

Rho Kinaz ve Apoptoz

Rho Kinase and Apoptosis

Aysun ÖZDEMİR¹, Mustafa ARK¹

¹ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, çeşitli morfolojik değişimlerle karakterizedir. Sistein proteaz olan kaspazlar, membran tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması, DNA disintegrasyonu ve hücre parçalanması gibi apoptotik morfolojik değişimlerden sorumludur. Apoptoz, yaşamın her aşamasında gelişir ve normal doku homeostazında önemli bir rolü vardır. Bunun yanı sıra apoptoz, AIDS, Alzheimer, otoimmün hastalıklar ve bazı kardiyovasküler hastalıkları gibi birçok patolojik durumlara da eşlik eder.

Hücre içi birçok sinyalleme mekanizmalarına aracılık eden küçük bir G proteini olan Rho'nun, 1990'ların ortalarında iki efektörü tanımlanmıştır. Bunlar ROK α /ROCK II ve ROK β /ROCK I (Rho kinazlar)'dır. Rho kinazların kan basıncı homeostazi, düz kas kontraksiyonu, hücre proliferasyonu, hücre adezyonu, migrasyonu ve inflamatuvar cevabı da içeren çok sayıda önemli fizyolojik işlevlere katıldığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, ROCK I ve ROCK II'nin apoptozun düzenlenmesinde etkili olduğu görülmüştür. ROCK I ve ROCK II'nin apoptozun işlem fazında ("execution phase") kesilip etkinleştiği gösterilmiştir. Etkin ROCK'nin indüklediği miyozin hafif zincir fosforilasyonu membran tomurcuk oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca ROCK'nin hücre parçalanması ve apoptotik cisimciklerin fagositozu gibi apoptozun öteki basamaklarında da etkili olduğu bilinmektedir. Apoptozun biyokimyasal yollarının anlaşılması kanser ve kardiyovasküler bozukluklar gibi etiyolojisi tam olarak bilinmeyen birçok hastalığın tedavisi için yararlı olabilir. Bu derlemede apoptozun düzenlenmesinde ROCK sinyalizasyonunun anlaşılmasına odaklanılmıştır.

Anahtar Sözcükler: apoptosis, Rho-associated kinases, ROCK I, ROCK II

Abstract

Apoptosis, programmed cell death, is characterized by several morphological changes. Cysteine-proteases called caspases are responsible for those apoptotic morphological changes including membrane blebbing, chromatin condensation, DNA disintegration and cell fragmentation. Apoptosis develops during lifetime and has an important role in normal tissue homeostasis. Moreover, apoptosis contributes to several pathological conditions including AIDS, Alzheimer, autoimmune syndromes and cardiovascular diseases.

Small G protein Rho mediates several intracellular mechanisms. In the middle of 1990's two effectors of Rho, ROK α /ROCK II and ROK β /ROCK I (Rho kinase), were identified. It was shown that Rho kinases contribute to physiological functions such as blood pressure homeostasis, smooth muscle contraction, cell proliferation, adhesion, migration and inflammatory response. Recent studies showed that two ROCK isoforms, ROCK I and ROCK II, are involved in the regulation of apoptosis. ROCK I and ROCK II were shown to be cleaved and activated in the execution phase of apoptosis. Activated ROCK-induced myosin light chain phosphorylation increases membrane blebbing. ROCK also has roles in other processes of apoptosis such as fragmentation and phagocytosis of apoptotic bodies. Identifying possible involvement of ROCK in the regulation of apoptosis can be helpful in treating several diseases such as cancer and cardiovascular disorders. This review focuses on understanding of ROCK signaling in the regulation of apoptosis.

Key Words: apoptosis, Rho-associated kinases, ROCK I, ROCK II

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2009;2(2):1-9

Geliş Tarihi : 05.06.2009

Kabul Tarihi : 01.10.2009

Yazışma Adresi:

Dr. Mustafa ARK

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı,

Etiler, 06330, Ankara

Tel : 0-0312-2023128

Faks : 0-0312-2235018

E-posta : mark@gazi.edu.tr

Giriş

Küçük G proteinlerinden olan Rho'nun, hücre adezyonu, proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok hücrenel olayda düzenleyici işlevi vardır. Rho'nun, çok sayıdaki efektöründen en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılan Rho kinazdır. Rho kinazın iki izoformu, ROK α /ROCK II ve ROK β /ROCK I, bulunmaktadır (1,2).

Apoptoz, gereksinim duyulmayan ve biyolojik işlevleri bozulan hücrelerin, çevreye zarar verilmeden gerçekleşen programlı ölüm şeklidir. Her iki ROCK izoformunun da apoptozda önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. ROCK I, kaspaz 3 aracılıklı kesilme ile etkin olurken (3,4); ROCK II, granzim B aracılığı ile kesilerek etkin edilmektedir (5). Aktif formlar, apoptotik hücrelere özgül olan membran tomurcuk ("blebbing") oluşumuna aracılık etmektedirler.

Bu derlemede hücre içi birçok mekanizmada etkili olan ROCK'un apoptozdaki rolü değerlendirilmiştir.

