

Uvabain Aracılıklı Apoptotik Hücre Ölümleri Ve Rho-Kinaz: Bir Proteomik Çalışma

Ouabain-Induced Apoptotic Cell Death and Rho Kinase: A Proteomics Study

Emrah BAYRAM¹, Aysun ÖZDEMİR¹, Ayla CİHAN¹, Duygu ÖZEL DEMİRALP², Belgin POLAT³,
Mustafa ARK¹

¹Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

²Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

³Zekai Tahir Burak Kadın Doğum Hastanesi

Özet

Amaç: Bu çalışmada, uvabain ile indüklenmiş apoptotik hücre ölümlerinde, Rho-kinazın olası rolünün proteomik yaklaşımlar kullanılarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri, 10 µM uvabain, 10 µM Y27632 (uvabain uygulamasından 30 dk önce)+10 µM uvabain ve yalnız 10 µM Y27632'ye maruz bırakılmıştır. Hücre homojenatları, iki boyutlu jel elektroforezi ile ayrılmış ve Coomassie mavisi ile boyanmıştır.

Bulgular: Uvabain uygulaması sonucunda, 54 spotun değiştiği tespit edilmiştir. Uvabain + Y27632 uygulamasında değiştiği gözlenen 7 protein, MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmak üzere seçilmiştir. Kaspaz-7 ve protein-unc-119 homolog B proteinlerinin miktarları uvabain uygulaması ile artmış (p<0.05) ve bu artış Y27632 ön uygulaması ile azalmıştır(p<0.05). Buna ek olarak nörens-2, C-type lektin domain family-2 member D ve putative FERM domain-containing protein FKSG-43 proteinleri uvabain uygulaması ile azalmış (p<0.05) ve bu azalış Y27632 ön uygulaması ile artmıştır (p<0.05).

Sonuç: Bu sonuçlar, bu proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler üzerinde Rho-kinaz yolunun önemini göstermektedir. Kaspaz-7, protein unc-119 homolog B, nörens-2 ve C-tipi lektin bölgesi ailesi-2 üyesi D proteinleri sırasıyla, apoptoz, nörotransmitter salınımı, tümör süpresyonu ve osteoklast oluşumunun inhibisyonunda yer almaktadırlar. Bununla birlikte sonuçlarımızın doğrulanması ve bu proteinlerin öneminin belirlenmesi için daha başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: uvabain, Rho-kinaz, proteomik, apoptoz, sodyum pompası.

Abstract

Objective: In the current work, we aimed to evaluate the possible involvement of Rho kinase in the ouabain-induced apoptotic cell death, using a proteomic approach.

Method: Human umbilical vein endothelial cells were exposed to 10 µM ouabain, 10 µM Y27632 (30 min before the ouabain treatment)+10 µM ouabain, and 10 µM Y27632 alone. Cell homogenates were separated by 2D gel electrophoresis and stained with Coomassie blue.

Results: It was detected that 54 spots were changed with the ouabain treatment. Seven spots, changed with ouabain plus Y27632 treatment, were excised and subjected to MALDI-TOF MS to identify the proteins of interest. The levels of caspase-7 and protein unc-119 homolog B proteins increased with ouabain treatment (p<0.05) and this increase has decreased by the pretreatment with Y27632 (p<0.05). In addition, the levels of neurensin-2, C-type lectin domain family-2 member D and putative FERM domain-containing protein FKSG43 proteins were decreased with ouabain treatment (p<0.05). This decrease has increased by the pretreatment with Y27632 (p<0.05).

Conclusion: These results indicate that Rho kinase pathway may involve in the changes of expression of these proteins. Caspase-7, protein unc-119 homolog B, neurensin-2 and C-type lectin domain family-2 member D proteins are involved in apoptosis, neurotransmitter release, tumor suppression and the inhibition of osteoclast formation, respectively. However, further studies are needed to confirm our results and to determine the importance of these proteins.

Key words: ouabain, Rho-kinase, proteomics, apoptosis, sodium pump.

