasıyla gerçekleşen olaylar multifazik olup 3 evrede incelenebilir: ani, erken ve geç gerçekleşen sinyal iletim yolları. Ang II, ani etkilerini heterotrimerik G_q proteinleri üzerinden fosfolipaz C'yi (PLC) fosforlayarak ve Src'yi aktive ederek saniyeler içerisinde gösterirken, erken dönem etkilerini fosfolipaz A_2 (PLA_2), fosfolipaz D (PLD), tirozin kinaz ve mitojen-aktif protein kinazları (MAPK) aktive ederek dakikalar içerisinde gösterir. Geç dönem etkilerini ise oksidatif stres üretimi, protoonkogen ekspresyonu ve protein sentezi ile saatler içerisinde gösterir [21].

Ang II'nin AT1R üzerinden PLC, PLD, PLA_2 'yi; non-reseptör tirozin kinaz aktivasyonu üzerinden Src ailesi kinazlar, MAPK ailesi, Janus ailesi kinazlar, STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) proteinleri, fokal adezyon kinaz (FAK), prolince zengin tirozin kinaz 2 (PYK2), p130Cas, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) aktivite artışına yol açtığı gösterilmiştir [14]. Fakat Ang II ile uyarılan ve AT1 reseptörü üzerinden oluşan aktivasyonlar sonucunda meydana gelen sinyal iletim yolları ve bu yolların birbirlerini ne şekilde etkilediği halen incelenmeye devam edilmekte olup bütünüyle anlaşılmış değildir. Özellikle EGFR transaktivasyonunun nasıl gerçekleştiği, buradaki ADAM proteinin rolü (ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase) ve bu reseptörün aktive olduktan sonra MAPK'ları nasıl aktive ettiği kesinlik kazanmamıştır [52, 53].

Ang II hücre büyümesini MAPK'ların [ERK1/2(MAPK3/1), p38MAPK (MAPK14), JNK (MAPK8), ERK5 (MAPK7)] ve tirozin kinazların [Src, JAK, FAK (PTK2), PYK2 (PTK2B), p130Cas (BCAR1)] fosforilasyonu, hücre içi Ca^{2+} mobilizasyonu ve ROS üretimiyle gerçekleştirir [54]. Ayrıca Src, hipertansiyonda Ang II'nin trofik etkisi ve kontraktıl hareketleri için gerekli bir erken sinyal molekülüdür [55, 56]. Hipertansif ratlarda kardiyak, renal ve vasküler dokuda; hipertansif hastalarda VDKH'lerinde Ang II uyarımlı tirozin kinazların ve MAPK'ların aktivasyonu artmıştır [57, 58].

Ang II ayrıca bazı reseptör tirozin kinazları, bu reseptörlere doğrudan bağlanmasa bile aktive edebilmektedir. Bu transaktivasyon olayı epidermal büyüme faktör reseptörü, platelet türevli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor (PDGF) receptor, PDGFR) ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1 (insulin-like growth factor 1 (IGF1) receptor, IGF1R) reseptöründe gösterilmiştir [20, 59]. Ang II-uyarımlı transaktivasyon tirozin kinazlar (PYK2 ve Src), redoks-duyarlı olaylar ve

metalloproteaz bağımlı heparin-bağlayan EGF-benzeri büyüme faktörü (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF) salınmasıyla gerçekleşir [60, 61]. Bu işlemde sorumlu olan metalloproteazın ADAM17 olduğu düşünülmektedir [52, 53]. Aynı zamanda Ang II hipertansiyonda rol alan endotelin 1 (ET-1/EDN1), PDGF, dönüştürücü büyüme faktörü β (transforming growth factor β :TGF- β), temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor:bFGF/ FGF2) ve IGF1 gibi vazoaktif hormonlar ve büyüme faktörlerinin üretimini artırır. Bu olay hiperplazi ve fibrozisi, ileri seviyede ise arteriyel yeniden düzenlenmede artışı tetikleyebilir [4]. C9 hücrelerinde yapılan bir çalışmada Ang II uyarımlı AT1R aktivasyonu, Src ve matriks metalloproteinaz (MMP) aktivasyonu üzerinden kısa süreli ERK 1/2 aktivasyonuna; protein kinaz C (PKC) bağımlı bir yolla da EGFR aktivasyonuna neden olur. Agonist uyarımlı AT1R aktivasyonu, sırasıyla PKC, Src, Pyk2, MMP aktivasyonu ve ardından HB-EGF salınmasına yol açar. Endojen HB-EGF ligandı, EGF reseptörüne bağlanıp aktive ederek adaptör moleküller olan Shc, Grb, Sos ve Ras/Raf/MEK üzerinden ERK 1/2 fosforilasyonuna yol açar [62]. COS7 hücre dizisinde yapılan bir çalışmada ise AT1R üzerinden EGFR transaktivasyonu için HB-EGF salınmasının gerekli olduğu ve bunun gerçekleşmesi için ADAM17'ye ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte bu araştırmayı yapan araştırmacılar, Ang II ile uyarılan hücrelerde vasküler yeniden düzenlenmede rol alan ADAM molekülünün hangisi olduğunun kesinlik kazanmadığını belirtmişlerdir [52].

VDKH'nde Ang II-uyarımli mitojen-aktiviteli protein kinazların (MAPK) aktivasyonu için Src-bağımlı epidermal growth faktör reseptör (EGFR) transaktivasyonu gerekebilir [60]. Ang II aracılı EGFR transaktivasyonu ve arkasından MAPK uyarımı, EGFR'ın katalitik olarak aktif olan c-src ile ilişkili olması yanında Ca^{2+} -bağımlı prolince zengin tirozin kinaz 2 (Proline-rich tyrosine kinase 2, PYK2) aktivasyonu gerektirir. EGFR transaktivasyonu, AT1R aktivasyonu ile uyarılan ve hücreyi büyümeye götüren yolda önemli bir noktada durmaktadır [60].

Kardiyak fibroblastlarda yapılan bir çalışma ise Ang II-uyarımli MAPK aktivasyonunun EGFR transaktivasyonu gerektirmediğini söylemektedir [63]. Ohtsu ve arkadaşlarının retrovirüsle enfekte edilmiş VDKH'nde yaptıkları bir başka çalışma sonucunda ise Ang II ile oluşan EGFR transaktivasyonu için ADAM17 olarak bilinen bir enzime ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir. EGFR transaktivasyonu ve AT1R bağlantı mekanizmasını açıklamaya yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte, bu önemli mitojenik sinyal yolu tamamen anlaşılmış değildir [52].

2.4. EGF Yapı ve Fonksiyonu

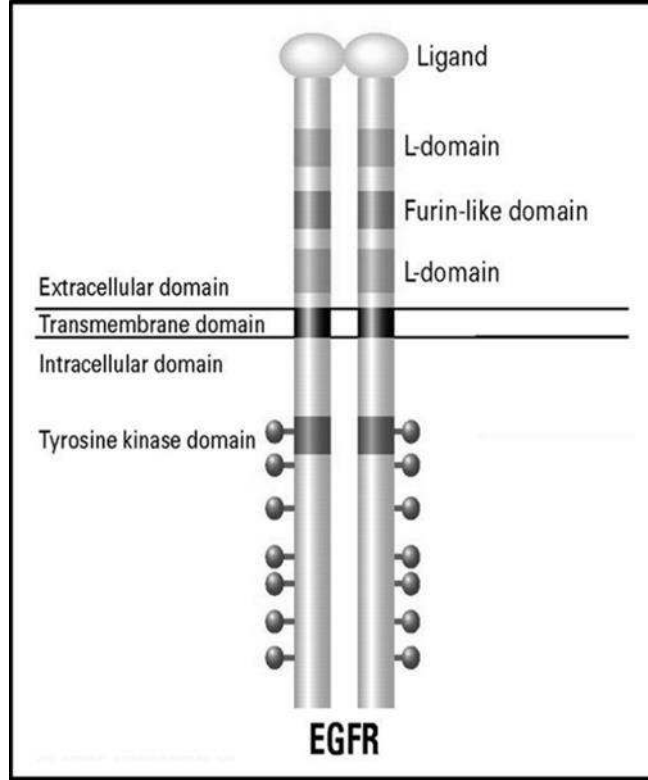
Epidermal büyüme faktörü ailesi, EGF reseptör ailesi üyeleri için birer ligand olup birçok üyesi bulunur. Bu üyeler arasında EGF, TGF- α , HB-EGF, amfiregülin, betaselülin, epiregülin, epigen ve dört adet nörogulin bulunur. EGF ailesi üyeleri genellikle biyolojik aktivite ve yapısal homolojilerine göre gruplandırılırlar. Bütün üyeler ekstraselüler bölgelerinde bir ya da daha fazla sayıda tekrarlayan, korunmuş ve 6 adet sistein içeren motif barındırırlar. Yapıdaki 6 sistein kalıntısı 35-40 amino asitlik bir zincir içerisindedir: CX₇CX₄₋₅CX₁₀₋₁₃CXCX₈GXRC (C: sistein, G: glisin, R: arjinin ve X: herhangi bir amino asidi simgeler). Sistein birimleri C1-C3, C2-C4 ve C5-C6 arasında üç adet intramoleküler disülfid bağı oluşturma potansiyeline

sahiptirler. Disülfid bağ oluşumu reseptöre yüksek afinite ile bağlanma için gerekli olan 3 düğüm üretilmesini sağlar. HB-EGF ve amfîregülîn ek olarak N-terminallerinde heparin bağlama kabiliyetinden sorumlu olan ve bazik amino asitler yönünden zengin bir bölge taşırlar. EGF ailesi tip I transmembran glikoprotein öncüllerinden türerler. Prekürsör molekül büyüme faktör zincirini içeren ekstraselüler bir bölge, hidrofobik transmembran bölge ve sitoplazmik bir bölge içerir [27, 64-66].

EGFR ligandlarının yol açtıkları etki(ler)in gücü birbirinden farklı olabilmektedir. Örnek bir durum HB-EGF'nin EGF'den daha güçlü bir potent mitojen olmasıdır. Nedeni ise HB-EGF'nin heparin bağlayan bölgesinin hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlarına bağlanmaya izin vermesi ve sonuçta biyolojik aktiviteyi modüle etmesi olabilir. EGF ailesinin farklı üyelerinin biyolojik etkileri ise benzerdir. Bütün üyelerin anjiyogenez, yara iyileşmesi, kemik reabsorpsiyonu, ateroskleroz gibi proseslerde gerekli olan hücre migrasyonu, farklılaşma ve gen ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. EGFR ligandları ADAM tarafından kesilerek matür ligand haline getirilirler ve etkilerini gösterirler. HB-EGF ayrıca MMP'ler tarafından da matür hale getirilir. Bu esnada rol alan MMP'lerin özellikle 3- ve 7- nolu olduğu belirtilmiştir [67, 68]. EGF esas olarak kemik iliğindeki plateletlerde üretilerek VDKH ve endotelial hücreleri etkiler. HB-EGF ise makrofajlar, monositler, T lenfositler, düz kas ve endotelial hücrelerde üretilmekte olup EGFR ve Erb4 aracılığıyla VDKH'nde etkisini gösterir.

2.4.1. EGF Reseptörü

EGF reseptörü 1210 amino asitlik polipeptit prekürsörden üretilen, 170 kDa'lık ve tirozin kinaz aktivitesine sahip tip I büyüme faktörü reseptör ailesinin üyesidir. Kromozom 7'nin kısa kolu üzerinde lokalize bir gen tarafından kodlanır. Matür reseptör yoğun bir şekilde glikolize edilmiştir ve yaklaşık 40 kDa'lık N-bağlı oligosakkarit içerir. Bu yapı hücre yüzeyine translokasyon için gereklidir. EGF reseptörünün 621 amino asitlik ekstraselüler bölgesi, 23 amino asitlik transmembran bölge aracılığıyla tirozin kinaz aktivitesine sahip 542 amino asitlik intraselüler bölgeye bağlanır (şekil 2.3). Ekstraselüler ya da ektodomain bölgesi EGF ya da diğer ligandların bağlanmasından sorumludur. Reseptörün ekstraselüler bölgesinin dört bölgeden oluştuğu; bunlardan I ve III'ün ligand seçiciliğini sağladığı, sistince zengin olan ve bütün reseptör ailesi üyelerinde bulunan II ve IV'ün ise reseptörlerin birbiriyle temas halinde bulunmasına ve plazma membranına yakın bir şekilde lokalize olmasını sağladığı önerilmiştir. Transmembran bölge tek bir α -heliks içerir ve fonksiyonu reseptörü plazma membranına bağlı tutmaktır. Sinyal iletiminde herhangi bir rolü olmadığı düşünülmektedir. Jukstamembran bölgesi EGFR üyeleri arasında korunmuştur. Reseptör down-regülasyonu (Thr 654 aracılı), ligand bağımlı internalizasyon olayları ve heterotrimerik G-proteinlerle etkileşim gibi düzenleyici fonksiyonlar için gerekli olduğu düşünülmektedir [27, 69, 70].



Şekil 2.3. EGF reseptörünün şematik olarak gösterimi.

Sitoplazmik bölgenin kinaz seçiciliği, yüksek afiniteli bağlanma, mitojenik ve transforme edici potansiyel ve reseptörün sinyal trafiği gibi olayları tanımlayan yapısal belirleyici kısmı taşıdığı bulunmuştur. Dört EGFR aile üyesi de sitoplazmik bölgede kesintiye uğramamış tek bir tirozin kinaz bölgesi içerir. Bu bölge bütün reseptör tirozin moleküllerinin en yüksek düzeyde korunduğu bölgedir. GlyXGlyXXGlyX(15-20)Lys motifi ATP bağlama işlevini üstlenir. Lys751 rezidüsünün değiştirilmesi kinaz aktivitesini tamamen ortadan kaldırır. Karboksi terminal kuyruk zinciri bilinen RTK'lar arasında en çeşitli olanıdır. Bu bölgedeki aydınlatılmış tirozin birimi fosforilasyon bölgeleri 992, 1068, 1086, 1148 ve 1173'dür. Reseptör otofosforilasyonu intermoleküler proses aracılığıyla intrinsik kinaz aktivitesi ile gerçekleştirilir [27, 71-73].

EGF reseptörünün ligand uyarımlı oligomerizasyonu canlı hücrelerde, intakt izole hücre membranı ve detarjan çözünür, saflaştırılmış reseptör numunelerinde gösterilmiştir. Biyofizik araştırmaları monomerik EGF'in reseptörüne bağlandığını ve daha sonra başka bir monomerik EGF:EGFR kompleksi ile dimer oluşturduğunu önerse de ligand-reseptör kompleksinin nasıl oluştuğu hala tartışmalı olan bir konudur. Reseptör dimerinin ligand uyarımlı stabilizasyonu, jukstamembran bölgede esnek bir rotasyon ya da burkulma ile karakterize konformasyonel değişikliği kolaylaştırır. Bu olay, sitoplazmik bölgelerin stabilizasyonu ve reseptör otofosforilasyonu ile sonuçlanan kinaz bölgelerinin aktivasyonuna yol açar. Tirozin fosforilasyonu ile katalitik bölgenin aktivasyon düğümü, açık bir konfigürasyon kazanarak ATP ve substratlara erişim izni verir. Reseptörün kendisi üzerinde ve

sinyal iletiminde gerekli olan hücresel proteinler üzerinde tirozinlere MgATP'den fosfat transferine olanak tanır [27, 74-77].

2.4.2. EGF, HB-EGF ve Vasküler Etkileri

EGF reseptörüne ligand bağlanması pleyitropik biyolojik etkilere sahiptir. Hücresel yanıtlar mitogenez, apoptoz, kemotaksis ve farklılaşma gibi olayları içerir. EGFR'nin MAPK ve PI3K yollarını aktive ettiği bilinmektedir. EGF ailesi ligandları aterojenik proseslerle alakalı önemli biyolojik etkilere aracılık etmektedirler. EGF ve HB-EGF düz kas hücrelerinin farklılaşmış, proliferatif olmayan bir fenotipten yeniden farklılaşmış proliferatif ve migratör fenotipe transformasyonuna aracılık eder. Bu değişim ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir [27, 78].

EGF bir düz kas hücre mitojeni olup etkileri TGF- β , Ang II, IGF-I ile artabilirken, HDL ile inhibe olabilir. Dahası intimal düz kas hücrelerinin medial düz kas hücrelerine kıyasla EGF'in mitojenik etkilerine daha hassas olduğu gözükmemektedir. VDKH'lerinde EGFR'nin EGF ile uyarımı MAPK yolağını aktive eder ve Ang II etkisini inhibe eder. Aterogenez esnasında plateletler EGF'in kabul edilmiş kaynağı olsalar da, protein biyosentez kapasitesi olmadığı için aterojenik evrede geç aşamada gerekirler [27, 79, 80].

1991'deki keşfinden bugüne kadar HB-EGF'nin aterosklerozda önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Düz kas hücresi kemoatraktanı ve mitojeni olduğu belirlenmiştir [81]. HB -EGF proteini monosit, düz kas hücresi, T hücreleri ve endotel tarafından salgınır ve ekspresyonları aterogenezle alakalı birçok faktör ile upregüle edilir [82, 83]. HB-EGF mRNA'sı adipoz dokuda bol miktarda bulunmuştur. Plazma HB-EGF seviyeleri artan vücut yağ içeriği ile artar ve bu durum insanlarda koroner arter hastalığı riski ile alakalı gözükmemektedir. Miyagawa ve ark. 1995 yılında düz kas hücresindeki EGFR ekspresyonunda olduğu gibi VDKH'leri ve makrofajlarda insan aterosklerotik aortasıyla ilişkili HB-EGF ekspresyonunu rapor etmişlerdir [84]. Daha sonra insan koroner arterlerinde HB-EGF varlığı keşfedilmiş olup bu proteininin varlığı koroner ateroskleroz varlığı ile yakından ilişkilidir. Düz kas hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen HB-EGF'nin aterosklerotik prostepte gerekli olabileceği, özellikle düz kas hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunda, ayrıca EGFR aracılı sinyal yolu üzerinden düz kas hücreleri ve makrofajlar arasındaki interaksiyonda rolü olabileceği önerilmiştir. HB-EGF kültüre VDKH'lerinde GPCR ile EGFR transaktivasyonuna aracılık edebileceği ve VDKH'nin regülasyonunda önemli olabileceği gösterilmiştir [27, 85].

EGFR insan aterosklerotik plağında intimal düz kas hücrelerinde immünohistokimyasal olarak tanımlanmıştır. Ayrıca kültüre rat aortik düz kas hücrelerinde de gösterilmiş olup hücre proliferasyonu ve DNA sentezine aracılık eder. EGF reseptör ailesi birçok ekzojen faktör ile kinaz bölgesindeki ATP bağlanma bölgesinin ve harici ligand bağlanma bölgesinin hedeflenmesi ile inhibe edilebilir. Trifostinler olarak adlandırılan reseptör tirozin kinaz inhibitörleri (TKIs) ailesi reseptör substratları ile yarışarak inhibisyonu sağlamak için tasarlanmışlardır. Bu bileşiklerin EGF uyarımlı proliferasyonu inhibe ettiği fakat reseptör internalizasyonu, degradasyonu ya da ligand bağlanmasını etkilemediği görülmüştür. Bir çok EGFR inhibitörü ile klinik denemeler ve araştırmalar yapılmaya devam edilmektedir.