Apoptoz

Apoptoz Yunanca bir sözcük olup (apo:den/-dan ve ptosis:düşmek) ilk kez Kerr ve ark. (6) tarafından bir çeşit hücre ölüm şeklini tanımlamak için kullanılmıştır. Enerjiye bağımlı olarak gerçekleşen apoptoz, morfolojik değişimlerle kendini gösterir. İlk olarak hücre büzülür, nükleusta kromatin yoğunlaşır ve DNA parçalanır. Bu DNA parçaları ve çeşitli hücrenel organeller hücre zarı ile paketlenir (apoptotik cisimcikler) ve ortamdan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagositozla uzaklaştırılırlar (7).

Programlı hücre ölümünde işlem fazı, apoptozun aktif fazı olarak bilinir. Yaklaşık bir saat süren bu dönem çeşitli morfolojik değişimlerle karakterizedir (membran tomurcuk oluşumu, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması gibi). İşlem fazı üç aşamada gerçekleşmektedir (7). Salıverilme ("release") aşamasında hücreler ekstrasellüler matriksten koparak küresel bir şekle sahip olurlar. Hücrede aktin kortikal bölgede halka şeklinde toplanır ve tomurcuk oluşumuna zemin hazırlanmış olur. Tomurcuklanma aşamasında ise miyozin II aktivasyonu sonucu kortikal aktin halkası büzülür. Aynı anda hücre membranı-aktin kenetlenmesinde oluşan güçsüzlük sonucu membran-aktin bağlantısı koparak tomurcuk oluşumu görülmektedir. Apoptotik hücrelerde tomurcuklanma durduğunda yoğunlaşma aşamasına geçilir. Bu aşamada hücreler ya küçük apoptotik cisimciklere ayrılır ya da tek bir küçük hücre biçiminde yoğunlaşır.

Apoptoz yaşamın her aşamasında gelişir ve normal doku homeostazında önemli bir role sahiptir. Apoptoz süresince oluşan birçok morfolojik ve biyokimyasal değişimler kaspazların aktivasyonu ile gerçekleşir. Sistein proteazlar olarak bilinen kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırarlar. Apoptozda kaspazların aktivasyonu iki farklı yolla gerçekleşebilir. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini kullanan dış (ekstrinsik) yol, özgül ölüm sinyallerinden sorumludur. İç (intrinsik) yol ise

endoplazmik retikulum ve mitokondri aracılıklı sinyalleri içerir (8).

Dış yolda, Fas ve tümör nekroze edici faktör (TNF) gibi ölüm ligantları reseptörleri ile birleştiğinde kendilerinde doğal olarak bulunan ve ölüm bölgeleri olarak adlandırılan FADD (*Fas associated death domain*) ve TRADD (*TNFR associated death domain*) ile etkileşime geçerler (9). FADD ve TRADD prokaspaz 8'i keserek aktif kaspaz 8'i, aktif kaspaz 8 de, prokaspaz 3'ü keserek aktif kaspaz 3'ü oluşturur. Böylece kaspazların kaskat şeklinde aktivasyonları başlamış olur.

İç yolda mitokondri, ölüm sinyallerini iletmede ve yükseltgemedeki önemli role sahiptir. Radyasyon ve sitotoksik maddeler gibi uyarımlar proapoptotik etkili Bax ve Bak'ın mitokondri membranına transloke olup sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesine neden olurlar. Sitokrom c mitokondriden salıverildikten sonra APAF-1'e ("apoptotic protease activating factor-1") bağlanır ve onu etkinleştirir. ATP'nin de bu yapıya katılmasıyla apoptozom adı verilen kompleks bir yapı oluşur. Bu yapı inaktif olan prokaspaz 9'u aktif kaspaz 9'a dönüştürür. Kaspaz 9 da kaspaz 3'ü etkinleştirir. Aktif kaspaz 3, kompleks halinde bulunan kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz ve inhibitörünü keserek birbirinden ayırır. Böylece serbest haldeki kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz, apoptozun göstergesi olan kromatin yoğunlaşmasına ve DNA parçalanmasına neden olur.

Apoptozom oluşumu, kaspaz inhibitörü (IAP-*Inhibitor of apoptosis proteins*) ile engellenebilir. Mitokondriyal proteinler olan Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 ile de IAP'ın etkisi antagonize edilir.

Ayrıca ekstrinsik uyarı ile mitokondriyal yol da etkinleşir. Aktif haldeki kaspaz 8, proapoptotik etkili Bid'i etkin ederek sitokrom c salıverilmesine neden olur.

Küçük G Proteinleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar, küçük GTP'ye bağlı proteinlerin (G proteinleri) hücre içi sinyalleme yollarında önemli role sahip olduğunu göstermiştir. Küçük G proteinleri (20-35 kDa) hücre farklılaşması, bölünmesi, hücre iskeletinin kontrolü gibi çeşitli hücrenel olaylarda görev alır. Tüm G proteinleri aktif GTP-bağlı form ile inaktif GDP-bağlı formda bulunurlar. GEFs (guanin nükleotit değiştirici faktörler) ve GAPs (GTPaz etkin edici proteinler) proteinleri bu döngüyü düzenler.