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2010;3 (1):30-38
Geliş Tarihi :19.07.2010
Kabul Tarihi : 18.08.2010

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 ve Amaç

Na^+ / K^+ ATPaz (NKA) hücre içi elektrolit ve sıvı dengesini sağlayan ve hücre için gerekli olan glukoz ve birçok değişik bileşiğin hücre içine girmesini kolaylaştıran bir membran proteindir (1-3). NKA, uzun yıllardır kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan kardiyak glikozitler için bilinen tek membran reseptörüdür. Kardiyak glikozitlerin farmakolojik etkisinde, bu proteine bağlanarak onu inhibe etmeleri yatmaktadır. Bir kardiyak glikozit olan uvabainin, NKA'ya bağlanarak enzimin iyon pompalamasını inhibe etmesi dışında küçük dozlarda da enzimin kısmi inhibisyonuna neden olarak çeşitli hücre içi sinyal mekanizmalarını etkinleştirdiği gösterilmiştir (4).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, uvabain ve benzeri kardiyak glikozitlerin memelilerde endojen olarak bulunduğunu göstermiştir (5,6). Uvabain ve benzeri kardiyak glikozitlerin endojen olarak bulunduğunun belirlenmesinden sonra bu maddelerin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolünün aydınlatılması için çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Artmış endojen uvabain düzeylerinin esansiyel hipertansiyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur (7,8). Rodentlere kronik uvabain uygulanması ise bu hayvanlarda hipertansiyon gelişimine aracılık etmektedir (8). Öte yandan uvabainin endotel hücresi ve bazı kanser hücre dizilerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (9,10). Ancak bu olayların mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

Hücre içi birçok sinyalleme mekanizmasına aracılık eden küçük G proteini Rho'nun memelilerde en az 10 üyesi bulunmaktadır (11). Rho-kinazlar (ROCK), küçük G proteini olan Rho-A'nın en iyi tanımlanmış efektörlerinden birisidir (12). Rho-kinazın ROCK1 ve ROCK2 olarak adlandırılan 2 izoformu bulunmaktadır (11,12). Rho-kinazların birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynadıkları gösterilmiştir. Düz kas kasılması, sekretuar etkinliklerin ve endotel hücre geçirgenliğinin düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylar ile hipertansiyon, preeklampsi ve kanser gibi çeşitli patolojiler, bu enzimlerin yer aldığı olaylar arasında sayılabilir (13,14).

Yukarıda belirtildiği gibi uvabain ve Rho-kinazların rol oynadığı birçok patolojik olay birbirleri ile örtüşmektedir. Dolayısıyla uvabain aracılıklı bu patolojilerde, bu maddenin etkisine Rho-kinaz enziminin aracılık etmesi olasıdır. Bu çalışmada endotel hücreleri kronik olarak uvabaine ve Rho-kinaz inhibitörü olan Y27632'ye maruz bırakılmış ve toplam protein ekspresyonları ile Rho-kinaz

inhibisyonu arasındaki olası ilişki proteomik yöntemler ile belirlenmeye çalışılmıştır.

Yöntem

Endotel Hücre Kültürü

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC), insan umbilikal kord veninden izole edildi ve %10 fetal sıgır serumu, 1 M HEPES, %7.5 w/v $NaHCO_3$ ve 100U/ml penisilin, 1g/ml streptomisin içeren M199 ile flasklarda kültüre edildi (15). Dokudan izole edilen endotel hücreleri kabın yüzeyini %100 kapladıktan sonra deneye alındı. Kontrol, 16 saat boyunca 10 μ M uvabain uygulanan grup, uvabain uygulama öncesi 30dk 10 μ M Y27632 uygulanan grup ve yalnız 10 μ M Y27632 uygulanan grup olmak üzere 4 grupta çalışıldı. İnkübasyon sonrası iki boyutlu jel elektroforezi ile proteomik analiz yapıldı (n=3-4).

Faz Kontrast Mikroskopisi

T-25 flasklara ekilen hücrelere yüzeyi tamamen kapladıktan sonra ilaç uygulandı ve faz kontrast mikroskopu ile hücrelerin, ilaç inkübasyon süresinden sonra en az üç değişik alanda fotoğrafları çekildi. Daha sonra bu fotoğraflar üzerinde hücrelerin morfolojileri değerlendirildi.

Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Uvabain ve Y27632 uygulanan hücreler flasktan besiyeri ile kazındı ve içerik 2 ml'lik tüplere alınarak ve 400 xg'de, +4 °C'de, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet, 8 M üre, %2 chaps, %0.5 ZOOM Carrier Ampholyte ve proteaz inhibitör kokteyli içeren rehidratasyon tamponunda homojenize edildi. İçerik 10000 xg'de 10 dakika +4 °C 'de santrifüj edilip, daha sonra süpernatantlar alınarak -20 °C'de saklandı. Deneyden önce homojenatlarda bisikoninik asit (BCA) yöntemi kullanılarak protein miktar tayini yapıldı.

İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)

-20 °C'de saklanan örnekler, eşit miktarlarda protein içerecek biçimde rehidratasyon tamponu ile karıştırılarak ZOOM IPGRRunner Kaset (Invitrogen, ZM003, USA)'lere yüklendi. Kasetlerin içerisine ZOOM pH 3-10 doğrusal olmayan şeritler (Invitrogen, ZM0011, USA) yerleştirilip, çukurların üzeri etiketlenerek hava almayacak biçimde kapatıldı. Gece boyunca oda sıcaklığında rehidratasyona bırakılan kasetler tanka yerleştirilip, izoelektrik odaklama (IEF) uygulandı. IEF için, 200 V 20 dakika, 450 V 15 dakika, 750 V 15 dakika ve 2000 V 30 dakika basamakları uygulandı. IEF uygulanmış stripler daha sonra SDS jel elektroforezi için SDS örnek tamponu içinde 15 dakika dengelendi ve NuPAGE %4-12 Bis-Tris jellerin üzerine yerleştirilerek 190mA'de 1 saat elektroforez uygulandı. Bu süreden sonra çıkartılan jeller coomassie mavisi (Invitrogen Simple Blue Safestain) ile boyandı. Boyama işleminden sonra jeller sodyum azitli çözelti içine alınarak +4 °C'de muhafaza edildi.

MALDI-TOF (Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu) ve Veritabanı Oluşturma

Sodyum azitli çözelti içerisinde saklanan jellerin Versa-Doc görüntüleme sistemi (BioRad, 170-8640, UK) yardımı ile görüntüleri alınarak bu görüntüler PDQuest (PGQuest 8.0.1, UK) programına aktarıldı ve analizleri yapıldı (16). Eşleştirme sonrasında belirlenen spotlar otomatik olarak kesilerek plaka içerisine alındı ve MALDI uygulaması için tripsinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler MALDI-TOF cihazının (Waters, Micromass MALDI micro, UK) plakalarına yüklenerek spektrumları kaydedildi. Okunan sonuçlar Mascot Veri Tabanı'ndaki (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) veriler ile karşılaştırılarak analiz edildi.

İstatistiksel Analiz

Hücre lizatlarındaki protein spotlarının yoğunluğunun karşılaştırılması için tek yönlü Varyans analizi (ANOVA) yapıldı. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Endotel Hücre Morfolojisi Üzerinde Uvabain'in Etkileri