Periferal monositlerin subendoteliyal boşluğa toplanması, bunların makrofajlara dönüşmesi ve müteakip proliferasyon aterosklerozda kritik bir basamaktır. EGF reseptörü monosit ve makrofajları da içeren ve aterosklerotik lezyonlarda bulunan birçok hücre tipinde tanımlanmıştır. Ligand bağlanması ile EGFR aktivasyonu, apoptoz ve proliferasyon proseslerini de kontrol eden pekçok sinyal yolağının aktivasyonu ile neticelenir. EGF ligandı monosit derive makrofajların hem kemotaksis hem de proliferasyonuna aracılık eder. EGF ve HB-EGF gibi EGFR ligandları aterosklerotik plaklarda ya da plakla ilişkili hücreler tarafından eksprese edilir. EGF için periferal kan monositleri, makrofajları ve aterosklerotik lezyonlarda reseptörün tanımlanmış olması ile aterogenez ve diğer kronik inflamatuvar proseslerde EGF süper ailesi üyelerinin potansiyel önemi artmıştır. EGFR ve ligandları aterogenezde VDKH, endoteliyal ve monosit/makrofaj proliferasyonu ile migrasyonun kontrolünde yakın gelecekte fayda sağlayabilirler [27, 86-88].

2.5. G-Protein Bağımlı Reseptörler ve Reseptör Tirozin Kinazların Etkileşimi

G-protein bağımlı reseptörler 800'den fazla üyesi ve hormonlar, nörotransmitterler, vazoaaktif peptidler, ışık gibi pek çok farklı agonistleri ile en büyük membran reseptör ailesini temsil ederler. G-protein bağımlı reseptörlerin önemi hakkındaki geleneksel görüş kısa sürede metabolizma regülasyonu, kontraktilite ve kan basıncı düzenlenmesi gibi özellikleri üzerine odaklanmıştır. Bunun aksine bir başka ana membran reseptör ailesi olan reseptör tirozin kinazlar (RTK) hücre proliferasyonu, farklılaşma, motilite ve sağ kalıma aracılık etmek üzere görev yaparlar. Başlangıçta bu reseptör ailelerinin birbirinden bağımsız hareket ettiği düşünüüyordu. Fakat son yıllarda bariz bir şekilde görüldüğü üzere proliferen olan hücrelerde de eksprese edilen G-protein bağımlı reseptörlerin proliferasyonu uyardığı gözlenmiştir. Buna ek olarak G-protein bağımlı reseptörlerin ERK gibi RTK sinyal yolunun tipik bir örneği olan MAPK'ları aktive ederek mitojenik yanıtlara aracılık edebilir. G-protein bağımlı reseptörler ve RTK sinyal yolağı arasındaki ilişki oldukça karmaşıktır [45, 89, 90].

Reseptör tirozin kinazlar; 58 üyesi bulunan transmembran glikoproteinleri içeren, 20 alt gruba bölünen ve çoğunluğunu EGF gibi büyüme faktörü reseptörlerinin oluşturduğu bir ailedir. RTK'lar bir ekstraselüler ligand bağlanma bölgesi, bir transmembran bölge ve bir adet intrinsik tirozin kinaz aktivitesi yanında pek çok regülatuvar tirozin rezidüsü de içeren sitozolik bölgeye sahiptirler. Yapıdaki fosforile tirozin rezidüleri pek çok adaptör protein (Grb2 ya da Shc gibi) ya da enzim (PLC γ 1 gibi) için bağlanma bölgesi olarak işlev görür. Dört ana yolak RTK'ların aracılığıyla gerçekleşir:

1. MAPK'lar kaskadı
2. PI3K yolağı
3. STAT ailesi üyeleri
4. PLC yolağı

Bunların aktivasyonu sonucunda birçok hedef proteinin modülasyonu ve nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gerçekleşir. EGFR ailesi 4 üyesi olan bir reseptör ailesidir. Bu reseptörlerin ligandlarının ve sinyal yollarının önemi hücre proliferasyonun kontrolü, sağkalım ve farklılaşmaya aracılık etmeleri nedeniyle [89, 91]. En çok çalışılmış ve karakterize edilmiş RTK ise EGFR ya da diğer bilinen

isimleriyle ErbB1 veya HER1'dir. EGF reseptörü transmembran glikoprotein yapısında olup 1186 amino asit ihtiva eder [45]. İki tane sisteince zengin bölge içeren 622 amino asitlik amino terminal ekstraselüler bölge ligand bağlanma bölgesini oluşturur. Yapıda membranı geçen tek bir alfa-heliks varken 542 amino asitlik intraselüler bölge üç kısımda incelenebilir: sırasıyla yaklaşık 50 amino asitlik jukstamembran bölgesi (membrana intraselüler taraftan komşu), devamında yaklaşık 250 amino asitlik tirozin kinaz bölgesi (SH1) ve son olarak 229 amino asit uzunluğunda tek bir karboksi terminal uç. Karboksi terminal ucu beş otofosforilasyon motifi içerir, bu bölge SH2 ya da PTB (phospho-tyrosine binding) bölgesi içeren proteinleri bağlar [78].

Ang II gibi G-protein bağımlı reseptörleri aktive eden pek çok ligandın tanımlanması, bu ligandların mitojenik etkilere aracılık edebildiği ve GPCR'lerin proliferatif sinyal iletimine yol açabildiği gözlemlerden sonra GPCR'lerin hücre büyümesini düzenleyen mekanizmalara nasıl etki ettiğini belirlemek için pek çok çalışma yapılmıştır. Bu konuda ilk yapılan gözlemlerden biri ERK1/2 ailesinin sadece RTK'ların mitojenik sinyal iletiminde rol oynamayıp aynı zamanda GPCR aracılı büyümeyi artırıcı etkilerde de önemli bir rolü olduğudur. Küçük G protein Ras ile ERK aktivasyonu RTK'ların iyi anlaşılmış temel bir sinyal yoludur. Çok sayıda moleküler mekanizma GPCR ile RTK arasındaki bağlantıyı sağlamak için önerilmiş olup bunlardan birisi de şudur:

- i. GPCR uyarımıyla RTK'lar tirozin fosforilasyonuna uğrar
- ii. Bu olay RTK'lar için proteolitik olarak endojen ligandların üretimiyle gerçekleştirilir.

Bu olay “transaktivasyon” olarak isimlendirilir. Kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve metastazındaki rolünden dolayı kanser hücrelerinde de bu konu hakkında geniş kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır [89]. Reseptör tirozin kinazlar sadece GPCR ile değil aynı zamanda sitokin reseptörleri, iyon kanalları, integrinler ve diğer RTK'lar gibi farklı sinyal yollarıyla da transaktive edilebilirler [45].

2.6. Ang II ve EGFR Transaktivasyonu

Reseptör tirozin kinazların transaktivasyonu ilk olarak 1995 yılında VDKH'lerinde gösterilmiştir. Linseman ve ark. Ang II'ye yanıt olarak PDGFR fosforilasyonunu; Rao ve ark. ise thrombine yanıt olarak IGF-1R fosforilasyonunu göstermiş bu araştırmacılar RTK'lar ve GPCR arasındaki muhtemel bir ilişkiye ilk atıfta bulunan kişilerdir [92, 93]. Bir yıl sonrasında ise Daub ve ark. Nature'da yayınladıkları makalede GPCR ile EGFR transaktivasyonunu göstermişlerdir [94]. Bu çalışma EGFR transaktivasyonu hakkındaki ilk çalışma olmuştur [89]. Ang II uyarımı gerçekleştirilerek gösterilen ilk EGFR transaktivasyonu ise 1997 yılında Eguchi ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. EGFR transaktivasyonu gözlemlendikten sonra gerçekleşen aktivasyonun nasıl meydana geldiği incelenmiş ve çeşitli görüşler ortaya atılmıştır.

Transaktivasyon olayının kalsiyum bağımlı olduğunu öneren çalışmalar olduğu gibi kalsiyumdan bağımsız olduğunu öneren çalışmalar da mevcuttur. ROS'un transaktivasyonda rolü olabileceği de önerilmiştir. GPCR ile transaktivasyon işleminde doğrudan ikincil mesajcılar ve/veya ikincil mesajcılarla yönetilen sinyal iletim yolları gerekli olabilir. Bu yollar intraselüler Ca^{2+} artışı, PKC aktivasyonu,

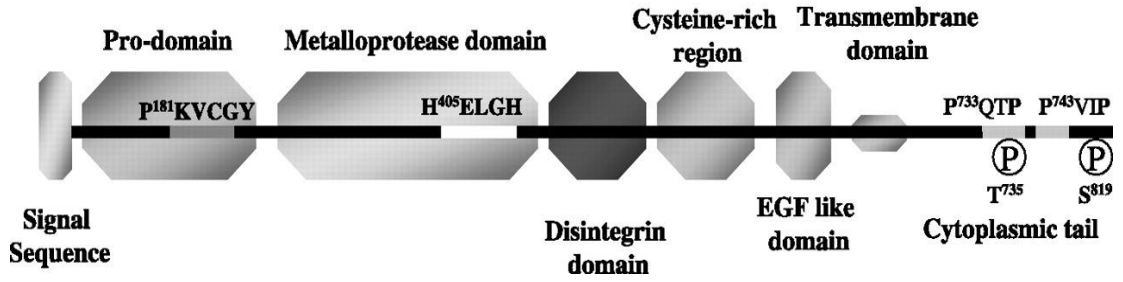
ROS üretimini içerir. Sitozolik nonreseptör tirozin kinazlar olan Src ve PYK2 gibi moleküller transaktivasyonda gerekebilirler. Son olarak da bu işlem için bir metalloproteaz gerekebilir ki bu durum pek çok GPCR agonisti varlığında gösterilmiştir [90].

Bu alanda yeni bir konsept olarak HB-EGF üretimine bağlı olarak EGFR transaktivasyonunun gerçekleştiği öne sürülmüştür. HB-EGF hücre yüzeyinde 208 amino asitlik transmembran prekürsör olarak eksprese edilir. MMP ya da ADAM aktivasyonu sonrası proHB-EGF'den 72-87 amino asitlik HB-EGF (EGFR ligandları arasında yer alıp EGF ailesi üyelerinden biridir) oluşmasına müteakip serbest HB-EGF'nin EGFR'a bağlanması EGFR homodimerizasyonu ve otofosforilasyonuna yol açar. Bu hipotez ilk kez Prenzel ve ark. tarafından 1999'da ortaya atılmıştır [45, 95]. Aynı gözlem VDKH'lerinde MMP inhibitörü ya da toksik olmayan difteri toksin mutanlığı CRM197 kullanımıyla inhibe edilen Ang II uyarımlı EGFR transaktivasyon deneyinde Saito ve ark. tarafından gözlenmemiştir [20]. Kardiyak fibroblastların Ang II ile muamele edilmesi sonucu hücrelerin konsantre edilen süpernatantlarında EGF aktivitesi gözlenmemiştir. Kültür medyumunun nötrleştirici anti-EGF antikoruna ile muamelesi de Ang II uyarımlı EGFR aktivasyonunu etkilememiştir [20, 96].

2.6.1. EGFR Transaktivasyonu ve Uyardığı Alt Yolaklar

Transaktive EGFR hücre içi sinyal olaylarında önemli bir role sahiptir. Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu transaktive EGFR'ın alt yolak olayıdır. Spesifik EGFR kinaz inhibitörü AG1478 uygulanmasıyla Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu önlenmiştir. Ang II uyarımlı ERK aktivasyonu için Ras-bağımlı ve Ras-bağımsız iki yol önerilmiştir. EGFR transaktivasyonunun yol açtığı diğer alt yolak olayları c-Fos gen ekspresyonu, DNA sentezi ve protein sentezidir. VDKH'nde Ang II uyarımlı p70 S6 kinaza ait serin 411 fosforilasyonu EGFR-bağımlı Ras aktivasyonu gerektirir. Ang II uyarımı sonrası Shc ve Grb2 (SH2 bölgesi içeren adaptör proteinler) EGFR ile etkileşime geçerler. AG1478 ve dominant negatif EGFR mutant uygulanması Ang II uyarımlı fibronektin ve TGF- β sentezini durdurmuştur [20, 90].

EGF ligand ailesinin üyelerinden birisi de HB-EGF'dir. Bütün EGF ligand ailesi üyeleri inaktif transmembran öncülleri olarak sentezlenirler ve daha sonra matür aktif büyüme faktörünü salmak üzere proteolitik ayrışmaya uğrar. Daha sonra reseptör aktivasyonu yani sitoplazmik kuyruk kısmındaki spesifik tirozin birimlerinin fosforilasyonları gerçekleştirilir. Günümüzde membrana bağlı olan inaktif büyüme faktörü öncü moleküllerinin matür hale gelmesi için onları fizyolojik ve patolojik koşullar altında enzimatik olarak kesen, serbest hale getiren ve reseptör aktivasyonuna neden olan ADAM proteinleri oldukça önem kazanmıştır. ADAM üyeleri "metzincin" süper ailesinden olup protozoanlardan memelilere kadar 40 ADAM ortoloğu tanımlanmıştır. Tipik bir ADAM molekülü şekil 2.4'de ADAM 17 için görüldüğü gibi N-ucundan C-ucuna doğru sırasıyla bir NH₂-terminal sinyal peptidi, bir pro-domain kısmı, bir metalloproteaz kısmı, bir disintegrin bölgesi, bir sistein zengin bölge, bir EGF-benzeri bölge, bir transmembran bölge ve son olarak bir sitoplazmik kuyruk içerir [90].

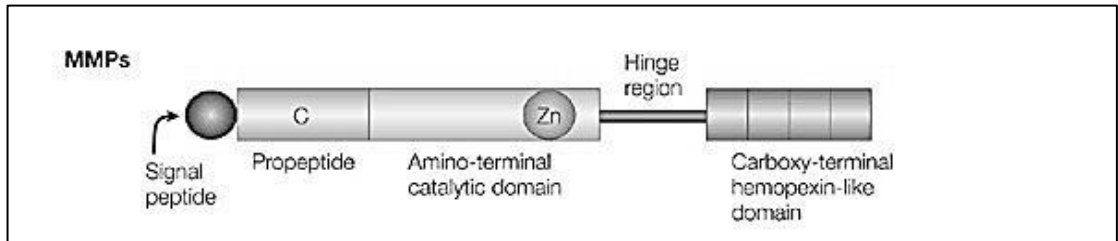


Şekil 2.4. ADAM enziminin yapısı [90].

Birçok ADAM ailesi üyesinin GPCR ile uyarıldığında birçok hücre/doku tipinde EGFR transaktivasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. İncelenen hücre tipi ve GPCR agonistine bağlı olarak gerçekleşen GPCR uyarımlı EGFR transaktivasyonundaki ADAM proteininin tipi değişkenlik gösterir. Kardiyovasküler hormon Ang II ana olarak AT1R üzerinden etkisini gösterir. Ang II'nin AT1R ile EGFR transaktivasyonunu uyardığı, bu işlemi HB-EGF salınımıyla başardığı VDKH'leri gibi değişik hücrelerde gösterilmiştir. Değişik hücrelerde Ang II uyarımı ile HB-EGF salınımı ve müteakip EGFR transaktivasyonu işleminde ADAM17 (bir diğer adı TACE; TNF- α converting enzyme) proteininin rol aldığı gösterilmiştir [61, 97]. ADAM17 molekülü insanlarda 824, ratlarda (*Rattus norvegicus*) 827 amino asitten oluşan, EC numarası 3.4.24.86 olan, her bir alt birimi 1 çinko iyonu bağlayan ve endopeptidaz aktiviteye sahip olan bir enzimdir [98].

2.6.2. Matriks Metalloproteinazlar ve EGFR Transaktivasyonundaki Roller

Memeli MMP'leri, aynı zamanda yaygın olmamakla beraber matriksinler adıyla da anılmakta olup, yapısal olarak ilişkili ve katalitik bir çinko iyonu içeren 23 adet nötral endopeptidaz enzimi kapsar. Üreme, gelişme, immün fonksiyonlar ve doku tamiri gibi birçok fizyolojik rolleri olmasına karşın kanser, inflamasyon, otoimmün, vasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumlarda da rol oynarlar. Yapı olarak tipik bir MMP molekülü şekil 2.5'de görüleceği gibi bir sinyal peptidi, bir propeptid, bir katalitik bölge, bir Zn^{2+} bağlayıcı bölge, değişken uzunlukta bağlayıcı (linker) ya da menteşe bölgesi ve son olarak substrat seçiciliğine katkı sağlayan, endojen inhibitörlere ve kargo reseptörleri ile etkileşimde bulunan hemopeksin bölgesi ihtiva eder.



Şekil 2.5. Genel bir MMP molekül yapısı [99].

Katalitik bölgede korunmuş üç histidin birimi propeptidde bulunan Cys amino asidi ile etkileşim halindeki Zn^{2+} iyonunu koordine eder. Yapıdaki çinko iyonu kataliz için gerekli su molekülünü bağlar. MMP alanındaki ufuk açıcı gelişme MMP'lerin sadece ECM parçalayıcı fonksiyonlarının olmadığı aynı zamanda pek

çok sekrete molekülün ve membran ilişkili substratların ayrılıp salınmasına yol açmak suretiyle normal hücre davranışının modülasyonu, hücre-hücre iletişimi ve tümör ilerlemesi gibi sofistike roller oynamasının anlaşılması olmuştur [100, 101]. MMP'lerin kollajen, elastin, jelatinler ve kazein gibi damar duvarındaki ECM bileşenlerini parçalama özelliklerinden dolayı aterosklerotik plak kompozisyonunu da değiştirebilirler. Bu değişim daha kararlı ya da daha kararsız aterosklerotik plak fenotipiyle sonlanabilir. Sağlıklı insan damarlarının aterosklerotik olanlara kıyasla daha düşük MMP seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir. MMP'lerin VDKH'nde proliferasyon, apoptozis ve migrasyonuna neden olduğu bilinmekte olup aterosklerotik fenotipi de bu özelliği ile etkilediği düşünülmektedir. Kısaca MMP'ler ateroskleroz, torasik aortik diseksiyon, vasküler yeniden modellenme, intima formasyonu ve anevrizma gibi vasküler patolojilerle ilişkilidirler [100-103].