G proteinleri Rho, Ras, Rab, Sarl/Arf ve Ran ailelerinden oluşur (10). Ras ailesinin Rap, Ral ve Reb, Rho ailesinin Rho (A'dan E'ye ve G izoformları), Rac (1'den 3'e izoformları), Cdc42 ve TC10 olmak üzere üyeleri belirlenmiştir (10). Ras proteinleri gen transkripsiyonuna aracılık eden sinyalleri düzenlerken, Rho proteinleri aktin hücre iskeletinin işlevlerini düzenler. Rab, Ran ve Arf proteinleri ise veziküller ve nükleo-sitoplazmik taşımadan sorumludur.

Rho/Rho Kinaz Yolađı

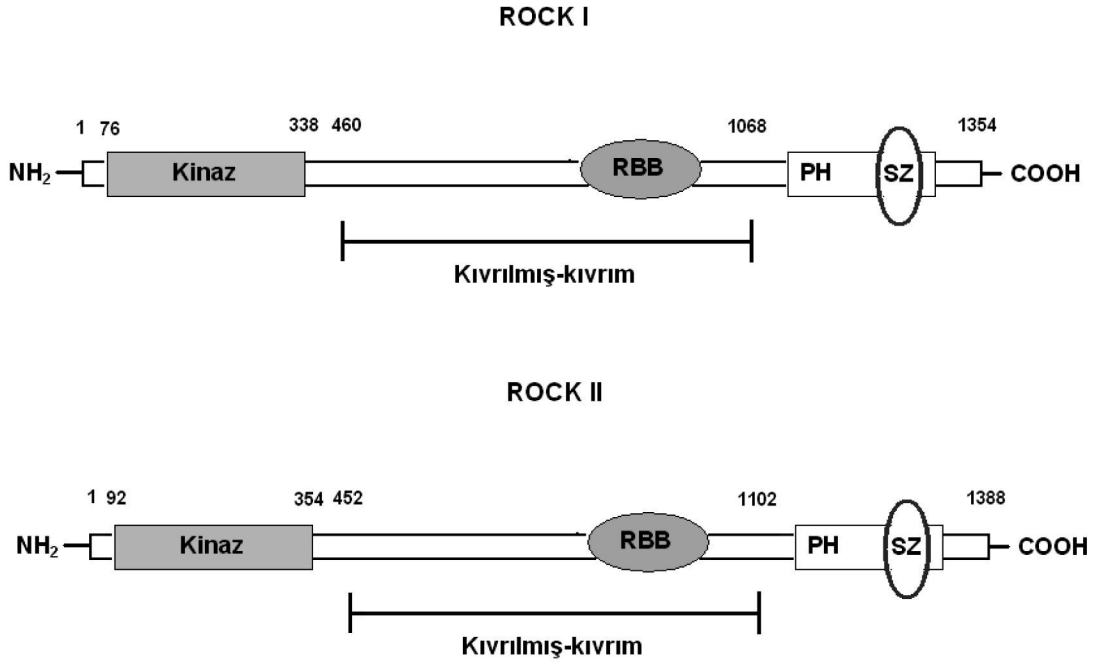
Rho, hücrede GTP-bağlı aktif form ile GDP-bağlı inaktif formda bulunur. Rho A, Rho B ve Rho C (toplam Rho olarak bilinir) amino asit dizilişı bakımından %85 benzerlik gösterir (11). Rho proteinleri gen ekspresyonunu ve aktin hücre iskeletini kontrol eden sinyalleme yollarında etkilidir. Rho'ya bağımlı yollar, Rho inhibitörü olan ve *Clostridium botulinum*'dan elde edilen C₃ transferaz toksini kullanılarak incelenmiştir.

Rho kinazlar (ROCK'ler) Rho'nun ilk efektörleri olarak keşfedilmiştir. ROCK, ROCK I ve ROCK II olmak üzere iki izoforma sahiptir. 1990'ların ortasında ilk olarak ROCK α /ROCK II/Rho kinaz α izole edilmiştir (1,2,12). ROCK'nin başka izoformu ise ROCK β / ROCK I /Rho kinaz β olarak tanımlanmıştır (1,2,12).

Rho Kinazların Yapısı

ROCK, 160 kDa moleköl ağırlığına sahip, serin/treonin kinaz etkinlikli protein olarak tanımlanmıştır. Rho kinaz N-terminal bölgesinde bulunan katalitik (kinaz) bölge, orta bölümde bulunan kıvrılmış-kıvrım (*coiled-coil*) bölge, C-terminal bölgesinde bulunan ve sisteince zengin (SZ) bölümden oluşan plekstrin-homoloğu (PH) bölge olmak üzere üç ana bölgeden oluşur (9) (Şekil 1). Rho kinaz üzerinde Rho'nun bağlandığı bölge (RBB), enzimin kıvrılmış-kıvrım bölgesinin C terminalinde lokalize olmuştur. GTP-bağlı Rho'nun bu bölgeye bağlanması ile de Rho kinazın etkinliği artmaktadır (9).

Rho-kinazın her iki izoformu, kinaz bölgesinden %92, tüm amino asit diziliminden %65 benzerlik göstermektedir (2).



Şekil 1 : ROCK (Rho kinaz) I ve II'nin moleköl yapışı

Rock Aktivitesinin Düzenlenmesi

ROCK otinhibitör etkiye sahiptir (13). İnaktif formda ROCK'nin C-terminal PH bölgesi ve RBB, kinaz bölgesi ile etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı enzim katalitik etkisini gösterememektedir.