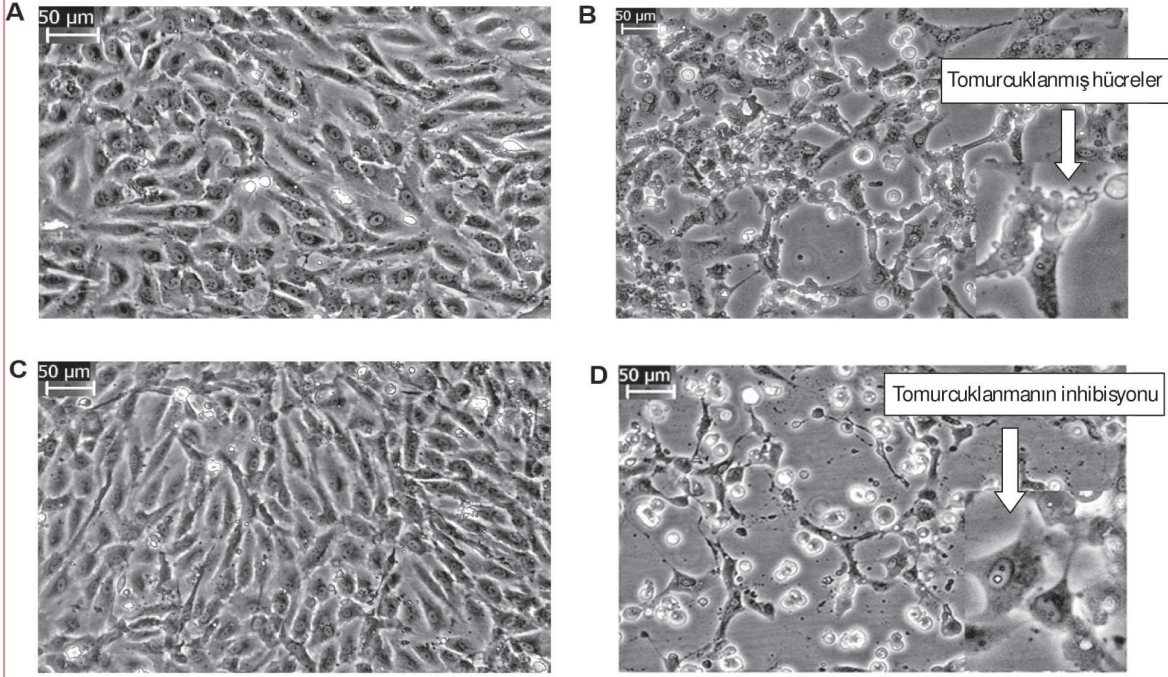
İnsan umbilikal ven endotel hücrelerine 16 saat süre ile 10 µM uvabain uygulanması, hücrelerin büyük bölümünün zeminden ayrılmasına ve apoptozun göstergelerinden biri olan tomurcuk oluşumuna neden oldu. Uvabain aracılıklı bu etkiler üzerinde ROCK'un olası etkilerini saptayabilmek için hücrelere spesifik bir ROCK inhibitörü olan 10 µM Y27632 uvabain uygulamasından 30 dakika önce uygulandı ve bu uygulama ile tomurcuk oluşumunu inhibe edildi. Bu durum, uvabainin neden olduğu tomurcuk oluşumunda ROCK'un etkili olduğunu düşündürdü. Endotel hücrelerine yalnızca Y27632 uygulanmasının hücre morfolojisinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (Şekil 1).

Uvabainin HUVEC Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri

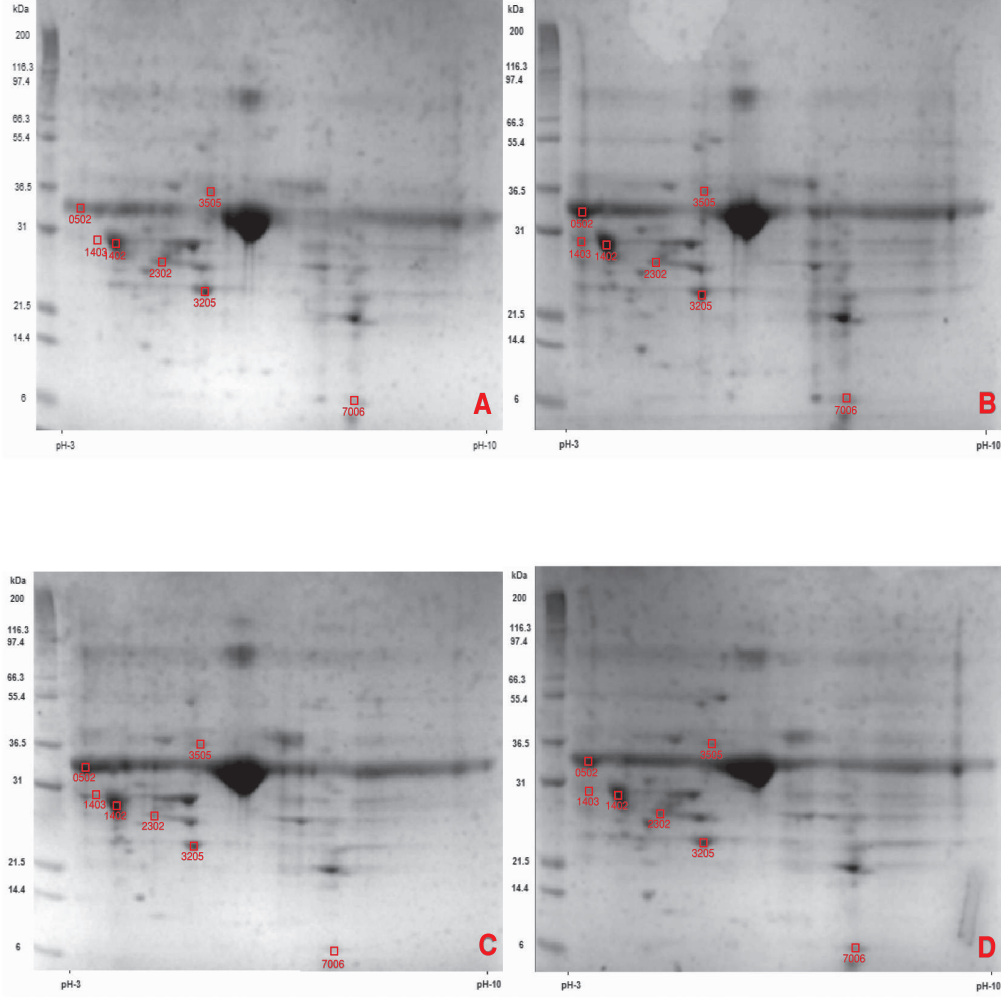
İnsan umbilikal ven endotel hücrelerine uvabain uygulamasının neden olduğu protein ekspresyonlarındaki olası değişikliklerin belirlenmesi için iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ve kütle spektrometresi (MALDI-TOF) yöntemleri uygulandı. Kontrol, 16 saat boyunca 10 µM uvabain uygulanan grup, uvabain uygulama öncesi 10 µM Y27632 uygulanan grup ve yalnız 10 µM Y27632 uygulanan grup olmak üzere 4 grupta çalışıldı.