Ang II uyarımlı EGFR transaktivasyonu ve sonrasında gelişen ERK aktivasyonunda önceki yapılan çalışmalarda gösterildiği ve evvelki bölümlerde bahsedildiği gibi ADAM aracılı HB-EGF salınmasının rolünden bahsedilmiştir. Ek olarak HB-EGF salınmasında MMP'lerin rolü olabileceği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. MMP-1, -2, -3 ve -9 gibi pek çok MMP VDKH'lerinde eksprese edilmekte olup vasküler yeniden modellenmede adları anılmaktadır [51]. Ang II'nin MMP aktivasyonuna yol açtığı ve MMP'lerin HB-EGF salınmasına aracılık ettiği yönünde yapılan çalışmalar bulunmaktadır [67, 68, 104-106]. Geniş spektrumlu bir MMP inhibitörü olan GM6001 (ilomastat ya da galardin olarak da bilinir) ile yapılan bir çalışmada da MMP'lerin EGFR aktivasyonu için gerekli olabileceği görüşü vurgulanmıştır [14].

Diğer RTK'lerden farklı olarak EGFR, dimerizasyon ve tirozin kinaz aktivitesi için ligand bağlanmasına ihtiyaç duymaz. Bu özellik EGFR'ın transaktivasyondaki rolü için gayet uygundur. Kwatra ve ark. EGFR dimerizasyonu için reseptörün, ligand bağlanma bölgesine ihtiyaç olmadığını; Tsi ve ark. ise bir GPCR olan β 2-adrenerjik reseptör aktivasyonunun EGFR otofosforilasyonu ve ERK1/2 kaskadının aktivasyonundan sonra EGFR homodimerizasyonuna yol açtığını bildirmişlerdir. Bu bulgular EGFR'ın EGF ligand uyarımından farklı bir şekilde dimer oluşturabileceği ve otofosforile olabileceğini önermektedir. Tang ve ark. da Ang II-uyarımlı EGFR transaktivasyonu için EGFR'ın karboksil terminalinin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Konkanavalin A ile EGFR karboksil terminalinin proteolitik ayrılması EGFR transaktivasyonunu önlemiştir.

2.7. Anjiyotensin II'nin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü

Ang II aracılı vasküler fonksiyonel değişikliklerin başında gelen vazokonstriktör etki, hücre içi Ca^{2+} düzeyinin artışı ve RhoA/Rho kinaz yolağının katkısıyla vazokonstriksiyondaki artma ve artan NADPH oksidaz aktivitesi sonucunda O^{2-} üretiminin artması ile NO biyoyararlanımının azalması sonucunda vazodilatasyondaki azalma sonucunda oluşmaktadır. Hipertansiyonda Ang II sinyalleri, kontraksiyon artışına, yetersiz dilatasyona ve vasküler tonüs artışına yol açar. Ang II hücre büyümesini, tirozin kinazların ve MAPK'ların aktivasyonu, hücre içi Ca^{2+} 'un salınımının stimülasyonu ve ROS üretiminin artışı ile stimüle eder. Aynı zamanda, Ang II hipertansiyonda, transforming growth factor- β , endotelin-1, PDGF, bazik fibroblast büyüme faktörü ve IGF-1'in içinde olduğu vazoaktif hormonların ve

büyüme faktörlerinin üretimini artırır. Bu etkisiyle, vasküler yeniden modellenmede rolü olan hücre proliferasyonu, protein sentezi ve fibrozis oluşumunu artırır [11, 21, 46, 47].

Hipertansiyonda, aterosklerozda, diabetes mellitusta ve vasküler hasarla ilişkili diğer durumlarda vasküler duvarın inflamasyonunun anahtar rolü oynadığına ilişkin pek çok kanıt bulunmaktadır [50, 107]. Vasküler inflamasyon, hipertansiyon gibi damar hasarı olan durumlarda lipid oksidasyonu ile birlikte proaterojeniktir [108]. İnflamasyon, RAS'ı aktive edebilir, böylece yeniden modellenme ve hipertansiyon gelişimine katkısı vardır. Ang II'nin vasküler duvarda kan basıncı bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla belirgin proinflamatuvar etkileri vardır ve inflamasyonun oluşumunun her basamağını indükleyebilir. Vasküler geçirgenliği artırır, ROS, sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimini indükler ve redoksa duyarlı inflamatuvar genlerin aktivasyonuna neden olur. Ang II aynı zamanda, damar duvarındaki proinflamatuvar moleküller olan VCAM-1, ICAM-I ve E-selektin ve P-selektinin redoks-bağımlı yollar aracılığıyla ekspresyonunu artırır. Ang II, vasküler duvarda VCAM-1, MCP-1, IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α üretimini artırarak lökositlerin media tabakasında toplanmalarını artırır [50, 109]. Preklinik ve klinik deneylerde, RAS'ın ACE inhibitörleri ve AT1R antagonistleriyle farmakolojik olarak blokajı sonucunda vasküler inflamatuvar hücrelerin ekspresyonunun azaltıldığı ve hipertansiyon, hiperlipidemi veya diyabet ile ilişkili kardiyovasküler komplikasyonların tedavisinde yararlı oldukları gösterilmiştir [108-110].

COX-2, inflamatuvar yanıtın önemli bir modülatörü olan PG sentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir ve inflamasyona yanıt olarak pek çok dokuda yüksek düzeyde eksprese edilir [111]. Ang II, AT1R yoluyla COX-2 ekspresyonunu ve aktivitesini indüklerken, böbrek makula densasında COX-2 ekspresyonunu azaltır. Bu etkileriyle COX-2, Ang II'nin mitojenik ve migrasyonu artırıcı etkilerine aracılık eder [112, 113]. Ang II'nin ERK1/2 MAPK aktivasyonu yoluyla COX-2 ekspresyonunun indüksiyonu üzerinde kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir [114]. Ang II'nin insan VDKH'de DNA sentezini ve hücre migrasyonunu artırıcı etkilerinin COX-2 aktivitesinin inhibisyonu ile bloke edildiği saptanmıştır, bu da Ang II'nin VDKH'deki etkilerinin COX-2 ekspresyonunun artışı ile şiddetlenebileceğini düşündürmektedir [115]. Ang II'nin aynı zamanda PG sentezini artırdığı ve VDKH'de AT1R yolağının aktivasyonu ile PG'lerin oluşumunu regüle etmek için COX-2'yi kullandığı gösterilmiştir. Ang II'nin PG salınımını artırıcı etkisinin bir bölümünden PLA2 aktivitesini artırması sorumluyken diğer taraftan COX-2 ekspresyonunu artırması da olaya karışır [116]. COX-2 enzimatik aktivitesinin spesifik inhibitörleriyle Ang II'nin VDKH büyümesi ve migrasyonunu stimüle edici etkileri de belirgin olarak zayıflatılır. Bu da COX-2 ve bu enzimin TxA2 gibi ürünlerinin VDKH'indeki Ang II aracılı mitojenik ve inflamatuvar yanıtlarda önemli bir rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir [115, 117]. Bu sonuçlar, COX-2 inhibitörlerinin ACE inhibitörleri veya AT1R antagonistleri ile yapılan tedaviye eklenmesinin hipertansiyon gibi hastalıklarda Ang II'nin meydana getirdiği vasküler değişiklikleri geriletebileceğini düşündürmektedir [112, 114, 115, 117-120].

ROS, inflamatuvar yanıtın oluşumunda çok önemli bir rol oynar. Bu reaksiyonların oluşmasına çoklu redoks-duyarlı sinyal yolları aracılık eder [49]. Ang II, birçok hücrel etkilerini, ROS oluşumunu artırarak göstermektedir [10, 11, 26, 46]. Endotel, adventisya ve düz kas hücrelerinde üretilen ROS'nin asıl oluşum kaynağı NADPH oksidaz enzimidir [121]. NADPH oksidaz ile üretilen $O_2^{\cdot -}$, bir intrasellüler sinyal molekülü gibi davranarak, transkripsiyon faktörlerini ve inflamasyonda rolü olan diğer moleküller olan MAPK, tirozin kinaz ve protein fosfatazları aktive eder [121]. Ang II, vasküler NADPH oksidaz'ın potent bir stimülatörüdür; enzimin aktivitesini ve ekspresyonunu artırır. Ang II, hücre büyümesinden sorumlu olan Nox1'i ve proton pompası olarak görev yapan gp91phox'u up regüle eder ve hücre büyümesini yavaşlatan Nox4'ü down regüle eder [11, 21, 26, 46-49].

Hipertansiyonda, oksidazların aktivasyon artışı ve dolayısıyla artan oksidatif stres bu olayların şiddetlenmesine yol açar. ' $O_2^{\cdot -}$ ' ve H_2O_2 birçok sinyal molekülünü aktive eder: Bu sinyal molekülleri, MAPK, reseptör olmayan tirozin kinazlar (Src, JAK2, STAT, p21Ras, Pyk2 ve Akt), reseptör tirozin kinazlar, protein tirozin fosfatazlar ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri (NF- κ B, AP-1 ve hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF)-1)'dir. Bu moleküllerin aktivasyonu, hipertansiyonda yeniden modellenmeye katkısı olan hücre büyümesi, proinflamatuvar genlerin ekspresyonu, ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimi ve kontraksiyonda rol alır [3, 49, 121-123].

MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Malzeme ve Kimyasal Maddeler

- Hücre medyumunu DMEM Biochrome'dan; HBSS Lonza'dan; Tris ICN Biomedicals'dan; SDS Amresco'dan; CaCl₂, HEPES, elastaz, kollejenaz, STİ, BSA, FBS, L-glutamin, PSA, tripsin-EDTA, leupeptin, pepstatin A, aprotinin, proteaz inhibitör kokteyl Sigma Aldrich'den temin edilmiştir.
- Hücre kültür petrilere, flaklar ve 15 mL'lik plastik tüpler ile benzeri sarf malzemeleri R&D Falcon ve Greiner'den satın alınmıştır.
- Ang II Sigma (A-9525) ve Calbiochem'den (05-23-0101); EGF Upstate'den (01-102); Losartan Merck firmasından hediye olarak; AG1478 Sigma'dan (T4182); GM6001 Calbiochem'den (364205) ve CRM197 Sigma'dan (D2189) satın alınmıştır.
- Western blot analizinde Bio-Rad marka Mini-Protean Western Blot seti kullanılmıştır.
- Western blot için fosfo-ERK1/2 için ve EGFR için kullanılan primer ve sekonder antikolar Cell Signaling'den satın alınmıştır (4407S, 9106S, 7074S ve 7076).
- Protein marker Biorad'dan(161-0318); fosfataz inhibitörü Roche'dan satın alınmıştır.
- Protein ölçümü için kullanılan kit Pierce'den (23235); görüntüleme için kullanılan ECL Thermo'dan; blotlamada kullanılan membran Whatman'dan; film Amersham'dan; developer ve fiksatif Ilford'dan satın alındı.

Araştırmanın Yürütüldüğü Birim ve Kullanılan Gereçler

Plastik ve cam malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilizasyon Ünitesi'nde sterilize edildi. Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyon işlemleri Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde yapıldı. Primer hücre kültürü işlemleri, protein ölçümleri, western blot analizleri Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Deneyde kullanılan 250-350 g ağırlığındaki erkek wistar ratlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden, Akdeniz Üniversitesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınarak (02.05.2011, karar no:92).temin edildi.

- Buzdolabı: Beko 9610NM, Vestel NT 465 HG (+4 ve -20 C°)
- Soğutucu: Bosch (-20 C°)
- Dondurucu: Hettich HS 2486 (-80 C°)
- Sıcak su banyosu: Raypa (20 ~80 C°)

- Santrifüj: Beckman&Coulter Microfuge 22R (+4C°)
- Santrifüj: Nüve NF400
- İnkübatör: Heraeus HeraCell 150 (Karbondioksit, 37C°)
- Kültür kabini: Esco Class II BSC
- Mikroskop: Olympus CKX41 (Inverted)
- Sonikatör: Bendelin UW2070
- Karıştırıcı: LabLine Thermal Rocker (Kapaklı, 37C°); Biometra WT17; Heidolph MR Hei-Standart Q-02 (Manyetik)
- Thermoblock: Biometra TB1
- Hassas terazi: Presica XB220A
- Kaba terazi: Kern 440-43N
- pH metre: Hanna pH211
- Spektrofotometre: Shimadzu UV-1601
- Plate reader: BioTek µQuant

Tezde Kullanılan Deney Modeli

Deneylerde torasik aortadan izole edilen vasküler düz kas hücreleri kullanılmış olup izolasyon işleminden sonra hücreler üzerindeki deneyler hücre kültüründe gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin elde edilmesi amacıyla 250-350 gram ağırlıktaki erkek ve Wistar cinsindeki ratlardan torasik aorta alınmıştır. Primer kültürü yapılan hücreler deneylerde kullanılmıştır.

3.2. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu

İzolasyon işlemi Ives ve ark. tarafından 1978’de tavşan aortasında uygulanan metodun değiştirilmiş haline dayanmaktadır. Modifiye yöntem Gunter ve ark. tarafından rat mezenterik arterinde başarıyla uygulanmıştır [124, 125]. Bütün işlem aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. İzolasyondan bir gün önce gerekli olan bütün çözeltiler taze olarak hazırlanmış, mikro cerrahi set ve hücre kültürü odası gibi her türlü ortamın sterilliği sağlanmıştır. Ratlar tartılıp ağırlıkları not edildikten sonra eter anestezisi altında torasik aortaları alınmıştır. Alınan torasik aortalar derhal buz soğukluğundaki transfer medyumu içerisine aktarıldı. Damar iç çeperi birkaç kez transfer medyumu ile yıkanarak kandan arındırıldı ve daha sonra parafin blok üzerine steril toplu iğneler yardımıyla sabitlendi. İşlem buz üzerinde ve buz soğukluğundaki transfer medyumu içerisinde disseksiyon mikroskobu altında gerçekleştirildi. Blok üzerindeki damar ince doku makası ve pens yardımıyla boylamsal olarak kesildi ve dikdörtgen bir plaka gibi dört ucundan parafin bloğa tutturuldu. Damarın dış kısmındaki yağ ve kılcal damar yapıları temizlendikten sonra adventisya tabakası bisturi ile kazındı. Daha sonra damar tabakası döndürülerek endotel tabakası üste

getirildi ve steril bir kulak çöpü ile hassas bir şekilde kazınarak endotel tabakası da uzaklaştırıldı. Daha sonra kalan yapı transfer medyumu ile birkaç kez yıkandıktan sonra buz içerisinde, buz soğukluğunda transfer medyumu içerisinde hücre kültürü odasına taşındı [3, 28].

3.3. Primer Vasküler Düz Kas Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Hücre kültürü ortamına taşınan ve damarın media tabakasını içeren aorta parçası öncelikle transfer medyumundan uzaklaştırıldı. Daha sonra küçük bir petri içine alınarak iki adet bistürü ile küçük parçalara ayrılarak dokunun yüzey alanı olabildiğince artırıldı. Sonrasında önceden hazırlanan ve 37 C°'deki enzim ayrışma çözeltisi (EAÇ) ile inkübe edildi. Böylelikle yüzey alanı artırılmış media tabakası EAÇ ile daha fazla temas ederek hücre izolasyon oranının artırılması amaçlandı. Petrinin etrafı parafilm ile sarılarak ısıtıcı özelliği bulunan bir çalkalayıcıda 37 C°'de 45 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda petrideki damar parçaları ve EAÇ çelik kanülden geçirilerek mekanik ayrışmaya maruz bırakıldı. Sonraki basamakta ortamdaki enzim konsantrasyonunu düşürmek için EAÇ miktarının iki katı kadar hücre medyumu eklendi ve steril plastik tüp içerisinde 1400 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant hücre medyumu ile dilüe edilerek 12,5 cm²'lik flaska ekildi. Pellet ise hücre medyumuyla resüspanse edildi ve aynı şekilde 12,5 cm²'lik flaslara ekildi. Hücrelerin inkübasyonu nemlendirilmiş, 37 C°'deki % 5 CO₂- % 95 hava içeren etüvde (inkübatörde) gerçekleştirildi. Ekimden sonraki ilk 24 saat flaslara dokunulmazken sonraki günlerde rutin olarak incelenen flaslarda kontaminasyon ve tutunan ya da mikroskop altında gözlemlenebilen hücre olup olmadığı invert mikroskop altında incelendi. Hücrelerin mikroskop altında gözlemlendiği ilk gün flask birkaç kez medyum ile yıkandı ve taze medyum eklenerek etüve bırakıldı. Flask yüzeyi tamamen hücre ile dolduğunda yani konflüe olduğunda pasajlama işlemi yapıldı ve hücreler 25 cm²'lik flaslara aktarıldı. Daha sonrasında ise 75 cm²'lik flaslara pasajlandı. İlk birkaç pasajdan sonra hücrelerin bir kısmı dondurularak - 80 C°'de ya da sıvı azot içerisinde muhafaza edilerek daha sonra kullanılmak üzere stoklar oluşturuldu. Böylelikle yeni hayvan kesimi önlenerek minimum şekilde hayvan kullanmaya gayret edildi.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajlama işlemi (tripsinizasyon) yapılırken öncelikli olarak hücre medyumu tamamen uzaklaştırıldı. Sonra 37 C°'deki Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen HBSS solüsyonu ile bir kez yıkandıktan sonra tripsin-EDTA ile muamele edildi. Bir müddet etüvde bekletildikten sonra yüzeye yapışan hücreleri kaldırmak için flaska sağdan soldan ve üstten hafifçe vurarak mekanik olarak da hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Ortamdaki tripsin konsantrasyonunu düşürmek amacıyla DMEM eklendi. Mikroskop altında kontrol edilerek ayrılmaları gözlemlendikten sonra plastik tüpe alınarak 1400 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dekante edildikten sonra pellet hücre medyumuyla resüspanse edildi ve yeni flaslara ya da petrilere aktararak pasajlandı [3, 28].

Kullanılan Çözeltiler

- a) Transfer medyumu: Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen HBSS solüsyonu içerisinde son hacimde 200 µM (0,2 mM) Ca²⁺ ve % 2 penisilin-streptomisin antibiyotiği

- (PSA) (v/v) olacak şekilde hazırlanmıştır. Ca^{2+} için $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tuzu kullanılmıştır. Öncelikle 400 mM Ca^{2+} çözeltisi hazırlanıp steril hale getirildikten sonra alikotlanmış ve diğer çözeltilerle birlikte transfer medyumunu hazırlanmasında bu stoktan yararlanılmıştır.
- b) Enzimayırışma çözeltisi (EAÇ): Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen HBSS solüsyonu içerisinde son hacimde şu bileşenler bulunmalıdır: 15 mM HEPES, 2 mg/ml BSA, 200 μM Ca^{2+} , 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soya tripsin inhibitörü (STİ), 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ elastaz ve 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kollejenaz tip I-A. Buradaki bileşikler stok olarak hazırlanmıştır ve çözücü olarak steril HBSS kullanılmıştır. Bütün çözeltiler sterildir veya filtreden geçirilmek suretiyle steril hale getirilmeye çalışılmıştır. İzolasyon işleminden bir gün önce hazırlandığı için ertesi güne kadar +4 C°'de muhafaza edilmiştir. İzolasyon işlemlerinde EAÇ taze olarak hazırlanmıştır.
 - c) Hücre medyumı: ticari olarak satın alınan DMEM medyum kullanıldı (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Medyuma ek olarak HEPES, FBS ve PSA eklendi. Final hacimde hücre medyumı % 10 FBS (v/v), % 1 PSA ve 25 mM HEPES içermektedir. HEPES öncelikle bir miktar DMEM ile çözülüp daha sonra steril hale getirilmiştir. L-glutamin içermeyen DMEM'e ek olarak 4 mM L-glutamin HEPES'le aynı işleme tabi tutularak medyuma ilave edilmiştir.
 - d) HBSS: Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen ve ticari olarak satılan HBSS solüsyonu kullanılmıştır. Deneylerimizin tamamında aynı HBSS kullanılmıştır yani Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren HBSS hiçbir aşamada kullanılmamıştır.
 - e) Tripsin-EDTA solüsyonu: Ticari olarak satılan % 0.05 (w/v) Tripsin ve % 0.02 (w/v) EDTA içermektedir.
 - f) PSA: Ticari olarak satılan, 100 mL'de 10,000 U penisilin ve 10 mg streptomisin içermektedir.