Enzimin etkinlik gösterebilmesi için inhibitör C-terminal bölgesi ile katalitik bölge arasındaki etkileşimin bozulması gerekmektedir. Bu etkileşim, ya çeşitli substratların enzimin C-terminal bölgesinde kendilerine özgül bağlanma yerlerine bağlanması ile ya da inhibitör C-terminal bölgesinin kesilmesi ile engellenir (13).

ROCK etkinliği çeşitli mekanizmalarla düzenlenir. Enzimin kinaz etkinliği Rho'ya bağlanmasından sonra artar (2). Kıvrılmış-kıvrım bölgesinde bulunan RBB yaklaşık seksen amino asit uzunluğunda olup, Rho A, Rho B, Rho C, gibi yalnızca aktif durumdaki Rho GTPaz'larla etkileşim içindedir (14). GTP-bağlı Rho'nun, RBB'ye bağlanması ile ROCK'nin inhibitör karboksi terminal bölgesi ile katalitik bölgesi arasındaki etkileşimi bozularak enzim aktifleşir. Rho'ya bağımlı ROCK aktivasyonu hücre türüne bağlı olarak kasılabilirliğinde, hücre geçirgenliğinde, migrasyonu ve proliferasyonunda değişikliğe ve apoptoza neden olabilir.

Arakidonik asit (AA) ve sifingosilfosforilkolin (SPC) gibi lipid mediyatörleri de PH bölgesi ile etkileşerek ROCK'yi, Rho'dan bağımsız olarak etkin hale getirebilirler (15,16).

ROCK, inhibitör karboksi terminal bölgesinin proteolitik olarak kesilmesi ile de etkin edilebilir. Bu durumda inhibitör bölge kesilerek uzaklaştırılır ve enzimin aktif bölgesi açığa çıkar. Apoptoz süresince kaspaz 3, ROCK I'ı DETD1113 bölgesinden keserek aktifleştirir (3,4). Diğer yandan sitotoksik T lenfositlerine ait granüllerden salgılanan proapoptotik bir enzim olan granzim B, ROCK II'yi IGLD1131 bölgesinden keserek aktif hale getirir (5). Ayrıca endotel hücrelerinde ROCK II'nin, trombine yanıt olarak kaspaz 2 aracılıklı kesilme ile de aktif hale geldiği bilinmektedir (17). Ancak bu son olay apoptozdan bağımsız olarak gerçekleşmektedir.

Yapılan araştırmalar, başka küçük GTP-bağlı proteinlerin ROCK'lerin negatif düzenleyicisi olarak çalıştığını göstermiştir. Gem ve Rad ROCK'ye bağlanıp enzimi inaktive etmektedir (18). Gem ROCK I aracılıklı MLC (miyozin hafif zincir) ve MLC fosfatının fosforilasyonunu inhibe etmektedir, buna karşın Rad ROCK II'nin indüklediği yanıtları inhibe etmektedir (18). Bir başka küçük G proteini olan Rho E ise ROCK I'in N-terminal bölgesine bağlanarak, Rho'nun RBB'ye bağlanmasını engeller (19). Y27632 ve fasudil gibi ROCK inhibitörleri enzimin kinaz bölgesine bağlanarak hem ROCK I hem de ROCK II'yi inhibe ederler (20).

Kaspaz 3 aracılıklı ROCK I aktivasyonu apoptotik uyarana bağlı olmaksızın, hemen hemen tüm apoptotik olaylarda membran tomurcuk oluşumundan sorumludur. Diğer taraftan, Rho aracılıklı ROCK I ve ROCK II, granzim

B ve kaspaz 2 aracılıklı ROCK II aktivasyonu hücre türüne ve/veya apoptotik uyarana bağlıdır (5,17,21).

Rock Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

ROCK II beyin ve kas dokusunda çok eksprese olurken, ROCK I böbrek, karaciğer ve testislerde eksprese olmaktadır. Hem ROCK I hem ROCK II damar düz kasında ve kalpte eksprese olmaktadır. ROCK I ve ROCK II hücrede sitozolde bulunurken, Rho ile etkin edildiklerinde membrana doğru hareket edip membrana bağlanırlar (12). ROCK II hücre hareketinde, stress filament ve vimentin aracılıklı filament ağının oluşumu sırasında kesilme girintilerinde (*cleavage furrows*) bulunurken, ROCK I'in sentrozomlarla birlikte buldukları gösterilmiştir (22).

Rock'un Substratları

Serin-treonin kinaz etkinliği olan ROCK I ve ROCK II çeşitli proteinlerin fosforilasyonuna neden olur. Fosforilasyon R/KXS/T veya R/KXXS/T amino asit sekanslarından gerçekleşmektedir (R, arjinin; K, lizin; S, serin; T, treonin; X, herhangi bir amino asit) (23). Ayrıca ROCK'ler kendi kendilerini de fosforile ederek işlevlerini düzenleyebilirler (2).

Yirmiden çok ROCK substratı tanımlanmıştır ve birçok substrat için ROCK'nin yalnızca bir izoformu (genelde ROCK II) test edilmiştir (22). Katalitik bölgelerinden %92 benzerlik gösteren ROCK I ve ROCK II'nin aynı substratları fosforillemediği düşünülmektedir. Ancak yalnızca ROCK I, Rho E'ye bağlanıp onu fosforillemediği için başka hedefleri de bulunabilir (24).