Uvabain uygulaması sonucu iki boyutlu jel elektroforezinde PD-Quest programı yardımı ile 204 spot belirlendi. Bu spotların uygulama gruplarımız arasında eşleştirilmesi sonucu protein ekspresyonlarında artma ve azalma olduğu görüldü (Şekil 2). Eşleştirme sonrası kontrole göre, uvabain uygulamasında, 54 spotun ekspresyonlarının değiştiği tespit edildi. Yoğunluğu uvabain + Y27632 uygulamasında anlamlı olarak 1.5 kat artmış veya 0.25 kat azalmış olan 7 spot, MALDI-TOF MS'de tanımlanmak üzere seçildi. Saptanan bu spotların MALDI-TOF ile analizi yapıldı.

MALDI-TOF sonrasında elde edilen spektrumlar internet üzerinden Mascot veritabanı ile karşılaştırıldı ve Tablo 1'deki sonuçlar elde edildi. Sonuçlar olasılık yüzdelerine göre sıralandı. Bu sonuçlara göre bir nolu spotta saptanan "Kaspaz-7" protein ekspresyonu, uvabain uygulaması sonucu yaklaşık 2 kat arttı (Şekil 3). Y27632 ön uygulaması, protein ekspresyonundaki bu artışı engelledi ve yalnız Y27632 uygulaması ise herhangi bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 3). İki nolu spotta belirlenen "Glikoprotein 25L" protein ekspresyonu, uvabain uygulaması sonucu yaklaşık 0.25 kat azaldı (Şekil 3). Y27632 ön uygulaması ve yalnız Y27632 uygulaması ise uvabain uygulamasına göre protein ekspresyonunu azalttı (Şekil 3). Üç nolu spotta belirlenen "Protein unc-119 homolog B" protein ekspresyonu, uvabain uygulaması ile yüksek bir oranda arttı ve Y27632 ön uygulaması, bu artışı engelledi (Şekil 3). Yalnız Y27632 uygulaması sonucunda herhangi bir değişiklik görülmedi (Şekil 3). Dört nolu spotta belirlenen "Nörens-2" protein ekspresyonu, uvabain uygulaması sonucu 0.7 kat azaldı ve Y27632 ön uygulaması bu azalışı inhibe etti (Şekil 3). Yalnız Y27632 uygulaması sonucunda bu proteinin ekspresyonunda herhangi bir değişiklik görülmedi (Şekil 3). Beş nolu spotta saptanan "C-type lectin domain family 2 member D" protein ekspresyonu, uvabain uygulaması ile 0.25 kat azaldı ve Y27632 ön uygulaması ile bu artış engellendi (Şekil 3). Yalnız Y27632 uygulaması sonucunda herhangi bir değişiklik görülmedi (Şekil 3). Altı nolu spotta belirlenen "Putative FERM domain-containing protein FKSG43"un ekspresyonu, uvabain uygulaması ile 0.6 kat azaldı (Şekil 3). Y27632 ön uygulaması bu azalışı engelledi (Şekil 3). Yalnız Y27632 uygulaması bu proteinin ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadı. Yedi nolu spotta belirlenmiş olan "Sikline bağımlı kinazlar düzenleyici alt birim-2 (Cyclin-dependent kinases regulatory subunit-2)" ekspresyonu ise uvabain uygulaması ile 1.5 kat arttı (Şekil 3). Y27632 ön uygulaması, uvabain ile gözlenen bu artışın daha da yükselmesine neden oldu. Yalnız Y27632 uygulaması sonucu, bu proteinin ekspresyonunda azalma görüldü.