Hücrelerin Deneye Alınması ve Lizat Hazırlama İşlemi

Çalışmamızda kuşak sayısı 5-20 aralığındaki hücreler kullanıldı. Tripsinize edilen hücreler yapacağımız deneye uygun büyüklükteki petrilere ekildikten sonra rutin besleme, kontrol ve medyum değiştirme işlemleri yapıldı. % 80 dolulukta olan petrilere serum içermeyen medyumla bir kez yıkandıktan sonra yine serum içermeyen medyumla 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra mevcut medyum taze ve yine serum içermeyen medyumla değiştirildikten sonra ilk olarak inhibitör uygulanacak petrilere alınıp inhibitör(ler) uygulandı. Daha sonra bu petrilere aktivatör uygulandı. Kontrol grubu olanlara ise herhangi bir aktivatör ya da inhibitör uygulanmadı. Gerekli inkübasyonlardan sonra medyum hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı, buz soğukluğunda 1X PBS ile iki kez yıkanan hücrelere soğuk lizis tamponu eklendi. Hücreler tutundukları yüzeyden kazınarak ependorf tüplere toplandı. Buz içerisinde saklanarak proteinler soğuk zincir içerisinde tutulmaya çalışıldı ve sonrasında yine buz içerisinde olacak şekilde sonikasyona uğratıldı. Son olarak +4 C°'de santrifüj edilerek süpernatantlar dikkatli bir şekilde temiz yeni ependorf tüplere aktararak hücre debrisisi uzaklaştırılmış oldu. Protein ölçümü yapılarak lizatlardaki konsantrasyon belirlendi.

Kullanılan Çözeltiler, Uyarılar ve İnhibitörler

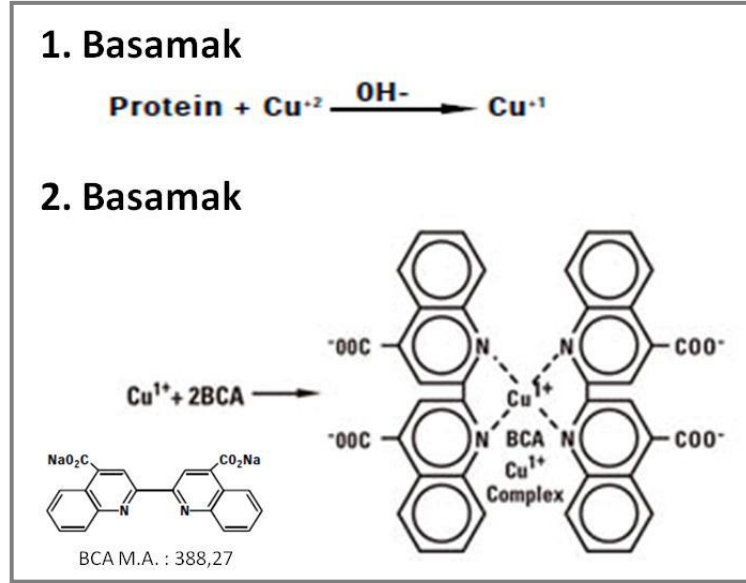
- a) PBS çözeltisi: stok olarak 10X hazırlanmış olup daha sonra 1:10 dilüe edilerek 1X kullanılmıştır. Distile suyla hazırlanan stok çözelti 1,35 M NaCl, 20 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄ ve 15 mM KH₂PO₄ içerir. Çözelti pH'sı 7,4'e ayarlanmıştır.
- b) Lizis tamponu: Distile su ile hazırlanan çözeltinin final hacimde 0,1 M NaF, 0,05 M HEPES, 0,15 M NaCl, 1mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM pirofosfat, 10 mg/L leupeptin ve aprotinin, 1 mg/L pepstatin A, % 1 gliserol (v/v) ve % 1,2 Triton-X 100 (v/v) içermektedir. Ayrıca bu hazırlanan stok çözelti kullanım öncesi ticari olarak satılan proteaz inhibitör kokteyli (1:100) ve fosfataz inhibitör kokteyli (1:10) ile desteklenmiştir.
- c) Ang II:Stok olarak distile suyla 10⁻⁴ M olarak hazırlanıp – 20 C°'de alikotlanmış olarak saklandı.
- d) EGF:Stok olarak 2 µg/ml konsantrasyonda distile su ile hazırlandı.
- e) Losartan: 10⁻³ M olarak stok çözelti hazırlanıp alikotlanıp – 20 C°'de saklandı.
- f) AG1478:Stok çözelti 1600 µg/ml konsantrasyonda hazırlanıp alikotlanarak – 20 C°'de saklandı.
- g) GM6001: 20 mM'lık stok çözelti hazırlanıp alikotlanıp – 20 C°'de muhafaza edildi.
- h) CRM197:1 mg/ml olacak şekilde çözeltisi hazırlandı ve alikotlanarak – 20 C°'de muhafaza edildi.

3.4. Protein Konsantrasyon Ölçümü

Elde edilen hücre lizatlarında protein konsantrasyonu ticari olarak satılan ve mikro bisinkoninik asit ya dakısaca mikro BCA diye bilinen kit yardımıylaölçüldü.

Mikro BCA deney kitinin prensibi

Ölçüm kiti bisinkoninik asit içeren bir formüle sahip olup bu kitle total protein konsantrasyonu kolorimetrik olarak saptanır. Yöntemin çalışma prensibi şekil 3.1.'deözetlenmiştir. Bu prensibe göre örnekteki proteinlerin peptid bağları hidroksil iyonlarının oluşturduğu alkali ortamda Cu²⁺ iyonlarını Cu⁺ iyonlarına indirger. Sonrasında bir molekül Cu⁺ iyonu 2 molekül BCA ile reaksiyona girerek mor renkli ve suda çözünen Cu⁺-BCA kompleksi oluşturur. Oluşan kompleks 562 nm'de güçlü bir absorbans vererek spektroskopik olarak konsantrasyon ölçümüne imkan tanır. Absorbans şiddeti örnekteki protein miktarıyla doğru orantılıdır. Proteinin makromoleküler yapısı, peptid bağlarının sayısı ve fonksiyonel grup olarak sistein, sistin, triptofan ve tirozin amino asitlerinin varlığı bu yöntemde renk oluşumundan sorumlu yapılardır.



Şekil 3.1. Mikro BCA yönteminin prensibi. Proteinler alkali ortamda Cu^{+2} iyonlarını Cu^{+1} iyonuna indirger. Daha sonra BCA Cu^{+1} ile reaksiyona girerek maksimum absorbands dalga boyu 562 nm olan mor renkli bileşik oluşturur [126].

Mikro BCA Yöntemiyle Numunelerin Protein Miktarının Ölçülmesi

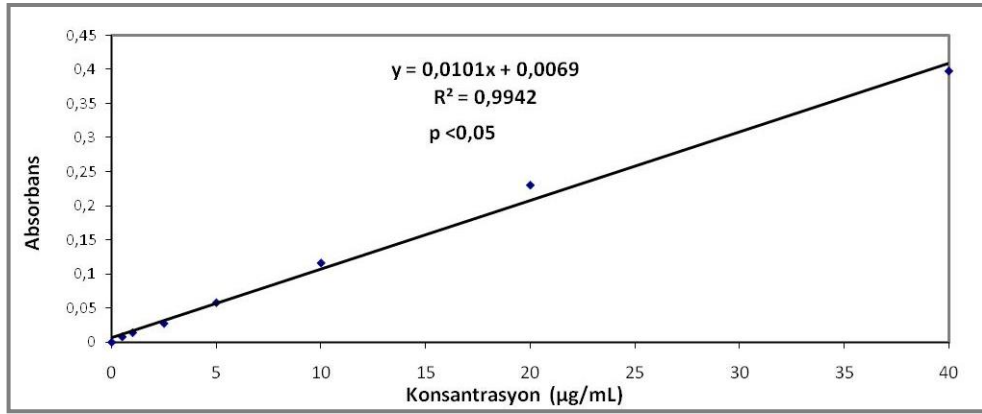
Kit prosedüründe belirtildiği üzere, kit içeriğinde bulunan BSA ile standartlar ve mikro BCA MA isimli reaktif, MB isimli reaktif ve MC isimli reaktif ile kit çalışma reaktifi hazırlandı.

Belirlenen hacimde çalışma reaktifi hazırlamak için 25 birim MA reaktifi ve 24 birim MB reaktifi ve 1 birim MC reaktifi karıştırıldı (25:24:1, reaktif MA:MB:MC, v/v). Her ölçümde gerektiği kadar çalışma reaktifi taze olarak hazırlandı.

Numuneler 1:20 oranında distile suyla dilüe edildikten sonra, kiti üreten firmanın önerdiği şekilde, mikro plate ölçüm prosedürüne uygun olarak numunelerdeki protein miktarı tayini için aşağıdaki basamaklar takip edilerek ölçüm yapıldı:

- Belirlenen mikro plate kuyucuklarına, 150 μL hacimde standartlar, numuneler ve kör (kör olarak çalışma reaktifi kullanıldı) pipetlendi. Standartların ve numunelerin her biri çift çalışıldı.
- Kuyucukların her birine 150 μL hacminde daha önce hazırlanan çalışma reaktifi pipetlendi ve 30 saniye nazikçe örnek ve standartlarla reaktifin karışması sağlandı.
- Mikro plate üzeri plastik şeritle kaplanarak 2 saat at 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda mikro plate oda sıcaklığına getirildi ve plate okuyucu özelliği olan spektrofotometride, örneklerin ve standartların 562 nm'de absorbandsları okundu.

- Numunedeki protein miktarını hesaplamak için kullanılacak standart eğrisini elde etmek için, okunan BSA standart absorbans değerlerinden, okunan kör absorbans değeri çıkarılarak köre-göre standart absorbans değerleri hesaplandı. Bundan sonra, şekil 3.2.'de gösterildiği biçimde standart konsantrasyonlarına (µg/ml) karşı absorbans değerlerinin grafiği elde edildi. Yine okunan numune absorbans değerlerinden okunan kör absorbans değeri çıkarılarak köre-göre numune absorbans değerleri hesaplandıktan sonra elde edilen standart eğrisi kullanılarak numunelerdeki protein değerleri (µg/ml) hesaplandı. Bulunan sonuç 1:20 dilüsyon kullanıldığı için 20 ile çarpılarak düzeltildi.



Şekil 3.2. BSA standart grafiği.

Örneklerin Hazırlanması

Örneklerin protein konsantrasyonları eşitlendikten sonra 5X laemli yükleme tamponu 1:5 oranında eklendi. Daha sonra örnekler önceden 95 C°'ye getirilmiş termal blok cihazında 5 dk süre ile ısıtıldı. Bir süre soğuması beklenen numuneler elektroforez işlemi için jele yüklendi. (5X Laemli tamponu % 20 gliserol (v/v), % 2 SDS (w/v), % 15 β-merkaptoetanol, 25 mM Tris ve brom fenol mavisi içerir.)

3.5. SDS-PAGE ve Western Blot Prosedürü

Öncelikle elektroforez işlemi için jeller hazırlandı. Jel hazırlama işlemi için temiz cam plakalar düzgün bir şekilde sıkıştırıldıktan sonra plakalar arasına ayrışma jel tamponu pipetlendi. Üst kısımda toplama jelinin döküleceği kısma kadar ayrışma jeli ile doldurulan cam plakaların geri kalan bölümü distile su ile doldurularak jelin hava ile teması kesildi. Ayrışma jeli donduktan sonra üst kısımdaki su boşaltılıp, süzgeç kağıdı ile bütün su emildikten sonra, taraklar yerleştirilip toplama jeli dökülerek donması beklendi. Yükleme jeli de tamamen donduktan sonra jeller elektroforez tankına alındı. Elektroforez tankı oda sıcaklığındaki 1X yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra taraklar jellerden nazik bir şekilde çıkarılarak jeller yükleme için hazır hale getirilmiş oldular. İlk kuyucuğa bilinen moleküler ağırlıktaki protein karışımını içeren marker yüklendikten sonra sırayla örneklerin yüklenmesine geçildi. Örneklerin yüklenmesi bittikten sonra tank güç kaynağına bağlanarak 80 V ve 65 mA'de deney gerçekleştirildi. Yükleme jelindeki boya, jelin alt tarafından çıkıncaya kadar yürütme işlemine devam edildi. Sonrasında moleküler

ağırlıklarına göre ayrılmış proteinleri içeren jeller, blotlama işlemi için kullanıldı. Deneylerde kullanılan ayırışma jeli akrilamid oranları % 10 ve % 7,5 dir. Toplama jeli,ayırışma jelinin yüzdesinden bağımsız olarak bütün jellerde aynı şekilde hazırlanmıştır. Jel bileşenlerinin içerikleri aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Ayırışma jeli için kullanılan bileşenler ve oranları.

Ayırışma jeli bileşenleri	% 10'luk jel için	% 7,5'luk jel için
Distile su	% 41,6	% 49,6
Ayırışma tamponu (pH 8,8)	% 25	% 25
% 30'luk akrilamid (w/v)	% 30	% 25
% 10 APS (w/v)	% 0,33	% 0,33
TEMED	% 0,07	% 0,07
% Toplam	% 100	% 100

Tablo 3.2.Toplama jeli için kullanılan bileşenler ve oranları.

Toplama jeli bileşenleri	Toplama jelindeki oranları
Distile su	% 61,2
Ayırışma tamponu (pH 8,8)	% 25,1
% 30'luk akrilamid (w/v)	% 13,1
% 10 APS (w/v)	% 0,5
TEMED	% 0,1
% Toplam	% 100

Elektroforez İşleminde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırışma tamponu: Distile suyla hazırlanan ve % 0,4 oranında (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 1,5 M Tris çözeltisidir. pH, HCl ile 8,8'e ayarlanmıştır. +4 C°'de muhafaza edildi.
- Toplama tamponu:Distile suyla hazırlanan ve % 0,4 SDS içeren (w/v) 0,5 M Tris çözeltisidir. pH, HCl ile 6,8'e ayarlanmıştır. +4 C°'de muhafaza edilmiştir.

- c) Akrilamid çözeltisi: % 30 akrilamid (w/v) ve % 0,8 bisakrilamidin (w/v) distile suyla hazırlanmış çözeltisidir. +4 C°'de muhafaza edilmiştir.
- d) APS (amonyum persülfat) çözeltisi: % 10'luk APS (w/v) çözeltisi olup distile suyla hazırlanmış ve +4 C°'de muhafaza edilmiştir.
- e) TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilediamin): serbest radikal oluşumunu sağlayarak jel polimerizasyonunu sağlayan bu çözelti hazır olarak alınmış ve kullanılmıştır.
- f) Yürütme tamponu: 5X stok olarak hazırlanıp yürütme işleminde 1X dilüe formu kullanılmıştır. % 1,5 Tris, % 7,2 glisin ve % 0,5 SDS içeren ve distile suyla hazırlanan çözeltidir (tamamı w/v). Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Western Blot Aşaması

Elektroforez işlemi sonrası toplama jeli kesilip uzaklaştırıldıktan sonra ayırışma jeli blotlama tamponuna transfer edildi. Blotlama işleminde kasedi oluşturmak için gerekli olan nitrocelüloz membran, blot kağıdı, süzgeç kağıdı ve süngerde % 10 metanol ile takviye edilmiş buz soğukluğundaki 1X blot tamponunda bekletilerek dengeye gelmeleri sağlandı. Daha sonra sandviç şeklindeki kaset sırasıyla sünger, blot kağıdı, süzgeç kağıdı, jel, membran ve tekrar süzgeç kağıdı, blot kağıdı ve süngerin üst üste getirilmesiyle oluşturuldu. Jel ve membran arasında hava kabarcığı kalmadığından emin olunduktan sonra kaset iyice sıkıştırıldı ve tanka yerleştirildi. Tank 1X blotlama tamponu ile dolduruldu ve transfer işlemi boyunca oluşacak ısıdan dolayı tampon çözeltinin soğuk kalmasını sağlamak için tank içerisine buz kondu. Güç kaynağına bağlanan tank transfer edilecek proteine bağlı olarak süre ve voltaj/amper değerleri ayarlanarak transfer gerçekleştirildi. Transfer sonrasında 1X TBST ile yıkanan membranda Ponceau S ile transfer başarısı kontrol edildi. Daha sonra ardışık 1X TBST yıkamaları ile tamamen uzaklaştırılan membran bloklama çözeltisi ile 1,5 saat boyunca blokladı. Bloklama işleminden sonra 1X TBST ile birkaç kez yıkanan membran gece boyu +4 C°'de primer antikorla inkübe edildi. Ertesi gün membran yıkanarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında sekonder antikorla muamele edildi. Sekonder antikor olarak HRP konjuge antikorlar kullanıldı. 2 saatlik süre sonunda tekrar yıkanan membranda görüntüleme işlemine geçildi.

Görüntüleme için ECL kiti kullanıldı. ECL kitindeki bileşenler, kitte belirtildiği şekilde 1:1 oranında karıştırıldı ve daha sonra membran üzerine tatbik edildi. ECL ile muamele edilen membran görüntülemek için kaset içerisine yerleştirildi ve karanlık odada membran üzerine film yerleştirilerek oluşan kemilüminesans sinyalin filmi yakması için beklendi. Sonraki aşamada film, sırasıyla 1:8 ve 1:5 oranında seyreltilmiş olan developer ve fiksatif solüsyonlarıyla geliştirilip, film kuruduktan sonra da taranarak görüntülerin bilgisayara aktarılması tamamlandı. Son olarak elde edilen veriler değerlendirildi.

Kullanılan Çözeltiler

- a) 10X stok blot tamponu: Distile suyla hazırlanan tampon % 1,21 Tris, % 3 glisin ve % 0,1 EDTA (hepsi w/v) içermektedir. Blotlama esnasında 1X seyrelmiş hali kullanılmış olup dilüe 1X blot tamponu final hacimde % 10 metanol (v/v) içermektedir.