ROCK'nin ilk belirlenen substratları MLC ve miyozin hafif zincir fosfatının miyozin bağlı alt birimidir (MYPT1) (25). ROCK tarafından fosforillenen MLC etkin olurken, MYPT1 inaktifleşmektedir. Bu biçimde doğrudan ya da dolaylı olarak artmış MLC fosforilasyonu sonucu aktomyozin bağlanması tetiklenerek hücre kasılması gerçekleşir (26).

Rho/Rho kinaz yolağının agonistlerle indüklenen ve kalsiyum duyarlılığını artırarak düz kas kasılmasına neden olması, miyozin fosfataz etkinliğinin inhibisyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir (16). Agonist aracılıklı kasılmanın yanında sıçan renal arterinde özgül bir sodyum pompası inhibitörü olan ve memelilerde endojen olarak bulunan uvabainin neden olduğu kasılmalarda da ROCK'nin rolü olduğu gösterilmiştir (27).

Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde MLC ve MYPT1'den başka etkili olan ROCK substratları da vardır. Bunlar CPI-17, kalponin, LIM kinazlar, ezrin/radiksin/moesin (ERM), adusin, sodyum-hidrojen değiş tokuşucusu (NHE1) ve ZIP kinazdır (9).

Diğer taraftan hücre ölüm ve canlılığında önemli role sahip olan birçok ROCK substratı da bulunmaktadır. Bunlardan yeni tanımlanan fosfatase ve tensin-homoloğu (PTEN), ROCK tarafından fosforillenen bir başka substrattır (28). Fosforilasyon sonucu PTEN'nin fosfatase etkinliği artmaktadır. PTEN, proteinleri ve fosfoinositleri defosforile etmesi dışında antiapoptotik etkili olan fosfatidilinozitol (PI)-3 kinaz/Akt yolağının da negatif düzenleyicisidir. PTEN'nin apoptoz dışında hücre adezyonu, migrasyonu ve farklılaşmasında etkili olduğu bilinmektedir.

Gözlenen Morfolojik

Değişikliklerin Düzenmesinde Rock'un Rolü

ROCK, apoptozun işlem fazında gerçekleşen hücre kasılması, membran tomurcuk oluşumu, çekirdek parçalanması ve apoptotik hücrelerin apoptotik cisimciklere bölünmesi gibi morfolojik olayların düzenlenmesinde etkilidir.

Membran Tomurcuk Oluşumu

Apoptoz, salıverilme, tomurcuklanma ve yoğunlaşma olmak üzere üç aşamada gerçekleşir (7). Bu aşamalardan olan apoptotik membran tomurcuk oluşumu, MLC fosforilasyonu ve aktin ile miyozin II'nin etkileşmesi sonucu hücre kasılması ile düzenlenir (29). MLC fosforilasyonunun membran tomurcuk oluşumunda önemli bir basamak olduğu, tomurcuklu hücrelerde MLC fosforilasyonundaki artış ve STS, KT5926, ML-9 ve ML-7 gibi MLCK (*myosin light chain kinase*) inhibitörleri kullanılması sonucu azalan tomurcuk sayısı ile gösterilmiştir (29). Ayrıca küçük G proteini olan Rho'nun da MLC fosforilasyonunu artırmasından dolayı apoptotik membran tomurcuklanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (29). Ancak yapılan son çalışmalar Rho A aktivasyonunun apoptotik kasılma ve membran tomurcuk oluşum mekanizmasından sorumlu olmadığını göstermiştir. Rho'nun *Clostridium botulinum*'dan elde edilen C3 toksini ile inhibe edilmesi sonucu membran tomurcuk oluşumunu veya MLC fosforilasyonunu inhibe etmediği görülmüştür (3,4).

Rho/Rho kinaz yolağının aktin hücre iskelet yapısının düzenlenmesine aracılık ettiği bilindiğinden, apoptotik morfolojik değişimlerde etkili olabileceği düşünülmüştür. Membran tomurcuk oluşumunun ve apoptotik hücrelerin düzenlenmesinde kaspaz 3 aracılıklı ROCK I kesilmesi ve aktivasyonunun rolü, ilk kez anti-Fas antikoru uygulanmış jurkat hücrelerinde ve TNF α -uygulanmış NIH3T3 fibroblastlarında gösterilmiştir (3,4). Apoptotik ölüm boyunca kaspaz 3 tarafından C terminal inhibitör bölgesinin kesilmesi sonucu aktif formuna dönüşen ROCK I'in, MLC fosforilasyonunu artırması sonucu membran tomurcuk oluşumunda etkili olduğu saptanmıştır (3,4) (Şekil 2).

TNF α - ve anti-Fas antikoru ile hücre ölümünün indüklendiği hücrelerde, ROCK I aktivasyonu geç fazda gerçekleştiğinden, ROCK inhibisyonu apoptotik süreci engellememektedir (3,4).

Bazı apoptotik durumlarda, Rho'ya bağımlı ve kaspazdan bağımsız ROCK aktivasyonu ile de membran tomurcuk oluşumu gerçekleşebilir (21). Bu süreçte hem ROCK I hem de ROCK II etkili olabilmektedir.