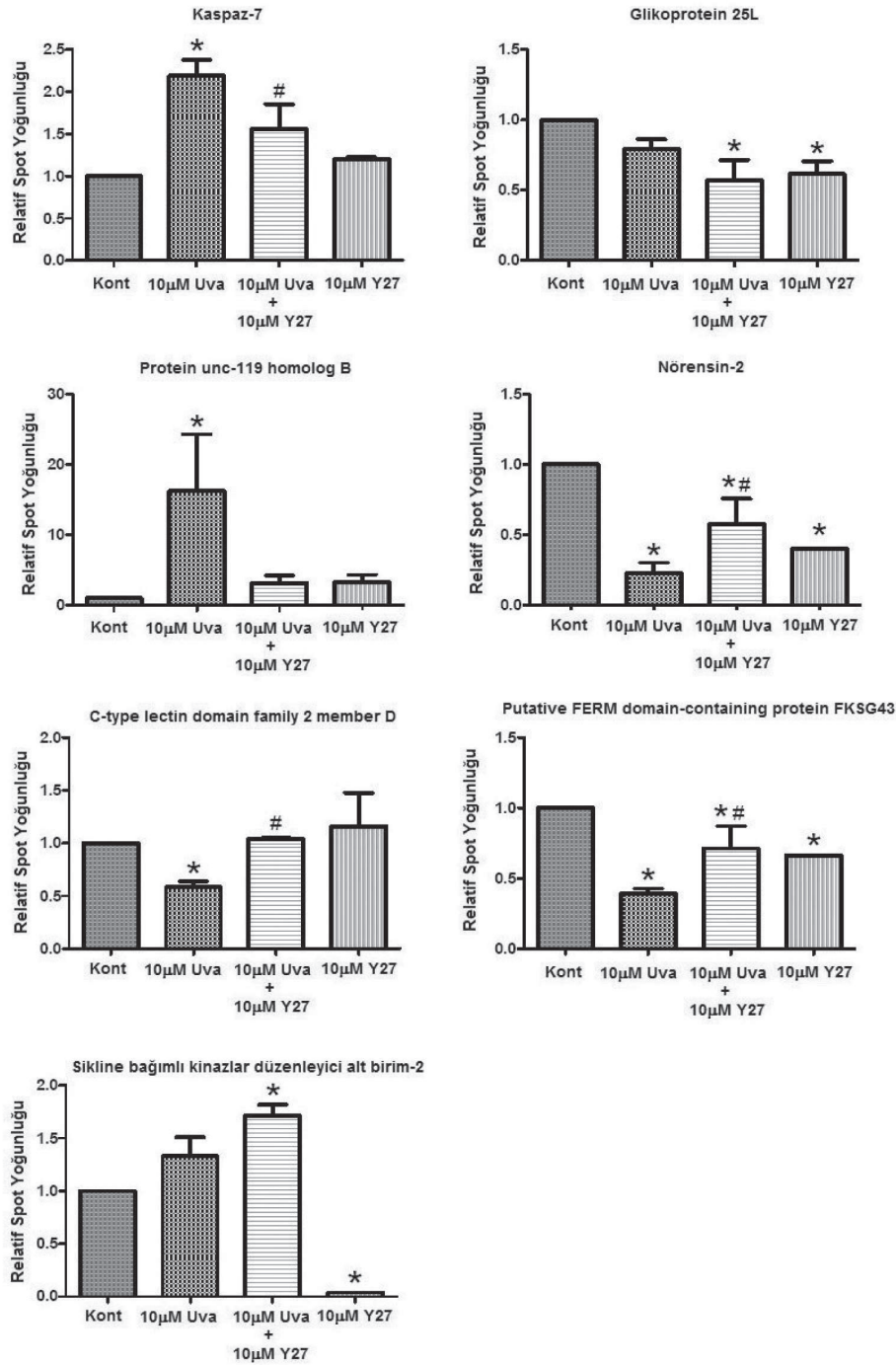
Şekil 1. İlaç uygulaması sonrası hücrelerin faz kontrast görüntüsü. A: kontrol, B: 10μM uvabain, C: 10μM Y27632, D: 10μM uvabain + 10μM Y27632 ön uygulama. 10μM uvabain uygulaması apoptotik membran tomurcuklanması oluştururken, 10μM Y27632 ön uygulaması ile bu etki inhibe olmuştur. 10μM Y27632 tek başına uygulandığında hücre morfolojisinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir (fotoğraflar X100 büyütme ile çekilmiştir).