- b) 10X stok TBS (Tris Buffer Saline) çözeltisi: Distile suyla hazırlana çözelti son hacimde % 6,5 Tris, % 8,76 NaCl (hepsi w/v) içerir. Çözelti pH'sı HCl/NaOH yardımıyla 7,4 olarak ayarlanmıştır.
- c) 1X TBST çözeltisi: 10X TBS çözeltisinden distile suyla 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanmış ve bu esnada 1:1000 Triton X-100 (v/v) ilave edilmiştir.
- d) Bloklama çözeltisi: 1X TBST çözeltisi ile hazırlanmış olup % 5 oranında (w/v) yağsız süt tozu ya da BSA içermektedir.
- e) Primer antikor solüsyonu: Bloklama çözeltisi ile hazırlanmış olup 1:1000 ya da 1:2000 oranında (v/v) primer antikor içerir. ERK1/2 için bu oran 1:2000 iken EGFR için 1:1000'dir.
- f) Sekonder antikor solüsyonu: Bloklama çözeltisiyle ya da 1X TBST ile hazırlanan çözelti 1:1000 ile 1:3000 (v/v) arasında değişen oranda anti-tavşanya da anti-fare HRP konjuge sekonder antikor içerir.

Sinyallerin Grafik Haline Getirilmesi ve İstatistiksel Yöntem

Filme aktarılan sinyaller bilgisayarda ImageJ programı (versiyon 1.46r) ile analiz edildi. Daha sonra Excel'de grafik haline getirilerek sonuçlar değerlendirildi. En az 3 deney tekrarı yapılmış olup veriler istatistiksel olarak incelendikten sonra ifade edildi.

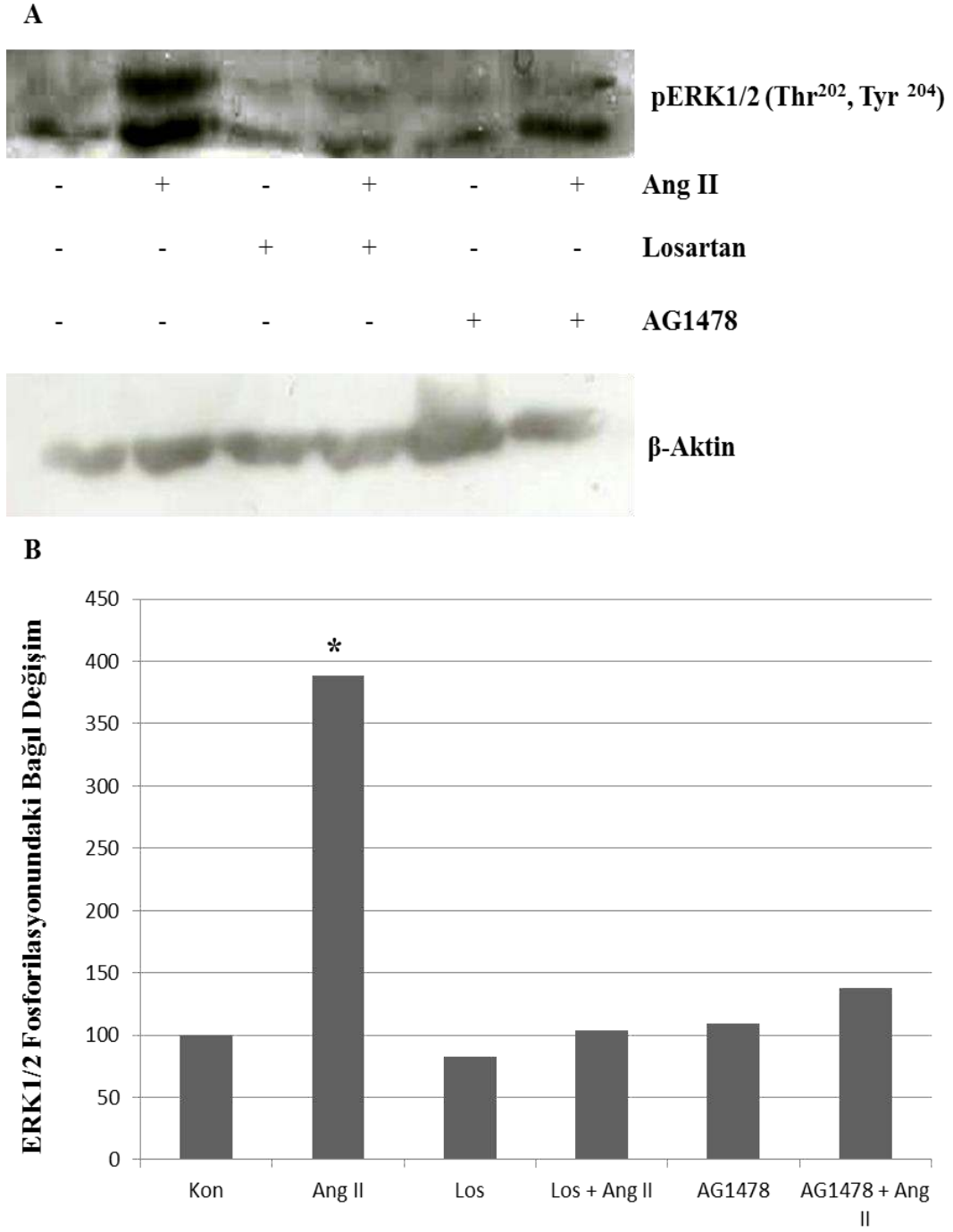
BULGULAR

4.1. Ang II'nin AT1R ve EGFR Üzerinden ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

Çalışmamızın ilk basamağında, primer VDKH'lerinde Ang II uyarımının ERK1/2 fosforilasyonuna AT1R üzerinden yol açtığını göstermeyi amaçladık. Bunun için hücreler ilk önce Ang II ile uyarılıp ERK1/2 fosforilasyonuna bakıldı. Literatür bilgisi [61, 62] ve laboratuvarımızda daha önceki çalışmalara[28] dayanılarak Ang II 100 nM ve 5 dk olarak uygulandı. Ang II uyarımıyla ERK1/2 fosforilasyonunun yaklaşık 4 kat arttığı gözlemlendi (şekil 4.1-A ve B). Bu etkinin AT1R aracılığı olduğunu göstermek için hücreler losartan ile muamele edildi (10 µM, 30 dk). Kontrol grubuna ise herhangi bir uygulama yapılmadı. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Losartanın tek başına ERK1/2 fosforilasyonuna etkisinin olmadığı gösterildi. Ancak Ang II ve losartan uygulanan hücre grubunda da fosforilasyon artışının gerçekleşmemesi Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunun AT1R üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir (şekil 4.1. -A ve B).

Ang II'nin ERK1/2 fosforilasyonuna AT1R üzerinden yol açtığı gösterildikten sonra, gerçekleşen aktivasyonda EGFR transaktivasyonunun rolü olup olmadığı incelendi. Bu amaçla hücrelere, bir EGFR kinaz inhibitörü olan AG1478 (1 µM, 30 dakika) ve Ang II (100 nM, 5 dk) uygulandı. AG1478 ve Ang II'nin birlikte uygulandığı hücre grubu öncelikle AG1478 ile inkübe edildi ve süre sonunda da Ang II uyarımı verildi. Kontrol grubuna ise herhangi bir kimyasal ajan uygulanmadı. AG1478'in tek başına ERK1/2 fosforilasyonuna neden olmadığı kontrol grubuna karşı incelenerek belirlendi.

Deney sonucunda elde edilen sonuçlara göre EGFR inhibitörü AG1478'in de losartan kadar olmasa da Ang II'nin ERK1/2 fosforilasyonunu kısmen inhibe ettiği gözlemlendi (şekil 4.1-B). Bu gözlem, Ang II'nin ERK1/2 aktivasyonuna EGFR transaktivasyonu üzerinden neden olduğunu ve fakat Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunun tamamen EGFR transaktivasyonu bağımlı olmadığını düşündürmektedir.

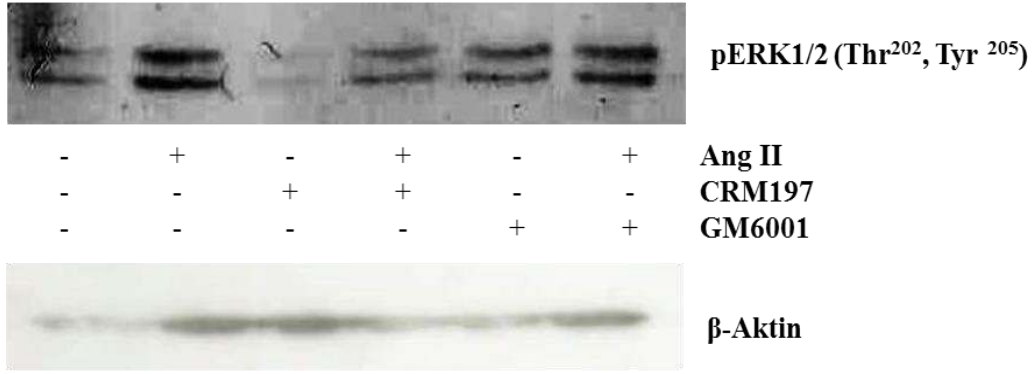
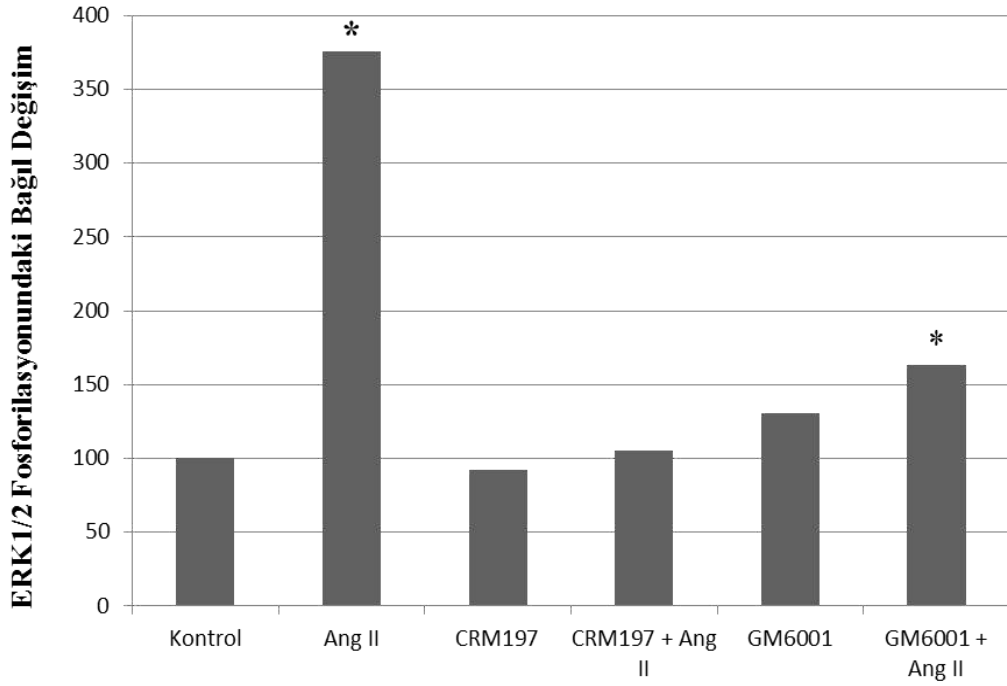


Şekil 4.1. Ang II'nin ERK1/2 fosforilasyonu üzerindeki etkisinde AT1R ve EGFR'nin Rolü. A-VDKH'leri 100 nM Ang II ile 5 dk uyarıldı ve ERK1/2 fosforilasyonu incelendi. Hücreler 30 dk boyunca 10 μ M losartan ile inkübe edildikten sonra Ang II uyarımı verilmiş ve ERK1/2 fosforilasyonunda herhangi bir artış gözlenmemiştir. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine EGFR transaktivasyonunu incelemek amacıyla AG1478 kullanılarak ERK1/2 fosforilasyonu incelenmiştir. AG1478 1 μ M ve 30 dk uygulanmış, sonrasında 100 nM Ang II ile 5 dk uyarılmıştır. AG1478 uygulaması Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu kısmen inhibe etmiştir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrarın birini temsil etmektedir. B-Western blot bantları taranarak, bant yoğunlukları esas alınmış ve veriler sütun grafik şekline dönüştürülmüştür. Kontrol grubunun yol açtığı fosforilasyon 100 birim olarak ayarlanmış ve diğer fosforilasyonlar da bu değere göre verilmiştir. (Sonuçlar ortalama değerlerdir; *: kontrole karşı anlamlı; $p < 0,05$ ve $n=4$).

4.2. Ang II Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda AT1R Üzerinden EGFR Transaktivasyonunda HB-EGF'in Rolü

Ang II uyarımıyla gerçekleşen ERK1/2 aktivasyonunda EGFR transaktivasyonunun rol aldığı gösterildikten sonra, bu aktivasyonun nasıl gerçekleştiği araştırıldı. Bu amaçla yapılan deneyde, gerçekleşen aktivasyonun HB-EGF üzerinden olup olmadığı incelendi. Hücrelere seçici olarak HB-EGF ligandını inhibe eden CRM197, Ang II ile birlikte uygulandı. CRM197, 30 dk boyunca 10 µg/ml konsantrasyonda uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir inhibisyon ya da uyarım yapılmadı. CRM197'nin ERK1/2 fosforilasyonuna yol açmadığı kontrol grubuyla kıyaslanarak belirlendi. Ang II ile birlikte CRM197 uygulanmasının ise sadece CRM197 uygulanan gruptan daha yüksek seviyede ERK1/2 fosforilasyonuna neden olduğu, fakat yalnızca Ang II uygulanan gruptan ise daha düşük seviyede bir fosforilasyon yaptığı gözlemlendi (şekil 4.2. A ve B). Deneylerden elde edilen sonuçlar, Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda, HB-EGF molekülünün EGFR transaktivasyonuna neden olarak EGFR transaktivasyonu üzerinden ERK1/2 yolağını aktive edebileceğini düşündürmektedir.

Ang II uyarımıyla EGFR transaktivasyonu aracılı ERK1/2 aktivasyonunda HB-EGF'nin rolü olduğunu belirledikten sonra, gerçekleşen aktivasyonda MMP'lerin rolü olup olmadığı da incelendi. Bu amaca uygun olarak hücreler, geniş spektrumlu bir MMP inhibitörü olan GM6001 ile tek başına ya da Ang II ile birlikte GM6001 uygulandıktan sonra lizise uğratarak western blot yapıldı. GM6001 konsantrasyonu 20 µM ve 30 dk; Ang II ise 5 dk 100 nM uygulandı. Western blot sonuçlarını incelediğimizde şekil 4.2. -A'da görüldüğü üzere sadece GM6001 uygulanan hücre grubunda ERK1/2 fosforilasyonunun kontrol seviyesinden anlamlı seviyede farklı olmadığı görüldü. GM6001 ve Ang II kombine uygulanmasının ise sadece GM6001 uygulanan gruba göre daha yüksek seviyede gözükmemektedir fakat bu fark anlamlı değildir. GM6001 inkübasyonu sonrasında Ang II uygulanması, sadece Ang II uygulanan gruba göre ise daha düşük düzeyde, fakat kontrole karşı anlamlı derecede daha yüksek ERK1/2 aktivasyonuna yol açtığı gözlemlendi (şekil 4.2. -A ve B). Buradan yola çıkarak Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda MMP'lerin rolü olabileceğini düşünülmektedir.

A**B**

Şekil 4.2. Ang II Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda AT1R Üzerinden EGFR Transaktivasyonunda HB-EGF'in Rolü. A-Hücreler 30 dk boyunca 10 µg/ml CRM197 ile inkübe edildikten sonra Ang II uyarımı verilmiş (100 nM, 5 dk) ve ERK1/2 fosforilasyonu incelenmiştir. Sadece CRM197 uygulanan grupta kontrol seviyesine göre ERK1/2 fosforilasyonu azalmıştır. CRM197 ile inkübasyon sonrasında Ang II uygulanan hücrelerde ise ERK1/2 fosforilasyonu kontrol seviyelerine geri dönmüştür. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine MMP etkisini incelemek için GM6001 uygulanmıştır (20 µM, 30 dk). Sadece GM6001 uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark yok iken Ang II ile uyarım sonrası ERK1/2 fosforilasyonu artmıştır. Şekildeki sonuç en az 3 tekrarın birini temsil etmektedir. B-Western blot bantları taranarak, bant yoğunlukları esas alınmış ve veriler sütun grafik şekline dönüştürülmüştür. Kontrol grubunun yol açtığı fosforilasyon 100 birim olarak ayarlanmış ve diğer fosforilasyonlar da bu değere göre verilmiştir. (Sonuçlar ortalama değerlerdir; *: kontrole karşı anlamlı; $p < 0,05$ ve $n=3$).