Kaspaz 3 aracılıklı ROCK I aktivasyonu, apoptotik tomurcuk oluşumunda büyük bir öneme sahiptir. ROCK I'in yanı sıra Rho tarafından etkinleşen ve MLC fosforilasyonunda düzenleyici olan ROCK II de bu süreçte etkili olabilmektedir. Sitotoksik lenfosit granüllerinin indüklediği apoptozda, yalnızca ROCK II granzim B aracılıklı kesilme ile aktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen ROCK II kaspaz 3 aktivasyonundan bağımsız olarak membran tomurcuk oluşumunu indüklemektedir (5).

Apoptotik Hücre Parçalanması

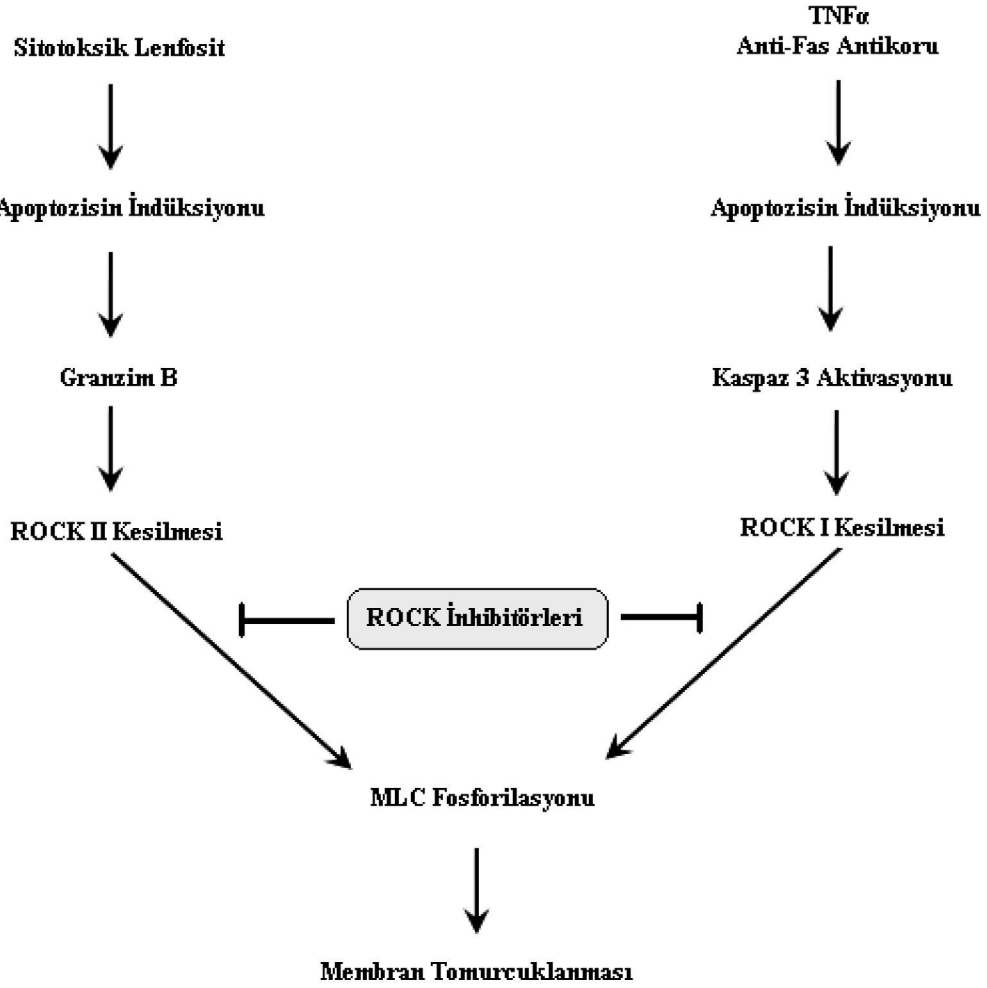
ROCK'nin membran tomurcuk oluşumunda etkili olduğu bilindiğinden, apoptozun işlem fazında gerçekleşen hücre parçalanmasında da rolü olabileceği düşünülmüştür. ROCK aktivasyonu ve MLC fosforilasyonu, parçalara ayrılmış DNA'nın apoptotik cisimcikler içine yerleşmesinde etkili olduğu kadar (3), NIH3T3 hücrelerinde apoptoza bağlı çekirdek parçalanmasında da görevlidir (30).

COS-7 hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada, apoptozda görülen apoptotik cisimciklerin oluşumunun, ROCK inhibitörleri (Y-27632 veya H-1152) ile önlediği belirlenmiştir (31). Latrunculin B ve blebbistatin gibi aktin ile miyozinin aracılık ettiği kasılmayı önleyen maddeler, hücrelerin parçalanmasını önlediği için ROCK I'in de bu olaydaki rolünün aktin ile miyozinin aracılık ettiği kasılması aracılığı ile oluştuğu düşünülmektedir (32).

Yalnız Y27632 varlığında ölen Jurkat hücreleri, inhibitör yoksunluğunda ölen hücrelerle aynı etkinlikte makrofajlar tarafından fagosite edildiğinden, ölü hücrelerin fagositoz için hazırlanmasında ROCK'nin öneminin hücre türüne ve/veya apoptotik uyarana göre değişmekte olduğu görülmüştür (31).