Şekil 2. İki boyutlu jel elektroforezi uygulandıktan sonra elde edilen jellerin fotoğraf görüntüleri. Görüntülerde kırmızı ile işaretli olan 7 adet spot, uvabain uygulanmasından sonra, protein ekspresyonları 1.5 kat artmış veya 0.25 kat azalmış olduğu için analizleri yapılmak üzere seçilmişlerdir. A: kontrol, B: 10µM uvabain uygulaması, C: 10µM Y27632 uygulaması, D: 10µM uvabain + 10µM Y27632 uygulaması.

Tablo 1. Jellerden elde edilen spotlara ilişkin olası proteinler.

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



Şekil 3. Uygulamalar sonrası belirlenen 7 spottaki yoğunluk değişimi. * kontrol grubuna göre, # 10µM uvabain uygulanmış gruba göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir.(p<0.05)(Kont: Kontrol, 10µM Uva: 10µM Uvabain, 10µM Uva+10µM Y27: 10µM Uvabain+10µM Y27632, 10µM Y27: 10µM Y27632)

Tartışma ve Sonuç

Hücre içi iyon dengesi ve hücre hacminin düzenlenmesinden sorumlu olan Na^+/K^+ -ATPaz'ın son yıllarda bu özelliklerinin yanı sıra değişik bazı fizyolojik ve patolojik olaylarda da yer aldığı gösterilmiştir. Bunlar arasında hücre içi sinyal iletilişinin oluşumuna aracılık etme ve hücre-hücre bağlantı bölgelerindeki hücreler arası temasın sağlanması da yer almaktadır (4). Na^+/K^+ -ATPaz'ın aracılık ettiği bu işlevlerin büyük bir kısmına, insanda dahil olmak üzere, memelilerde endojen olarak sentezlendiği gösterilmiş olan uvabain aracılık etmektedir (4).

Uvabain, yüksek afinite ile Na^+/K^+ -ATPaz'a bağlanmakta ve bu enzimin rol oynadığı birçok olayın düzenlenmesine aracılık etmektedir. Ancak uvabainin bu etkisinin doz ve uygulandığı hücre türüne bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir (2).

Uvabain ve başka bazı kardiyak glikozitler, uzun yıllardan beri konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılan bir ilaç grubunu oluşturmaktadırlar. Bu ilaçlarla tedavi sırasında uvabain ve benzeri kardiyak glikozitlere maruz kalan ilk hücre türünü endotel hücreleri oluşturmaktadır. Uvabainin endotel hücrelerindeki etkinliği derişime bağlıdır: Düşük derişimlerde endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyandırırken, yüksek derişimlerde bu hücrelerde apoptotik hücre ölümlerine neden olmaktadır (17). Uvabainin bu etkisinde birçok sinyalleme yolağının rolüne ilişkin çalışmalar yapılmış olmasına karşın bu olayın mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Öte yandan küçük G proteinlerinden olan Rho ve onun en çok çalışılan efektörü Rho-kinazların da birçok hücre türünde gözlenen apoptotik olaylarda önemli işlevlere sahip olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada uvabainin indüklediği apoptotik hücre ölümlerine bağlı olarak gözlemlenen hücre protein ekspresyonlarındaki değişiklikler ile Rho kinaz enzimi arasında herhangi bir ilişkinin bulunup bulunmadığı proteomik yöntemler kullanılarak belirlenmeye çalışıldı.