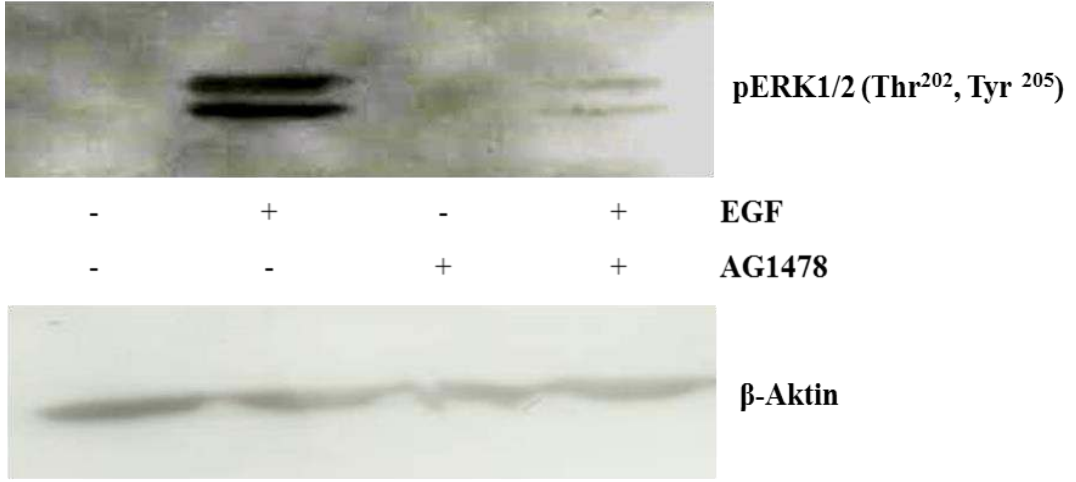
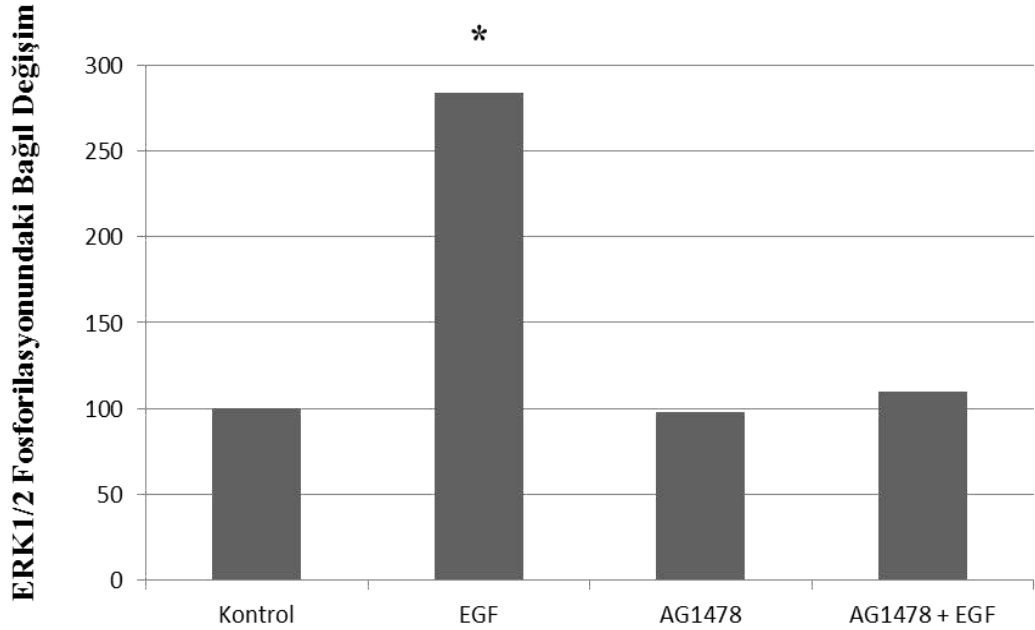
4.3. EGF Ligandının VDKH'lerinde EGFR Alt Yolağına Etkisiyle ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkisi

EGF ligandının VDKH'lerinde ERK1/2 fosforilasyonu üzerine olan etkisini incelemek amacıyla uyaran olarak EGF kullanıldı. EGF konsantrasyonu 20 ng/ml, süre ise 5 dk olarak seçildi [52, 62]. İnhibitör olan EGFR kinaz inhibitörü AG1478 ise 1 μ M ve 30 dk süre ile uygulandı. Kontrol grubu hücrelere herhangi bir uygulama yapılmazken diğer gruba sadece EGF uygulandı. İnhibisyon çalışmasında ise hücrelerin bir kısmı sadece AG1478 ile muamele edilirken (1 μ M, 30 dk), bir kısmı ise AG1478 inkübasyonu sonrasında (1 μ M, 30 dk) Ang II ile (100 nM, 5 dk) uyarıldı.

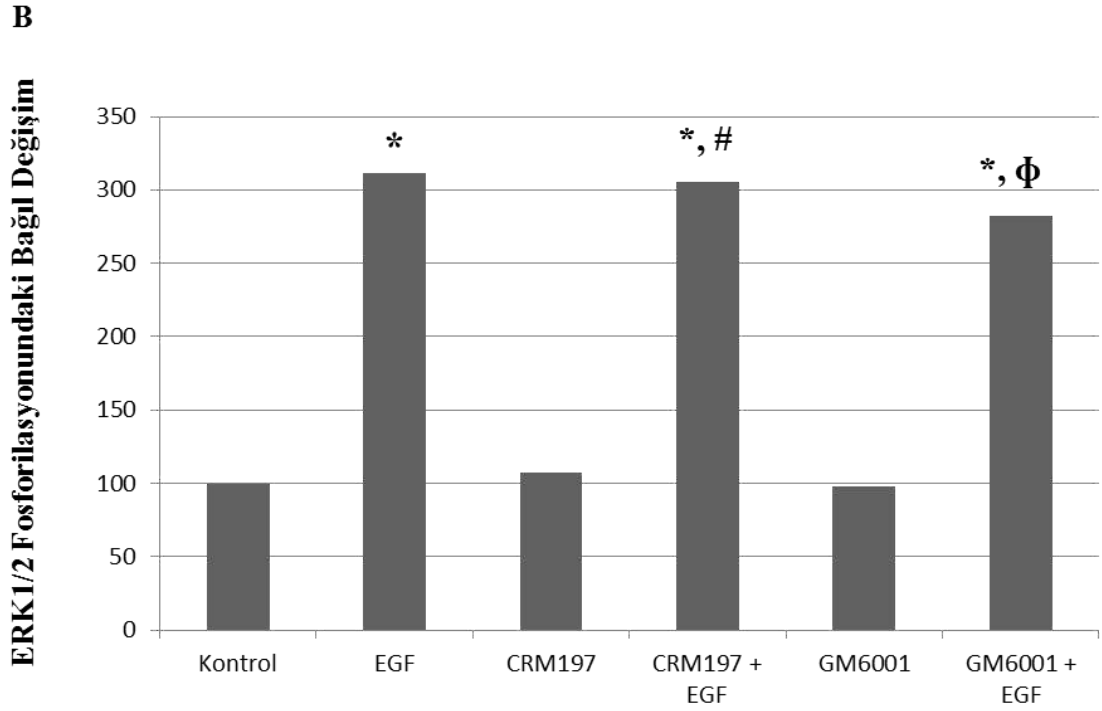
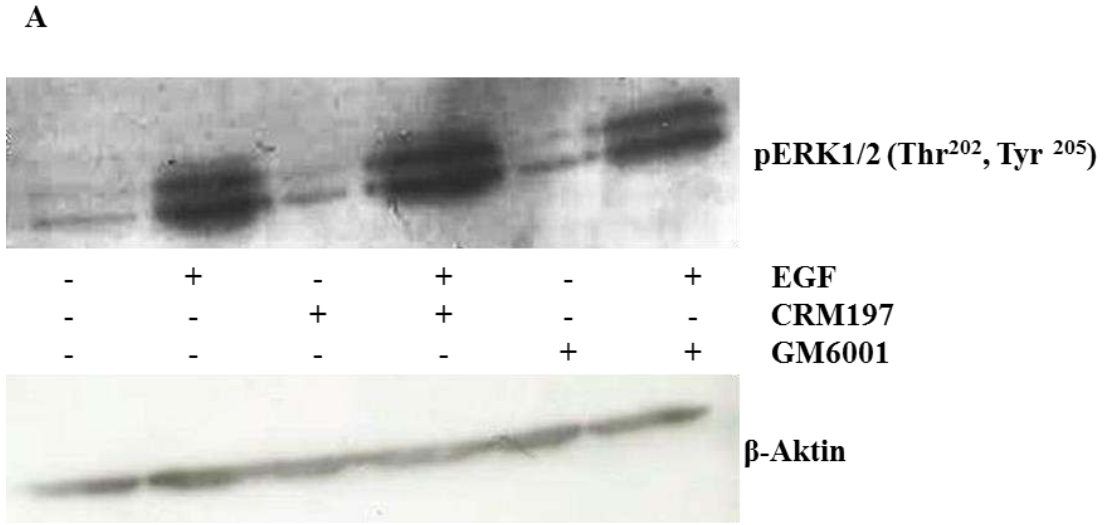
Deney sonucunda EGF ligandının VDKH'lerinde güçlü bir şekilde ERK1/2 fosforilasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. EGF ligandının neden olduğu ERK1/2 fosforilasyonu bir EGFR kinaz inhibitörü olan AG1478'in varlığında inhibe olmaktadır (şekil 4.3. -A ve B). Bu gözlem bize EGF ligand uyarımıyla gerçekleşen ERK1/2 fosforilasyonunun, EGFR aktivasyonunun bir alt yolağı olduğunu göstermektedir.

4.4. EGF Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda HB-EGF ve MMP Rolünün İncelenmesi

EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu ve bunun bir EGFR alt yolağında bulunduğu belirlendikten sonra, Ang II'ye benzer bir şekilde EGF ligandının herhangi bir HB-EGF salınımı aracılığıyla ERK1/2 aktivasyonuna neden olup olmadığını incelemek istedik. Ayrıca burada herhangi bir MMP aktivasyonunun gerçekleşen aktivasyonlara aracılık edip etmediği incelendi. Hücrelere EGF ligandı (20 ng/ml, 5 dk) ve/veya CRM197 (10 μ g/ml, 30 dk) ile GM6001 (20 μ M, 30 dk) uygulanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir ajan uygulanmamıştır.

A**B**

Şekil 4.3. EGF Ligandının VDKH'lerinde EGFR Alt Yolağına Etkisiyle ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkisi. A-VDKH'leri 20 ng/ml EGF ile 5 dk uyarıldı. EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunun EGFR alt yolağına ait bir olay olduğunu göstermek amacıyla yani EGFR kinaz aktivitesinin ERK1/2 aktivasyonuna yol açtığını göstermek amacıyla AG1478 30 dk ve 1 μ M olarak uygulandı. Bu inhibisyon sonrasında uygulanan EGF, herhangi bir ERK1/2 aktivasyonuna neden olmayarak EGF uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunun EGFR'a bağlanarak ve kinaz aktivitesi sonucu gerçekleştiğini gösterdi. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. B-Western blot sonuçlarına ait bantlar taranarak bant yoğunluklarına göre veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Kontrol grubunun yol açtığı fosforilasyon 100 birim olarak ayarlandı ve diğer fosforilasyonlar da bu değere göre verildi. (Sonuçlar ortalama değerlerdir; *: kontrole karşı anlamlı; $p < 0,05$ ve $n=3$).



Şekil 4.4. EGF Uyarımlı ERK1/2 Aktivasyonunda HB-EGF ve MMP Rolünün İncelenmesi. A-VDKH'lerinin 5 dk boyunca 20 ng/ml EGF ligandı ile uyarılması sonucu ERK1/2 fosforilasyonu artmıştır. Bu fosforilasyondaki HB-EGF ve MMP rolünü incelemek amacıyla hücreler HB-EGF inhibitörü 10 µg/ml CRM197 ya da 20 µM MMP inhibitörü GM6001 ile 30 dk inkübe edildi. İnhibisyon sonrası EGF ile uyarım gerçekleştirildi. Deney sonucunda EGF uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda HB-EGF'nin ya da MMP'lerin rolü olmadığı görüldü. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. B-Western blot sonuçlarına ait bantlar taranarak bant yoğunluklarına göre veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Kontrol grubunun yol açtığı fosforilasyon 100 birim olarak ayarlandı ve diğer fosforilasyonlar da bu değere göre verildi. (Sonuçlar ortalama değerlerdir; *: kontrole karşı anlamlı; *, #: CRM197'ye karşı anlamlı; *, Φ: GM6001'e karşı anlamlı; p<0,05 ve n=3).

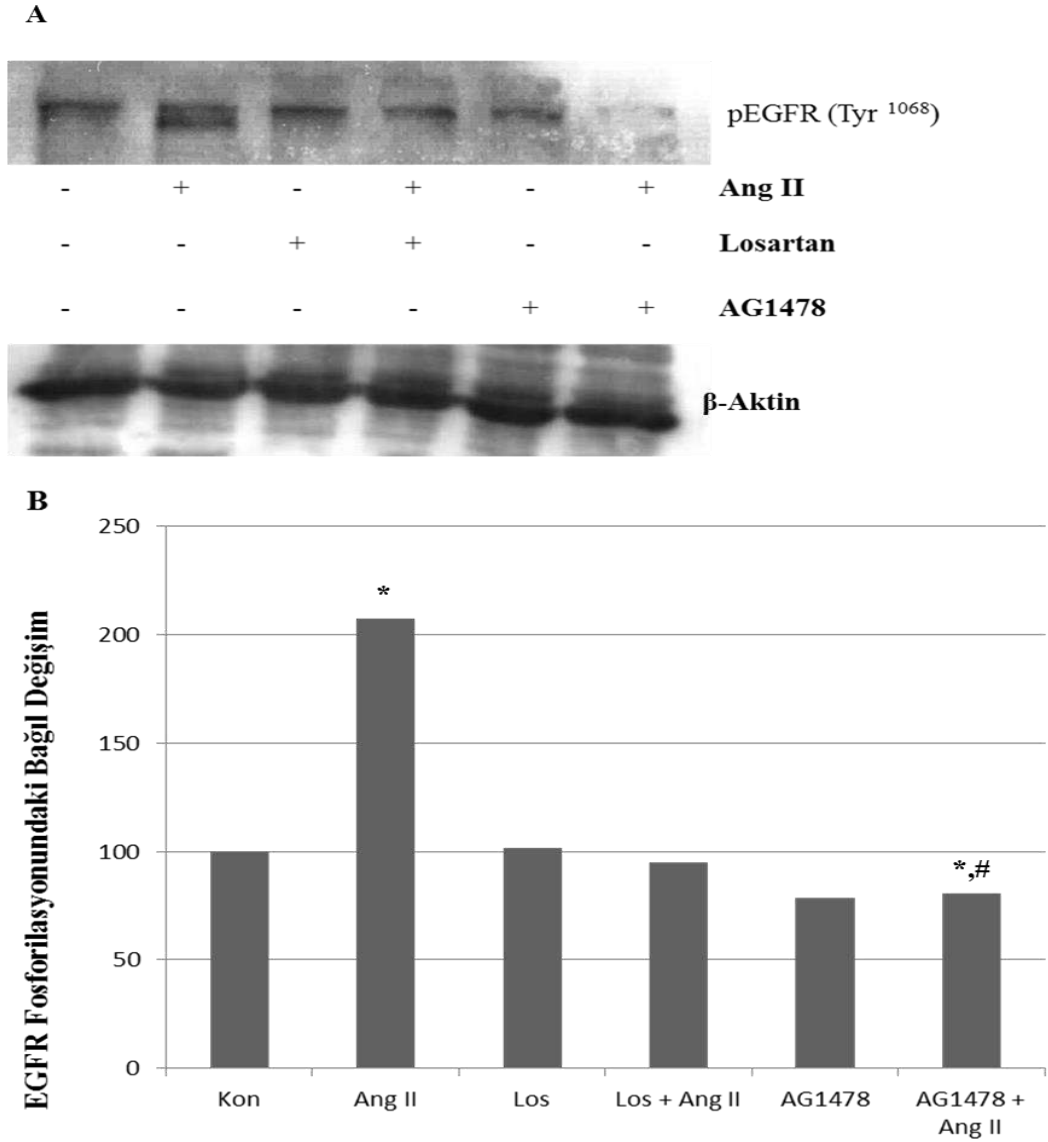
Deney sonunda elde edilen western blot bantları analiz edildiğinde, şekil 4.4.- A'da görüleceği gibi EGF uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda HB-EGF'nin

herhangi bir rolü bulunmamaktadır. CRM197'nin spesifik olarak HB-EGF'i bağlayarak inhibe ettiği; EGF ligand inhibisyonuna neden olmadığı bilinmektedir. Bizim çalışmamız sonucunda da CRM197'nin EGF ligandını inhibe etmediği ve dolayısıyla EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda bir fonksiyonu olmadığı gösterildi (şekil 4.4. -A ve B). Bir diğer sonuç ise EGF uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda, GM6001 inhibitörü kullanıldığında MMP aktivasyonunun gerçekleşmemesidir.

4.5. Ang II Uyarımlı EGFR Fosforilasyonunda AT1R Rolünün İncelenmesi

Ang II'nin ERK1/2 fosforilasyonuna olan etkileri ve bu etkinin EGFR transaktivasyonu aracılığıyla olduğu ERK1/2 fosforilasyonları incelenerek belirlendi. ERK1/2 sonuçlarına göre Ang II'nin EGFR transaktivasyonuna yol açıp açmadığını EGF reseptörüne ait fosforilasyon seviyelerini belirleyerek gözlemlemek istedik. Bu amaçla hücreler Ang II (100 nM, 5dk) ile uyarılarak EGFR'nin fosforilasyonu incelendi. İncelenen fosforilasyonda AT1R'nün fonksiyonel olup olmadığını belirlemek için hücreler AT1R antagonisti olan losartan (10 µM, 30 dk) ile muamele edildi. İnkübasyon sonrasında bir gruba uyarıcı uygulanmazken diğer gruba uyarıcı Ang II uygulanarak Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonu ve olası AT1R rolü incelendi. Kontrol grubu hücrelere herhangi bir muamele yapılmadı. Deney sonucu Ang II'nin EGFR fosforilasyonunu yaklaşık 2 kat artırdığı gözlemlendi (şekil 4.5). Losartanın kendisi EGFR fosforilasyonuna neden olmazken, losartan inkübasyonu sonrası Ang II uyarımı da EGFR fosforilasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişiklik göstermemiştir (şekil 4.5. B). Bu gözlem VDKH'lerinde Ang II uyarımlı EGFR transaktivasyonunda AT1R'nin bir rolü olmadığını önermekte olup, aktivasyon olayının AT1R üzerinden gerçekleşmediğine işaret etmektedir.

Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunun EGFR inhibitörü olan AG1478 ile inhibe olduğu bölüm 4.1.'de bahsedilmişti ve gerçekleşen olayın EGFR alt yolağına ait olduğu belirtilmişti. Olayın EGFR alt yolağına ait olduğunu doğrulamak amacıyla Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunda, bu reseptöre ait inhibitör olan AG1478 kullanılarak deneyler yapıldı. Hücrelerden bir gruba AG1478 uygulanırken (1 µM, 30 dk), diğer gruba AG1478 uygulanmasının ardından Ang II uygulandı (100 nM, 5 dk). Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunun, Ang II'nin EGFR kinaz aktivitesini uyararak gerçekleştirdiği yapılan deney sonucunda gözlemlendi. AG1478 uygulanan grupta EGFR fosforilasyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede fark göstermedi. AG1478 sonrası Ang II verilen grupta ise EGFR fosforilasyonu, kontrol seviyesinin yaklaşık 4 katı kadar azalmıştır (şekil 4.5. A ve B). Bu gözlem bize Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunun EGFR kinaz aktivitesine yol açtığını ve reseptör alt yolağını uyararak ERK1/2 aktivasyonuna neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. Ang II Uyarımlı EGFR Aktivasyonunda AT1R Rolünün İncelenmesi. A- Ang II (100 nM, 5 dk) ile uyarılan VDKH'nde EGFR-Tyr1068 fosforilasyonu incelendi. Bu fosforilasyondaki AT1R rolünü incelemek amacıyla hücreler AT1R inhibitörü losartan (10 μ M) ile 30 dk inkübe edildi. İnhibisyon sonrası Ang II ile uyarım gerçekleştirildi. Deney sonucunda Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunda AT1R'nün rolü olmadığı görüldü. Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunda Ang II'nin EGFR kinaz aktivitesini uyarıp uyarmadığını incelemek amacıyla hücreler AG1478 ile muamele edildi (1 μ M, 30 dk). Süre sonunda Ang II ile uyarım gerçekleştirildi (100 nM, 5 dk). Ang II uyarımı EGF reseptöründe intrinsik kinaz aktivitesini uyarmaktadır. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. B-Western blot sonuçlarına ait bantlar taranarak bant yoğunluklarına göre veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Kontrol grubunun yol açtığı fosforilasyon 100 birim olarak ayarlandı ve diğer fosforilasyonlar da bu değere göre verildi. (Sonuçlar ortalama değerlerdir; *: kontrole karşı anlamlı; *,#: Ang II'ye karşı anlamlı; $p < 0,05$ ve $n=3$).

TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) günümüzde önemli sağlık sorunlarından biridir. Kardiyovasküler hastalıklara bağlı olarak meydana gelen ölüm oranları da buna bağlı olarak önemli bir yer tutmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2011 yılında yayınlamış olduğu 2008 yılına ait ölüm sebepleri verilerine göre dünya genelindeki ölümlerin % 30,5'i kardiyovasküler hastalıklara bağlı iken hipertansif kalp hastalığına bağlı ölümler total KVH'lara bağlı ölümler içinde % 6,6'lık bir orana sahiptir. Kadınlar ve erkeklerin KVH nedenli ölüm oranları ise eşittir. Bu istatistiklerde Türkiye, Avrupa bölgesi içinde anılmakta olup, Avrupa bölgesi için KVH nedenli ölüm oranı ise % 49,7 olup erkeklerin % 45'i; kadınların ise % 55'i KVH nedeniyle ölmüştür [127].

Türk Kardiyoloji Derneği tarafından yayınlanan "Ulusal Kalp Sağlığı Politikası" adlı yayında, ülkemizde tahmini olarak her yıl 200.000 kişi KVH'lar nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Adı geçen çalışmada, ülkemizdeki yüksek genç nüfus oranına rağmen görülen bu ölümlerin, ileriki yıllarda artacak olan yaşlı nüfus da düşünüldüğünde KVH'ların dünya da olduğu kadar ülkemizde de oldukça önem kazanacağı vurgulanmıştır [128]. Kardiyovasküler hastalıkların temelinde yatan olayların, mekanizmaların anlaşılması ve bu alandaki araştırmalar da yukarıdaki sebeplerden ötürü oldukça önemlidir.

Ang II, uzun yıllardır kardiyovasküler hastalıklarda oldukça önemli ve pek çok etkiye aracılık ettiği bilinen bir vazokonstriktördür. Kardiyovasküler sistemdeki rolü ve hastalıklarla ilişkisi çok sayıda araştırma ile incelenmiş ve halen de incelenmektedir. Ang II özelliklerinden birisi de ERK1/2 aktivasyonuna yol açarak bu sinyal yolağı üzerinden hücreyi proliferasyon, migrasyon ve hipertrofiye götüren yolları aktive etmesidir. EGF molekülü de VDKH'nde ERK1/2 yolağını aktive eden ajanlardan biridir. Ang II, kendine ait olan reseptörü AT1R aracılığıyla VDKH üzerine etkilerini gösterirken; EGF molekülü ise kendi reseptörü olan EGFR üzerinden etkilerini gösterir. Bu klasik senaryo dışında Ang II, kendi reseptörü olmayan EGF reseptörüne bağlanmadan, reseptör ve dolayısıyla da alt yolların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu olayda, Ang II'nin kendi reseptörü haricindeki bir reseptörü aktive etmesi nedeniyle, aktivasyon terimi yerine "transaktivasyon" terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda Ang II'nin EGFR transaktivasyonu üzerindeki etkisini ve hangi yollar üzerinden bu etkiyi gösterdiği, olası ara basamaklar ve bu basamaklardaki moleküllerin rolü aydınlatılmaya çalışıldı.

Ang II'nin kendisine ait olan reseptörlerden AT1R aracılı etkileri uzun yıllardır bilinmekte olup, AT1R blokörleri klinik olarak da kullanılmaktadır. Fakat Ang II ve reseptörünün diğer sinyal yollarıyla olan etkileşimi çok uzun bir geçmişe sahip değildir. GPCR uyarımlı mitojenik sinyal iletiminde EGFR transaktivasyonu oldukça

önemli bir yer tutmaktadır. G-protein bağımlı reseptörlerle EGFR transaktivasyonu arasındaki ilişkiden bahseden ilk çalışmalardan birisi Ullrich ve grubunun 1996'da Nature'da yayınladıkları çalışmadır. Bu çalışmada endotelin-1 ve lizofosfatidik asit gibi GPCR uyarıcıları ile muamele edilen hücrelerde EGFR tirozin birimlerinde fosforillenme gözlemlenmiş; EGFR inhibitörü AG1478 uygulanmasının veya mutant EGFR ile EGFR bloklanması ile MAPK aktivasyonunu baskılamıştır. Bu sonuçlar ışığında araştırmacılar transaktivasyon olayının intraselüler mekanizmalarla gerçekleşebileceğinden bahsetmiş ve bu aktivasyonda reseptör tirozin kinazların rol oynayabileceği vurgulanmıştır [94]. Luttrell ve ark. adaptör protein Src-bağımlı EGFR aktivasyonunda Gβγ altbirimlerinin rol oynadığını göstermişlerdir [129]. GPCR ve RTK'lar arasındaki ilişkiyi inceleyen ve bu alandaki ilk çalışmaları yayınlayan bir diğer grup da Eguchi ve arkadaşlarının grubudur. Eguchi ve ark. 1996 yılında yayınladıkları çalışmada, VDKH'nde AT1R üzerinden MAPK aktivasyonuna neden olan Ang II'nin, p21Ras aktivasyonu ve tanımlanmamış bir tirozin kinaz aracılığıyla bu etkiyi gösterdiğini söylemişlerdir. Yaptıkları çalışmada spesifik olmayan protein tirozin kinaz inhibitörü genistein ile muamele edilen hücrelerde, Ang II uyarımı MAPK aktivasyonuna neden olmamıştır. Fakat araştırmacılar olayda rol oynayan protein tirozin kinazın belli olmadığını belirtmişlerdir [130]. Aynı grup, daha sonraki yaptığı çalışmada ise Ang II uyarımıyla gerçekleşen MAPK aktivasyonunun Ca^{2+} bağımlı EGFR transaktivasyonu ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu amaçla seçici olarak EGFR kinaz aktivitesini inhibe eden AG1478'in varlığında Ang II molekülünün VDKH'lerinde MAPK aktivasyonuna yol açmadığını bildirmişlerdir. Dahası araştırmacılar, Ang II'nin EGFR fosforilasyonuna neden olduğunu da gözlemlemişlerdir. Ang II uyarımının neden olduğu EGFR aktivasyonunun EGF ligandının kendisi kadar kuvvetli olmadığını, bu gözlemin başka araştırmacılar tarafından da gözlemlendiğini ve fosforilasyon seviyesinin reseptöre, adaptör proteinlerin bağlanmasına ve MAPK aktivasyonunu uyaracak şekilde yani eşik seviyede olabileceğini vurgulamışlardır. Çalışmada intraselüler Ca^{2+} şelasyonu Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunu inhibe etmiş fakat ekstraselüler Ca^{2+} şelasyonu ise EGFR fosforilasyonuna etki etmemiştir. Bu yüzden EGFR, AT1R'den başlayan Ras-MAPK yolağındaki intraselüler kalsiyum mobilizasyonunun alt yolağı gibi gözükmemektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre Ang II ile uyarılan VDKH'nde MAPK ailesi üyesi olan ERK1/2'nin fosforillendiğini ve bu etkinin Ang II'ye ait AT1R aracılığıyla gerçekleştiğini AT1R antagonisti olan losartan kullanarak gözlemledik. Bu gözlem literatürdeki veriler ile uyum içerisindedir. Daha sonra Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda olası EGFR transaktivasyonunu incelemek amacıyla Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu bir EGFR kinaz inhibitörü olan AG1478 varlığında düz kas hücrelerinde inceledik. Beklendiği gibi Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu AG1478 varlığında inhibe edilmiştir. Bu gözlem bize Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda EGFR transaktivasyonunun rolünü göstermektedir. AG1478 varlığında EGF reseptörü kinaz aktivitesini gösterememekte ve bunun sonucu olarak da kendisine ait alt yolak olaylarının aktivasyonu için gerekli olan fosforilasyon işlemini gerçekleştirememiştir.

Ang II uyarımıyla VDKH'lerinde EGFR transaktivasyon olayı belirlendikten sonra, aktivasyonun nasıl gerçekleştiği sorusuna yanıt aranmaya başlanmıştır. Eguchi ve ark. bu aktivasyonda MMP'lerin rol aldığını belirtmişler ve fakat MMP inhibitörü olarak bizim deneylerimizde kullandığımız GM6001'den farklı olarak BiPS kullanmışlardır [51]. Bir başka araştırma grubunda ise Shah ve ark. GM6001'in, Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu inhibe ettiğini C9 hücrelerinde gözlemlerken; aynı etkiyi HEK293 hücrelerinde gözlemleyememişlerdir [62]. Deneylerimiz sonucunda GM6001 varlığında Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu, Ang II ile uyarılan hücre grubuna göre daha düşük seviyededir. Bu gözlem bize Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda MMP'lerin rol aldığını düşündürmektedir. Yang ve ark. da 2005 yılında yayınlanan çalışmalarında AG1478 ve GM6001'in Ang II indüklü ERK1/2 aktivasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir [14]. Bu araştırmacıların bulguları ile benzer şekilde, bizde yapmış olmuş çalışma sonucunda Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda MMP'lerin rolü olduğunu gözlemledik.

Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda MMP enzimatik aktivitesi sonucu HB-EGF ligandının serbest kalması ve ardından EGF reseptörüne bağlanarak reseptör aktivasyonuna neden olması yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [52, 61, 97, 131]. Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda HB-EGF ligandının herhangi bir rolü olup olmadığı Shah ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada incelenmiştir [62]. Araştırmacılar C9 hücrelerinde MMP aktivasyonu sonucunda salınan HB-EGF ligandının EGF reseptörüne bağlanarak ERK1/2 aktivasyonuna yol açıp açmadığını incelemişlerdir. Bu amaca yönelik olarak spesifik HB-EGF inhibitörü olan CRM197 ve anti-HB-EGF antikoru kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada ERK1/2 aktivasyonunun inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca HB-EGF ligandı kullanarak da bu gözlemlerini doğrulamışlardır. Fakat aynı çalışmada kullanılan bir diğer hücre grubu olan HEK293 hücrelerinde Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda HB-EGF'nin bir rolü olmadığı gözlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada bizde bahsedilen çalışma ve literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda HB-EGF ligandı salınmasının etkisini inceledik. CRM197 uygulanmasından sonra Ang II ile uyarılan hücrelerde ERK1/2 fosforilasyonunda artış gözlenmedi. Bu sonuç Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda, HB-EGF molekülünün aracı bir molekül olarak rol oynadığını göstermektedir.

Epidermal büyüme faktörü ailesi üyelerinden biri olan EGF ligandının VDKH'lerinde mitojenik etkiye neden olduğu bilinmektedir [27]. EGF ligandının VDKH'nde ERK1/2 fosforilasyonunu artırdığı da bilinmektedir [132]. EGF ligandının bu etkiye kendine ait reseptör olan EGFR'a bağlanarak gerçekleştirdiği ve bu etkinin reseptör inhibitörü olan AG1478 varlığında gözlemlenmediği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Diğer araştırmacıların araştırmalarıyla uyumlu olarak bizde yapmış olduğumuz çalışmada EGF uyarımının VDKH'lerinde ERK1/2 fosforilasyonunu artırdığını gözlemledik. Daha sonra ise AG1478 ile inhibisyon koşulunda EGF ligandı uygulanarak fosforilasyon seviyesi incelendi. Beklendiği gibi EGFR inhibitörü varlığında EGF molekülü herhangi bir ERK1/2 aktivasyonuna neden olmadı. Bu sonuç bize EGF ligandının neden olduğu ERK1/2 aktivasyonunun EGFR aracılı olduğunu gerçekleştiren ERK1/2 aktivasyonunun EGFR aktivasyonuna bağlı olduğunu, olayın bir EGFR alt yolak olayı olduğunu göstermiştir.

Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda MMP aktivasyonu ve HB-EGF'nin rol oynadığından yukarıda bahsetmiştik. Ang II'nin yol açtığı ERK1/2 fosforilasyonuna EGF ligandının da neden olması akla EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda herhangi bir MMP aktivasyonu ya da HB-EGF rolünün olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Bu soruya yanıt verebilmek amacıyla MMP inhibitörü olan GM6001 ve HB-EGF inhibitörü olan CRM1097 ile deneyler yapıldı. EGFR transaktivasyonunu inceleyen diğer araştırmacıların bulgularında da gözlemlendiği üzere seçici HB-EGF ligand inhibitörü olan CRM197 EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonuna bir etki yapmamıştır [133, 134]. CRM197 seçici olarak HB-EGF ligandını inhibe ettiği ve EGF ligand inhibisyonuna neden olmadığı için bu gözlem beklenen bir sonuçtur. Diğer sonuç ise MMP inhibitörü kullanımı ile gösterildiği gibi EGF uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda MMP aktivasyonunun bir rolü olmadığıdır. Bu gözlemimiz diğer yapılan araştırma sonuçlarıyla uyumlu bir sonuçtur [62, 133, 134]. Bu gözlemimiz de aslında şaşırtıcı bir sonuç değildir. Çünkü EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu EGFR üzerinden gerçekleşmektedir. EGF ligandı doğrudan gidip EGFR'a bağlanarak aktivasyonuna ve de dolayısıyla ERK1/2 aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu sebeple, EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu HB-EGF salınımı ya da MMP aktivasyonu gibi ara basamaklara ihtiyaç duymayabilir.

Ang II uyarımının VDKH'nde ERK1/2 aktivasyonuna, AT1R ve müteakiben EGFR transaktivasyonu üzerinden yol açtığını ERK1/2 proteininin incelenmesi ile belirlemek tek başına yeterli değildir. Ang II'nin EGFR transaktivasyonuna yani reseptörün fosforilasyonuna doğrudan olan etkisini belirlemek için EGFR fosforilasyonu da incelenmelidir. Ang II reseptörü olan AT1R bir G-protein bağımlı reseptördür. EGF reseptörü ise reseptör tirozin kinazlar ailesinden olup intrinsik kinaz aktivitesine sahiptirler. Bu iki farklı tipteki reseptörün birbirini aktifleştirmesi yani bir reseptörün kendisine ait ligand ile aktive olduktan sonra diğer reseptörü aktive etmesi transaktivasyon olayı olarak adlandırılmaktadır. G-protein bağımlı reseptör agonistleri ile uyarılan Rat-1 fibroblast hücrelerinde EGFR fosforile olmuştur. Bu gözlem ilk olarak 1996 yılında Nature'da yayınladıkları çalışma ile Ullrich ve grubuna aittir. Araştırmacılar GPCR uyarımlı mitojenik sinyal iletiminde RTK'ların bir alt yolak olduğunu ve RTK'ların ligand-bağımsız bir aktivasyonla aktive olabildiğini vurgulamışlardır. EGFR aktivasyonunun AG1478 ile inhibe edilmesiyle MAPK aktivasyonunun da baskılandığını belirtmişlerdir [94]. Daha sonra Eguchi ve grubu VDKH'nde yapmış oldukları çalışmada, Ang II'nin EGFR fosforilasyonuna neden olduğunu ve bu etkinin EGFR inhibitörü olan AG1478 ile ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Eguchi ve grubu da, Ullrich ve arkadaşlarının Rat-1 hücrelerinde gözlemlediği AG1478 uygulamasının MAPK aktivasyonunu inhibe etmesi olayını VDKH'nde gözlemlemişlerdir. Bu ilk çalışmalardan sonra bu alanda pek çok araştırma yapılmış, birçok hücre tipinde Ang II ile EGFR transaktivasyonu incelenmiştir. Ang II uyarımlı MAPK ve PI3K aktivasyonunda olduğu kadar VDKH büyümesinde de transaktivasyon olayının merkezi bir konum işgal ettiği belirtilmiştir [132]. Yine Ang II uyarımı sonucu protein sentezi ve büyüme artışı gibi olaylarda EGFR transaktivasyonunun zorunlu olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir [135, 136]. Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunun AT1R üzerinden olduğu AT1R inhibitörü losartan kullanılarak yapılan deneylerle gösterilmiştir. Losartan varlığında Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonu, losartan uygulanmayan hücrelere göre anlamlı

derecede azalmıştır [137]. Başka bir çalışmada ise endojen Ang II reseptörü eksprese etmeyen hücrelerin bir grubu boş bir vektörle, diğer grup ise AT1R ekspresyonu yapan vektör ile transfekte edilmiştir. Boş vektör ile transfekte edilen hücrelerde Ang II uyarımı herhangi bir EGFR uyarımına yol açmazken, AT1R ekspresyonu yapan hücrelerde Ang II uyarımı EGFR fosforilasyonunu uyarmıştır. Ang II uyarımı losartan ile birlikte yapıldığında ise AT1R ekspresyonu yapan hücrelerdeki Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonu azalmıştır [138].

Yapmış olduğumuz çalışmada yukarıda bahsedilen ve literatürdeki verilerle uyumlu olarak Ang II uyarımının EGFR fosforilasyonuna neden olduğunu gözlemledik. Bu etkinin AT1R aracılı olduğunu losartan kullanarak yaptığımız deneyde gözlemledik. Losartan varlığında ekzojen olarak uygulanan Ang II, EGFR fosforilasyonuna neden olmamıştır. Ang II uyarımıyla gerçekleşen EGFR aktivasyonu EGFR antagonisti olan AG1478 ile anlamlı derecede azalmıştır. Bu gözlem bizlere, Ang II'nin EGFR transaktivasyonuna neden olduğunu ve EGFR transaktivasyonuna bağlı alt yolları uyarabileceğini göstermektedir.