ROCK etkinliğinin inhibisyonu, parçalara ayrılmış DNA'nın membran tomurcuk ve apoptotik cisimcik içine yerleşimini de engellemiştir³.

Bütün bu bulgular, ROCK'nin apoptotik hücrelerin parçalanmasında önemli role sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. Apoptozda ROCK (Rho kinaz) I ve II'nin farklı şekillerdeki aktivasyonu ve buna bağlı apoptotik membran tomurcuklanmasının oluşumu.

Apoptotik Hücrelerin Fagositozu

Apoptoz sonunda hücre, kendini küçük apoptotik cisimciklere paketler. Böylece hücre içeriği dışarı çıkmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından bu cisimcikler fagosite edilebilir. Apoptotik cisimciklerin ortamdaki uzaklaştırılması sayesinde hücreler, hücre içeriğinin dışarı çıkmasından dolayı oluşacak yangından korunmuş olur. Bu yüzden apoptotik cisimciklerin temizlenmesi organizmalar için önemlidir.

Apoptozun işlem fazında hücreler fagosite edilmek üzere bir dizi değişimlerden geçerler. Ölen hücreler küçülür, apoptotik cisimciklere parçalanır ve hücre membranında fagositik belirteçlerin ekspresyonu gerçekleşir. Apoptotik PC12 hücrelerinde yapılan çalışmada, işlem fazında kaspazlar tarafından etkinleşen ROCK I'in fagositik belirteç olan GlcNAc ekspresyonunda etkili olduğu görülmüştür.

Yine aynı çalışmada Y27632 ile gerçekleştirilen ROCK inhibisyonu, fagositozun etkinliğini azaltmıştır (33).

Apoptotik hücrelerin temizlenmesinde aktin hücre iskeleti düzenlenmesi üzerinde rolü olan Rho ve ROCK'nin etkili olduğunu göstermiştir (34,35). Rho A ve ROCK'nin aktivasyonu kompleman reseptör (CR)-aracılıklı fagositozda etkilidir (34,35). Apoptotik hücrelerin yutulması sırasında Rho etkinliğinde azalma görülmüştür (35). Rho aracılıklı sinyalleme inhibisyonu da apoptotik hücrelerin yutulmasını güçlendirdiği için Rho'nun bazal fagositozu önlediği bilinmektedir. Yutulma üzerinde bu inhibitör etkinin birinci sorumlusu ROCK olarak gösterilmektedir (34).

Apoptotik hücrelerin makrofajlar veya fibroblastlar tarafından temizlenmesi, fagozomların hızlı bir biçimde olgunlaşmasına bağlıdır. Bu olgunlaşmanın da

Rho/ROCK/ERM sinyalleme yolağına bağılı olduğu gösterilmiştir (34).

Patofizyolojik Durumlarda Rock

ROCK'nin, hücre hareketi ve adezyonu, düz kas kasılması, fagositoz gibi aktin ile miyozininin aracılık ettiği birçok hücreyel olayda etkili olmasının yanısıra, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozda da rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle ROCK'nin, apoptozdaki rolünün aydınlatılması etiyojisi tam olarak bilinmeyen birçok hastalığın tedavisinde yol gösterici olabilir.

Bu hastalıklardan biri olan preeklampside, hastaların plasentalarındaki sinsitiyotrofoblast hücrelerinde apoptozun arttığı bilinmektedir. Artmış sinsitiyotrofoblast apoptozunun da bu hücrelerdeki mikrovilüslerin dökülmesini arttırdığı düşünülmektedir. Ark ve ark. (36) yaptıkları bir çalışmada, preeklampstik gebelerin plasentalarında ROCK II ekspresyon ve aktivasyonunda artış olduğunu göstermişlerdir. ROCK'nin apoptozda oluşan morfolojik değişimlere neden olduğu bilindiğinden, ROCK II ekspresyonlarındaki bu artışın plasental apoptozise aracılık edebileceği ve mikrovilüs dökülmesindeki artışın nedeni olabileceği vurgulanmıştır.

Çeşitli kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda da apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir. Örneğin kaspaz 3 aktivasyonunu içeren apoptotik yolların kalp yetersizliğine eşlik ettiği bilinmektedir. Bu yüzden aktif kaspaz 3 substratlarından olan ROCK'nin kalp yetersizliği patojenezinde rolü olduğu düşünülmektedir. Miyokardiyal ROCK I'in, kalp yetersizliği olan hastalarda ve genetik kardiyomyopati fare modellerinde kaspaz 3 tarafından kesilip etkinleştiği gösterilmiştir (37).

Kalp yetmezliği dışında, iskemi/reperfüzyon sırasında gerçekleşen apoptozda da Rho kinaz aktivasyonu rol almaktadır. Antiapoptotik etkinliğe sahip fosfotidilinozitol 3-kinaz/Akt yolağının negatif düzenleyicisi olan ROCK'nin inhibisyonunun, iskemi/reperfüzyon'un indüklediği apoptozda koruyucu etkisi insan umbilikal ven endotel hücrelerinde araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, endotel hücrelerindeki apoptozun, Y27632 ile gerçekleştirilen ROCK inhibisyonu sonucu azalma olduğu görülmüştür (38).