Yapılan çalışmalar sonucunda normal endotel hücrelerinde 204 adet spot belirlendi. Bu spotların 54 tanesinin uvabain uygulaması ile değiştiği gözlemlenmiştir. Bu 54 spottan 7 tanesinin yoğunluğunun selektif bir Rho-kinaz inhibitörü olan Y27632 ön uygulaması ile değiştirildiği saptanmıştır. Daha sonra bu 7 spot MALDI-TOF MS ile analiz edildiğinde en yüksek olasılıklı proteinlerin kaspaz-7, glikoprotein 25L, protein unc-119 homolog B, nörens-2, *C-type lectin domain family 2 member D*, putative FERM domain-containing protein FKSG43 ve sikline bağımlı kinazlar düzenleyici alt birim-2 oldukları belirlenmiştir. Bu spotlardan kaspaz-7 ve protein-unc-119 homolog B proteinlerinin miktarları, uvabain uygulaması ile artmış, Y27632 ön uygulaması ile azalmıştır. Buna ek olarak nörens-2, *C-type lectin domain family-2 member D* ve putative FERM domain-containing protein FKSG-43 proteinlerinin miktarları, uvabain uygulaması ile azalmış ve Y27632 uygulaması ile artmıştır.

Qiu ve ark. (18) insan umbilikal ven endotel hücrelerinde uvabainin neden olduğu apoptozda protein ekspresyon değişikliklerini değerlendirmişlerdir. Ancak bu araştırmacılar, uvabainin neden olduğu protein

ekspresyonlarındaki değişiklikler üzerinde hangi yolların etkili olabileceğini araştırmamışlardır (18). Bulgularımız bu olayların en azından bazılarında Rho-kinaz enziminin rolüne işaret etmektedir.

Çalışmamız sonucunda belirlediğimiz bu 7 spota ilişkin proteinlerin gerçekten de sözü edilen proteinler olup olmadığının kesinleştirilmesi için Western blot ve RT-PCR gibi alternatif yöntemler kullanılarak doğrulanması gerekmektedir. Öte yandan belirlenen bu proteinlerin hücre işlevlerinin ne olduğunun ve uvabain ile indüklenen apoptozun nedeni mi yoksa sonucu mu olarak ortaya çıktıklarının belirlenebilmesi için yeni çalışmalara gerek vardır. Bu soruların yanıtlanması hem kardiyak glikozitlerin toksisitelerinin hem de antikanser etkinliklerinin mekanizmalarının ortaya çıkartılması açısından önem taşımaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (02/2009-22).

Kaynaklar

1. Skuo JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *J Am Soc Nephrol* 1957;23:394-401.
2. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na^+/K^+ -ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* 2007;261:44-52.
3. Skuo JC, Esmann M. The Na^+/K^+ -ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 1992;24:249-61.
4. Xie Z, Cai T. Na^+/K^+ -ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 2003;3:157-68.
5. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Haris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6259-63.
6. Ludens JH, Clark MA, DuCharme DW, Harris DW, Lutzke BS, Mandel F, Mathews WR, Sutter DM, Hamlyn JM. Purification of an endogenous digitalis-like factor from human plasma for structural analysis. *Hypertension* 1991;17:923-9.
7. Hamlyn JM, Lu ZR, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, Laredo J, Hamilton JP, Hamilton MJ, Hamilton BP. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin Exp Hypertens* 1998;20:523-33.
8. Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J Hypertens* 1994;12:549-60.

9. Khan MI, Chesney JA, Laber DA, Miller DM. Digitalis, a targeted therapy for cancer? *Am J Med Sci* 2009;5:355-9.
10. Ark M, Özdemir A, Polat B. Ouabain-induced apoptosis and rho kinase. A novel caspase-2 cleavage site and fragment of rock-2. *Apoptosis* 2010 (DOI: 10.1007/s10495-010-0529-1).
11. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001;81:153-208.
12. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420:629-35.
13. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001(1);22:32-9.
14. 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(2):417-21.
15. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2007;2:481-5.
16. Özel Demiralp D, Haznedaroğlu İC, Akar N. Functional proteomic analysis of Ankaferd® Blood Stoper *Turk J Hematol* 2010; 27: 70-7.
17. Yu SP. Na(+)/K(+)-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1601-9.
18. Qiu J, Gao HQ, Li BY, Shen L. Proteomics investigation of protein expression changes in ouabain induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biochem* 2008;104(3):1054-64.