SONUÇLAR

Mevcut çalışmada rat aortasından izolasyon yoluyla elde edilen ve primer olarak kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerinde Ang II ve EGF uyarımının ERK1/2 ve EGFR fosforilasyonuna olan etkisi ve bu etkilerin hangi ara basamaklar üzerinden olduğu çeşitli inhibitörler aracılığıyla incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

1. Ang II uygulanması (100 nM, 5 dk) VDKH'nde ERK1/2 fosforilasyonunu kontrol seviyesine göre yaklaşık 4 kat artırmıştır.
2. Ang II, VDKH'nde ERK1/2 aktivasyonunu kendisine ait reseptör olan AT1R aracılığıyla gerçekleştirmektedir.
3. AT1R antagonisti losartan ve EGFR inhibitörü AG1478, Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu kontrol seviyesine kadar baskılamıştır.
4. Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu, bir EGFR ligandı olan HB-EGF'nin kendine has inhibitörü olan CRM197 ile inhibe olmuştur. Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda HB-EGF rol almaktadır.
5. Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda MMP inhibitörü olan GM6001 ile birlikte uygulanması ERK1/2 fosforilasyonunu anlamlı derecede değiştirmemiştir. GM6001 uygulanması CRM197 uygulanmasına benzer bir sonuç doğurarak Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunda MMP'lerin rol aldığını göstermektedir.
6. EGF uygulaması (20 ng/ml, 5 dk) VDKH'nde ERK1/2 fosforilasyonunu yaklaşık 3 kat artırmıştır.
7. EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu EGFR üzerinden gerçekleşmektedir. EGF uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu EGFR alt yolağına ait bir olaydır.
8. AG1478, Ang II ve EGF uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu inhibe etmektedir.
9. HB-EGF inhibitörü olan CRM197'nin ve MMP inhibitörü olan GM6001'in EGF uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonuna herhangi bir etkisi yoktur.
10. Ang II, VDKH'nde EGFR-^{Tyr1068} fosforilasyonuna neden olmaktadır. Bu etki, AT1R üzerinden gerçekleşmektedir.
11. Ang II uyarımlı EGFR fosforilasyonunu losartan ve AG1478 ile inhibe olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. WHO, *The World Health Report 2003: Shaping the Future.*, 2003. p. 85.
2. Hajjar, I., J.M. Kotchen, and T.A. Kotchen, *Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control*. Annual review of public health, 2006. 27: p. 465-90.
3. Oğuz, N., *Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ürik Asit İndüklü p44/42 MAPK, p38 MAPK ve PDGFRB Fosforilasyonu ve Bu Fosforilasyonlarla COX-2 ve NADPH Oksidaz Aktivitesinin İlişkisi*. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2011.
4. Savoia, C., et al., *Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2011. 13.
5. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician*. Can J Cardiol, 2012. 28(3): p. 288-95.
6. Stitzinger, M., *Lipids, inflammation and atherosclerosis*. Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, (LACDR), Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Leiden University, 2007: p. 13.
7. Benigni, A., P. Cassis, and G. Remuzzi, *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging*. EMBO Molecular Medicine, 2010. 2(7): p. 247-257.
8. Hirata Y, F.D., Sata M., *Critical role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis*. Nippon Rinsho, 2011 Jan. 69(1): p. 55-9.
9. Ma, T.K.W., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status*. British Journal of Pharmacology, 2010. 160(6): p. 1273-1292.
10. Schiffrin, R.M.T.a.E.L., *Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells*. Pharmacol Rev, 2000 Dec. 52(4): p. 639-672.
11. Touyz, R.M., *Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II*. Experimental Physiology, 2005. 90(4): p. 449-455.

12. Song, K., et al., *Induction of angiotensin converting enzyme and angiotensin II receptors in the atherosclerotic aorta of high-cholesterol fed Cynomolgus monkeys*. *Atherosclerosis*, 1998. 138(1): p. 171-82.
13. Yang, B.C., et al., *Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(9): p. 1433-9.
14. Yang, X., et al., *Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway*. *Mol Cells*, 2005. 20(2): p. 263-70.
15. Hidekatsu Nakashima, H.S., Haruhiko Ohtsu, James Y. Chao, Hirotoshi Utsunomiya, Gerald D. Frank and Satoru Eguchi, *Angiotensin II Regulates Vascular and Endothelial Dysfunction: Recent Topics of Angiotensin II Type-1 Receptor Signaling in the Vasculature*. *Current Vascular Pharmacology*, 2006(4): p. 67-78.
16. Fyhrquist, F., K. Metsarinne, and I. Tikkanen, *Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders*. *J Hum Hypertens*, 1995. 9 Suppl 5: p. S19-24.
17. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. 292(1): p. C82-97.
18. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(1): p. 11-34.
19. Clarke, C., et al., *Regulation of cardiovascular remodeling by the counter-regulatory axis of the renin-angiotensin system*. *Future Cardiol*, 2013. 9(1): p. 23-38.
20. Saito, Y. and B.C. Berk, *Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. 33(1): p. 3-7.
21. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(4): p. 639-72.
22. Yang, H., et al., *Angiotensin IV protects against angiotensin II-induced cardiac injury via AT4 receptor*. *Peptides*, 2011. 32(10): p. 2108-15.
23. Nguyen Dinh Cat, A. and R.M. Touyz, *Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms*. *Curr Hypertens Rep*, 2011. 13(2): p. 122-8.

24. Li, Y., L.O. Levesque, and M.B. Anand-Srivastava, *Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 299(6): p. H1959-67.
25. Hao, L., et al., *Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway*. Circ Res, 2004. 94(1): p. 68-76.
26. Touyz, R.M. and C. Berry, *Recent advances in angiotensin II signaling*. Braz J Med Biol Res, 2002. 35(9): p. 1001-15.
27. Dreux, A.C., et al., *The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis*. Atherosclerosis, 2006. 186(1): p. 38-53.
28. Çetin, A., *Rat Aortik Vasküler Düz Kas Hücre Kültüründe Yüksek Glukozlu Ortamda Anjiyotensin II Uyarımı İle Oluşan Hücre Proliferasyonu Üzerine Resveratrolün Etkileri*. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya A.D. Doktora Tezi, Antalya, 2011.
29. <http://news.softpedia.com/newsImage/Vascular-Diseases-and-Radiotherapy-Linked-Directly-2.jpg/>, Erişim Tarihi: 23.04.2013.
30. Owens, G.K., *Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells*. Physiol Rev, 1995. 75(3): p. 487-517.
31. Muto, A., et al., *Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons*. J Vasc Surg, 2007. 45 Suppl A: p. A15-24.
32. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. Physiol Rev, 2004. 84(3): p. 767-801.
33. Lacolley, P., et al., *Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. 297(5): p. H1567-75.
34. Nguyen Dinh Cat, A. and R.M. Touyz, *A new look at the renin-angiotensin system-focusing on the vascular system*. Peptides, 2011. 32(10): p. 2141-50.
35. Kumar, R., V.P. Singh, and K.M. Baker, *The intracellular renin-angiotensin system in the heart*. Curr Hypertens Rep, 2009. 11(2): p. 104-10.
36. Danser, A.J. and G. Nguyen, *The Renin Academy Summit: advancing the understanding of renin science*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2008. 9(2): p. 119-23.

37. Reudelhuber, T.L., *Prorenin, Renin, and their receptor: moving targets*. Hypertension, 2010. 55(5): p. 1071-4.
38. Imai, Y., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis*. Circ J, 2010. 74(3): p. 405-10.
39. Cangussu, L.M., et al., *Angiotensin-(1-7) antagonist, A-779, microinjection into the caudal ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats restores baroreflex bradycardia*. Peptides, 2009. 30(10): p. 1921-7.
40. Sampaio, W.O., et al., *Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells*. Hypertension, 2007. 50(6): p. 1093-8.
41. Reaux, A., M.C. Fournie-Zaluski, and C. Llorens-Cortes, *Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure*. Trends Endocrinol Metab, 2001. 12(4): p. 157-62.
42. Yang, R., et al., *Renal vasoconstrictor and pressor responses to angiotensin IV in mice are AT1a-receptor mediated*. J Hypertens, 2010. 28(3): p. 487-94.
43. Rautureau, Y., P. Paradis, and E.L. Schiffrin, *Cross-talk between aldosterone and angiotensin signaling in vascular smooth muscle cells*. Steroids, 2011. 76(9): p. 834-9.
44. Rodrigues-Ferreira, S. and C. Nahmias, *An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins*. Trends Endocrinol Metab, 2010. 21(11): p. 684-90.
45. Kalmes, A., G. Daum, and A.W. Clowes, *EGFR transactivation in the regulation of SMC function*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 947: p. 42-54; discussion 54-5.
46. Schiffrin, E.L. and R.M. Touyz, *From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 287(2): p. H435-46.
47. Unger, T., *The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2002. 89(2A): p. 3A-9A; discussion 10A.
48. Duff, J.L., et al., *Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway*. Cardiovasc Res, 1995. 30(4): p. 511-7.
49. Lyle, A.N. and K.K. Griendling, *Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species*. Physiology (Bethesda), 2006. 21: p. 269-80.
50. Cheng, Z.J., H. Vapaatalo, and E. Mervaala, *Angiotensin II and vascular inflammation*. Med Sci Monit, 2005. 11(6): p. RA194-205.

51. Saito, S., et al., *Metalloprotease inhibitor blocks angiotensin II-induced migration through inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 294(5): p. 1023-9.
52. Ohtsu, H., et al., *ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(9): p. e133-7.
53. Melenhorst, W.B., et al., *ADAM17 upregulation in human renal disease: a role in modulating TGF- α availability?* Am J Physiol Renal Physiol, 2009. 297(3): p. F781-90.
54. Touyz, R.M., et al., *Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries*. Circulation, 1999. 99(3): p. 392-9.
55. Touyz, R.M., G. Yao, and E.L. Schiffrin, *c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(6): p. 981-7.
56. Touyz, R.M., et al., *Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2002. 39(2 Pt 2): p. 479-85.
57. Touyz, R.M., et al., *Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells*. J Hypertens, 2004. 22(6): p. 1141-9.
58. Frank, G.D., et al., *Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II*. Endocrinology, 2000. 141(9): p. 3120-6.
59. Touyz, R.M., et al., *Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation*. Can J Physiol Pharmacol, 2003. 81(2): p. 159-67.
60. Montezano, A.C., et al., *Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(8): p. 1511-8.
61. Mifune, M., et al., *G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor*. J Biol Chem, 2005. 280(28): p. 26592-9.

62. Shah, B.H., et al., *Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor*. Mol Endocrinol, 2004. 18(8): p. 2035-48.
63. Olson, E.R., et al., *Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase Cdelta and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts*. Hypertension, 2008. 51(3): p. 704-11.
64. Harris, R.C., E. Chung, and R.J. Coffey, *EGF receptor ligands*. Exp Cell Res, 2003. 284(1): p. 2-13.
65. Massague, J. and A. Pandiella, *Membrane-anchored growth factors*. Annu Rev Biochem, 1993. 62: p. 515-41.
66. Raab, G. and M. Klagsbrun, *Heparin-binding EGF-like growth factor*. Biochim Biophys Acta, 1997. 1333(3): p. F179-99.
67. Yu, W.H., et al., *CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling*. Genes Dev, 2002. 16(3): p. 307-23.
68. Suzuki, M., et al., *Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site*. J Biol Chem, 1997. 272(50): p. 31730-7.
69. Lax, I., et al., *Epidermal growth factor (EGF) induces oligomerization of soluble, extracellular, ligand-binding domain of EGF receptor. A low resolution projection structure of the ligand-binding domain*. J Biol Chem, 1991. 266(21): p. 13828-33.
70. Lax, I., et al., *Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules*. EMBO J, 1989. 8(2): p. 421-7.
71. Ullrich, A. and J. Schlessinger, *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. 61(2): p. 203-12.
72. Honegger, A.M., et al., *Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing*. Cell, 1987. 51(2): p. 199-209.
73. Prywes, R., et al., *Mutations in the cytoplasmic domain of EGF receptor affect EGF binding and receptor internalization*. EMBO J, 1986. 5(9): p. 2179-90.

74. Hurwitz, D.R., et al., *EGF induces increased ligand binding affinity and dimerization of soluble epidermal growth factor (EGF) receptor extracellular domain*. J Biol Chem, 1991. 266(32): p. 22035-43.
75. Lemmon, M.A., et al., *Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer*. EMBO J, 1997. 16(2): p. 281-94.
76. Moriki, T., H. Maruyama, and I.N. Maruyama, *Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain*. J Mol Biol, 2001. 311(5): p. 1011-26.
77. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. 103(2): p. 211-25.
78. Wells, A., *EGF receptor*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. 31(6): p. 637-43.
79. Ko, Y., et al., *Synergistic action of angiotensin II, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta on platelet-derived growth factor-BB, basic fibroblastic growth factor, and epidermal growth factor-induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells*. Am J Hypertens, 1993. 6(6 Pt 1): p. 496-9.
80. Ko, Y., et al., *High-density lipoprotein reduces epidermal growth factor-induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 1993. 99(2): p. 253-9.
81. Higashiyama, S., et al., *A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF*. Science, 1991. 251(4996): p. 936-9.
82. Dluz, S.M., et al., *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen*. J Biol Chem, 1993. 268(24): p. 18330-4.
83. Temizer, D.H., et al., *Induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA by phorbol ester and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1992. 267(34): p. 24892-6.
84. Miyagawa, J., et al., *Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1995. 95(1): p. 404-11.
85. Nakata, A., et al., *Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis*. Circulation, 1996. 94(11): p. 2778-86.

86. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2003. 21(14): p. 2787-99.
87. Yaish, P., et al., *Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors*. Science, 1988. 242(4880): p. 933-5.
88. Lyall, R.M., et al., *Tyrphostins inhibit epidermal growth factor (EGF)-receptor tyrosine kinase activity in living cells and EGF-stimulated cell proliferation*. J Biol Chem, 1989. 264(24): p. 14503-9.
89. Liebmann, C., *EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions*. Mol Cell Endocrinol, 2011. 331(2): p. 222-31.
90. Ohtsu, H., P.J. Dempsey, and S. Eguchi, *ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. 291(1): p. C1-10.
91. Almendro, V., S. Garcia-Recio, and P. Gascon, *Tyrosine kinase receptor transactivation associated to G protein-coupled receptors*. Curr Drug Targets, 2010. 11(9): p. 1169-80.
92. Linseman, D.A., C.W. Benjamin, and D.A. Jones, *Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1995. 270(21): p. 12563-8.
93. Rao, G.N., P. Delafontaine, and M.S. Runge, *Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1995. 270(46): p. 27871-5.
94. Daub, H., et al., *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*. Nature, 1996. 379(6565): p. 557-60.
95. Prenzel, N., et al., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*. Nature, 1999. 402(6764): p. 884-8.
96. Murasawa, S., et al., *Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor*. Circ Res, 1998. 82(12): p. 1338-48.
97. Schafer, B., et al., *Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival*. J Biol Chem, 2004. 279(46): p. 47929-38.

98. www.uniprot.org. 2013 02.04.2013]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P78536>.
99. Yong, V.W., et al., *Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(7): p. 502-11.
100. Cauwe, B. and G. Opdenakker, *Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. 45(5): p. 351-423.
101. Newby, A.C., *Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases*. Vascu Pharmacol, 2012. 56(5-6): p. 232-44.
102. Ketelhuth, D.F. and M. Back, *The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis*. Curr Atheroscler Rep, 2011. 13(2): p. 162-9.
103. Zhang, X., Y.H. Shen, and S.A. LeMaire, *Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved?* Vascular, 2009. 17(3): p. 147-57.
104. Wang, M., et al., *Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats*. Am J Pathol, 2005. 167(5): p. 1429-42.
105. Cheng, K., G. Xie, and J.P. Raufman, *Matrix metalloproteinase-7-catalyzed release of HB-EGF mediates deoxycholytaurine-induced proliferation of a human colon cancer cell line*. Biochem Pharmacol, 2007. 73(7): p. 1001-12.
106. Jiang, L., et al., *Increased aortic calpain-1 activity mediates age-associated angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells*. PLoS One, 2008. 3(5): p. e2231.
107. Virdis, A. and E.L. Schiffrin, *Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. 12(2): p. 181-7.
108. Savoia, C. and E.L. Schiffrin, *Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions*. Clin Sci (Lond), 2007. 112(7): p. 375-84.
109. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. 20(3): p. 645-51.
110. Ando, H., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats*. Stroke, 2004. 35(7): p. 1726-31.

111. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB J, 1998. 12(12): p. 1063-73.
112. Young, W., et al., *Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor- α - and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2000. 86(8): p. 906-14.
113. Pritchard, K.A., Jr., et al., *Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 1994. 269(11): p. 8504-9.
114. Ohnaka, K., et al., *Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 2000. 35(1 Pt 1): p. 68-75.
115. Hu, Z.W., et al., *Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 303(2): p. 563-73.
116. Zoccali, C., et al., *Uric acid and endothelial dysfunction in essential hypertension*. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(5): p. 1466-71.
117. Cheng, H.F. and R.C. Harris, *Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension*. Hypertension, 2004. 43(3): p. 525-30.
118. Alvarez, Y., et al., *Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. 321(1): p. 381-8.
119. Opar, A.L., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition normalizes arterial blood pressure in CYP1A1-REN2 transgenic rats with inducible ANG II-dependent malignant hypertension*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. 291(3): p. F612-8.
120. Widlansky, M.E., et al., *Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension*. Hypertension, 2003. 42(3): p. 310-5.
121. Clempus, R.E. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2006. 71(2): p. 216-25.
122. Griendling, K.K., *Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system*. Heart, 2004. 90(5): p. 491-3.
123. Griendling, K.K. and D.G. Harrison, *Dual role of reactive oxygen species in vascular growth*. Circ Res, 1999. 85(6): p. 562-3.

124. Ives, H.E., et al., *Preparation of functional smooth muscle cells from the rabbit aorta*. J Exp Med, 1978. 148(5): p. 1400-13.
125. Gunther, S., et al., *Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells*. J Cell Biol, 1982. 92(2): p. 289-98.
126. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. 150(1): p. 76-85.
127. World Health Organisation *Causes of Death 2008 Summary Tables*. May, 2011.
128. *Türk Kardioloji Derneği Ulusal Kalp Sağlığı Politikası Ana İlkeleri*. 2007: p. 1.
129. Luttrell, L.M., et al., *Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation*. J Biol Chem, 1997. 272(7): p. 4637-44.
130. Eguchi, S., et al., *Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1996. 271(24): p. 14169-75.
131. Lautrette, A., et al., *Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach*. Nat Med, 2005. 11(8): p. 867-74.
132. Bokemeyer, D., U. Schmitz, and H.J. Kramer, *Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor*. Kidney Int, 2000. 58(2): p. 549-58.
133. Bakken, A.M., et al., *Cell migration in response to the amino-terminal fragment of urokinase requires epidermal growth factor receptor activation through an ADAM-mediated mechanism*. J Vasc Surg, 2009. 49(5): p. 1296-303.
134. Roztocil, E., S.M. Nicholl, and M.G. Davies, *Insulin-induced epidermal growth factor activation in vascular smooth muscle cells is ADAM-dependent*. Surgery, 2008. 144(2): p. 245-51.
135. Eguchi, S., et al., *Epidermal growth factor receptor is indispensable for c-Fos expression and protein synthesis by angiotensin II*. Eur J Pharmacol, 1999. 376(1-2): p. 203-6.

136. Voisin, L., et al., *EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. 283(2): p. C446-55.
137. Ding, G., et al., *ANG II induces c-Jun NH2-terminal kinase activation and proliferation of human mesangial cells via redox-sensitive transactivation of the EGFR*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. 293(6): p. F1889-97.
138. Chen, J., et al., *Role of EGF receptor activation in angiotensin II-induced renal epithelial cell hypertrophy*. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(6): p. 1615-23.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa KIRÇA, 26.06.1986 tarihinde Kayseri’de doğdu. İlköğrenimini farklı okullarda tamamladıktan sonra lise eğitimini Kayseri Lisesi’nde tamamladı. 2004 yılında yüksek öğrenim hayatına Trabzon’da Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edb. Fak. Kimya Bölümünde başladı. 2009 yılında onur derecesiyle mezun olduktan sonra 2010 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans programına araştırma görevlisi olarak başladı. Yüksek lisans programı süresince Erasmus Öğrenci Değişim Programından yararlanmaya hak kazanarak Belçika Leuven Üniversitesi’nde (KU Leuven) 4 ay süreyle peroksizom ve endoplazmik retikulum stresi üzerine araştırmalarda bulundu. Yabancı dili İngilizce’dir.