Rho/Rho kinaz yolağının aktivasyonunun iskemi/reperfüzyonun neden olduğu apoptozla eşlik ettiği başka çalışmalar da vardır. Del Re ve ark. (39) yaptığı çalışmada, Rho A aktivasyonunun ROCK aracılığı ile mitokondride proapoptotik etkili olan toplam ve aktif Bax düzeyini artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

ROCK aktivasyonunun apoptotik mekanizmalarda önemli rolü sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiş olmasına karşın, ROCK inhibitörü olan Y27632'nin de proapoptotik etkiler oluşturduğu görülmüştür. İnsan bronkiyal epitel hücrelerinde ise Y27632'nin aktin filament bütünlüğünde değişikliğe neden olarak apoptozu indüklediği görülmüştür (40).

Yukarıda gözden geçirilmiş olan çalışmalar, ROCK'ye bağımlı sinyalleme yolağının apoptozda oluşan morfolojik değişimlerde önemli role sahip olduğunu göstermektedir. Ancak ROCK aracılıklı gelişen olayların mekanizması yapılan çok sayıda araştırmaya karşın tam olarak aydınlatılamamıştır. ROCK'nin apoptozdaki rolünün moleküler düzeyde anlaşılması, bu olgunun yer aldığı birçok patofizyolojik durumda yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 1995;270:29051-4.
2. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTPbinding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 1996;15:1885-93.
3. Coleman M L, Sahai E A, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001;3:339-45.
4. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001;3:346-52.
5. Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Breard J. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med* 2005;201:465-71.
6. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
7. Mills JC., Stone NL., Pittman RN. Extranuclear Apoptosis: The Role of the Cytoplasm in the Execution Phase. *J Cell Biol* 1999;146:703-7.
8. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219.
9. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp* 2007;55:61-75.
10. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001;81:153-208.
11. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* 2004;15:43-9.

12. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 1996;15:2208–16.
13. Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem* 1999;274:32418–24.
14. Fujisawa K, Fujita A, Ishizaki T, Saito Y, Narumiya S. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:23022–8.
15. Feng J, Ito M, Kureishi Y, Ichikawa K, Amano M, Isaka N, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem* 1999;274:3744–52.
16. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel Messenger for Rhokinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase. *Circ Res* 2002;91:112–9.
17. Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 2006;108:1868–76.
18. Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, Kelly K. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of Rho/Rho kinase pathway. *J Cell Biol* 2002;157:291–302.
19. Riento K, Guash RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RHO E binds to ROCK I and inhibits down stream signalling. *Moll Cell Biol* 2003;23:4219–29
20. Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA, Bossemeyer D. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y 27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity. *Structure* 2003;11:1595–607.
21. Minambres R, Guasch R M, Perez-Arago A, Guerri C. The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci* 2006;119:271–82.
22. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:446–56.
23. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 1999;147:1023–38.
24. Riento K., Totty N., Villalonga P., Garg R., Guasch R.,Ridley A. J. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *EMBO J* 2005;24:1170–80.
25. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rhoassociated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 1996;271:20246–9.
26. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997;275:1308–11.
27. Ark M , Kubat H, Beydağı H, Ergenoğlu T , Songu-Mize E. Involvement of rho kinase in the ouabain-induced contractions of the rat renal arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:417–21.
28. Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, Tang L, Hla T, Zeng R, Li L, Wu D. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* 2005;7:399–404.
29. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 1998;140:627–36.
30. Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart C L, Olson MF. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol* 2005;168:245–55.
31. Shiratsuchi A. Mori T, Nakanishi Y. Independence of plasma membrane blebbing from other biochemical and biological characteristics of apoptotic cells. *J Biochem* 2002;132:381–6.
32. Orlando KE, Stoneb NL, Pittman RN. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 2006;312:5 – 15.
33. Orlando KA, Pittman RN. Rho kinase regulates phagocytosis, surface expression of GlcNAc, and Golgi fragmentation of apoptotic PC12 cells. *Exp Cell Res* 2006;312:3298–311.
34. Erwig LP, McPhillips KA, Wynes MW, Ivetic A, Ridley AJ, Henson PM. Differential regulation of phagosome maturation in macrophages and dendritic cells mediated by Rho GTPases and ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:12825–30.
35. Tosello-Trampont AC, Nakada-Tsukui K, Ravichandran KS. Engulfment of apoptotic cells is negatively regulated by Rho-mediated signaling. *J Biol Chem* 2003;278:49911–9.
36. Ark M, Yılmaz N, Yazici G, Kubat H, Aktaş S. Rho-associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preclamtptic human placentas. *Placenta* 2005;26:81–4.

37. Chang J, Xie M, Shah VR, Schneider MD, Entman ML, Wei L, Schwartz RJ. Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:14495-500.
38. van der Heijden M, Versteilen AM, Sipkema P, van Nieuw Amerongen GP, Musters RJ, Groeneveld AB. Rho-kinase-dependent F-actin rearrangement is involved in the inhibition of PI3-kinase/Akt during ischemia-reperfusion-induced endothelial cell apoptosis. *Apoptosis* 2008;13:404-12.
39. Del Re DP, Miyamoto S, Brown JH. RhoA/Rho kinase up-regulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:8069-78.
40. Moore M, Marroquin BA, Gugliotta W, Tse R, White SR. Rho kinase inhibition initiates apoptosis in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:379-87.