

Primer vasküler düz kas hücrelerinde anjiyotensin II uyarımıyla p38 MAPK fosforilasyonunda AT1 reseptörü, Ras ve NAD(P)H oksidazın rolü

[The role of AT1 receptor, Ras and NAD(P)H oxidase on p38 MAPK phosphorylation by angiotensin II stimulation in primary cultured vascular smooth muscle cells]

Serkan Çağlar¹,
Arzu Çetin¹,
Fatih Uzuner¹,
Alper Tokay²,
Mustafa Kırça¹,
Akın Yeşilkaya¹

¹Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun Sağlık Yüksek Okulu, Samsun

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Prof. Dr. Akın Yeşilkaya

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya
Tel. (242) 2496894
E-posta. yesilkaya@akdeniz.edu.tr

Kayıt Tarihi : 24 Ocak 2012; Kabul Tarihi : 15 Ağustos 2012

[Registered: 24 January 2012; Accepted: 15 August 2012]

ÖZET

Amaç: Kültür ortamında bulunan vasküler düz kas (VDK) hücreleri, anjiyotensin II (Ang II) ile uyarılması sonrasında mitojenlerle aktifleşen protein kinazları (MAPK) aktive etmektedir. MAPK ailesi üy elerinden olan p38 MAPK, hem Ang II hem de reaktif oksijen türleri tarafından uyarılmaktadır. Bu çalışma VDK hücrelerinde, Ang II uyarımı sonrasında gözlenen p38 MAPK aktivasyonunun Ras üzerinden NAD(P)H oksidaz aktivasyonu sonrasında gerçekleştirdiğini ortaya koymayı amaçlamıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda, rat aortasından izole edilen primer VDK hücrelerinde, Ang II uyarımı ile p38 MAPK fosforilasyonu farklı inhibitörlerin varlığında western blot yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular: VDK hücrelerinde, optimum p38 MAPK fosforilasyonu için Ang II ile inkübasyon süresinin 5 dakika ve en yüksek fosforilasyonun 100 nM Ang II konsantrasyonunda elde edildikten sonra deneylere bu şartlarda devam edildi. p38 MAPK fosforilasyonunda üst yolağında yer alan Ras proteinin etkisini ortaya koymak için Ras proteininin spesifik inhibitörü olan FTS (Farnesil-tiyosalisilik asit) ile VDK hücreleri inkübe edilip Ang II ile uyarıldıktan sonra p38 MAPK fosforilasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. NAD(P)H oksidaz'ın spesifik inhibitörü olan DPI (Difenil iyodonyum) ile inhibe edilmesi de Ang II uyarımlı p38 MAPK fosforilasyonunun tamamen baskılanmasına neden olmuştur.

Sonuç: Elde edilen bulgular vasküler düz kas hücrelerinde Ang II uyarımı sonucu AT1 reseptörü üzerinden gerçekleşen p38 MAPK fosforilasyonunun Ras-NAD(P)H oksidaz bağımlı bir yolak üzerinden olduğunu işaret etmektedir. Bu yolağın daha iyi anlaşılması kardiyovasküler hastalıkların altında yatan hücresel mekanizmaların tam olarak açığa kavuşturulmasını sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Vasküler düz kas hücreleri, Ang II, p38 MAPK, Ras, NADPH oksidaz.

Çıkar Çatışması: Bu çalışmada yazarlar, konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmamaktadır.

ABSTRACT

Aim: Ang II stimulates vascular smooth muscle cells (VSMCs) and activates mitogen protein kinases (MAPKs) in culture media. p38 MAPK, a member of MAPK family, is stimulated by both Ang II and reactive oxygen species. This study was carried out to show Ang II stimulated p38 MAPK activation through Ras and subsequent NADPH oxidase activation in VSMCs.

Material and Method: In our study, primary VSMCs isolated from rat aorta were stimulated by Ang II and with different inhibitors, and western blot was used to measure p38 MAPK phosphorylation.

Results: The optimum p38 MAPK phosphorylation was observed at 100 nM Ang II concentration for 5 minutes and the next experiments were carried out under these conditions. To analyze the effect of Ras, which is an upstream mediator of p38 MAPK phosphorylation, VSMCs were incubated with a Ras specific inhibitor FTS (Farnesyl thiosalicylic acid). After the stimulation of VSMCs by Ang II, p38 MAPK phosphorylation was inhibited. p38 MAPK phosphorylation was also completely inhibited in the presence of DPI (Diphenyl Iodineum), a specific NAD(P)H oxidase inhibitor, after Ang II stimulation.

Conclusion: These findings demonstrate that Ang II stimulated p38 MAPK phosphorylation is through AT1 receptor and Ras-NAD(P)H oxidase dependent pathway in VSMCs. Understanding this pathway may contribute to the cellular mechanisms underlying in cardiovascular diseases.

Key Words: Vascular smooth muscle cell, Ang II, p38 MAPK, Ras, NADPH oxidase.

Conflict of Interest: The authors do not have any conflict of interest.

Giriş

Oktapeptid yapıda bir hormon olan Ang II, renin-anjiyotensin sisteminin aktif bir bileşenidir (1). Ang II, damar duvarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün kontrolünde temel rol oynamaktadır ve vasküler hastalıkların altında yatan patolojik mekanizmalar ile damar basıncının fizyolojik düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Ang II'nin vasküler etkileri genellikle AT1 reseptörü aracılığıyla ortaya çıkmaktadır (2). Ang II AT1 reseptörlerine bağlanarak, vazokonstriksiyon, su ve tuz dengesi ve diğer nörohumoral sistemlerin kontrolünü sağlamasının yanında reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, hücrel hipertrofi, hücrel hiperplazi ve apoptozise de neden olur (3).

Ang II ile uyarım sonrası VDK hücrelerinde AT1 reseptörleri üzerinden G proteinleri, Src adı verilen adaptör bir proteini aktive edebilmektedir. Bu da bir "büyüme faktörü reseptörü bağlayıcı protein" olan Grb2 üzerinden Sos'un aktivasyonuna neden olur. Sos, Ras üzerindeki GDP-GTP değişimini katalizleyen bir guanin nükleotid değiştirici faktördür. Ras, sinyal transdüksiyonunda merkezi bir oyuncudur. Ras'ın belki de en iyi karakterize edilmiş efektörü MAPK yoluna öncülük eden Raf'tır. Raf'ın bu şekilde aktivasyonu *in vivo* ortamda MEK'i (MAP/ERK kinaz) fosforile eder. MEK'lerin aktivasyonu da MAPK'ları aktive eder. Bu şekilde aktif hale geçen MAPK hücre proliferasyonunda rol alan çeşitli enzimleri ve nükleer proteinleri fosforile eder (1,4). Bu yolak aynı zamanda insülin dahil bir çok büyüme faktörünün izlediği klasik sinyal iletim yoludur.

Ang II'nin VDK hücreleri üzerinde AT1 reseptörü aracılığıyla farklı sinyal iletim yollarını kullanarak MAPK ailesinin bir üyesi olan p38 MAPK sinyal iletim yolunu aktive ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (1,2,5). Yapılan çalışmalarda Ang II ile uyarımı sonrasında G proteinleri üzerinden aktif hale geçen tirozin kinazların NAD(P)H oksidaz sistemini aktive ettiği ifade edilmiştir. Aktive olan NAD(P)H oksidaz sisteminin de ROS üreterek p38 MAPK'ı aktive ettiği belirtilmiştir (1,2,3,5). Ancak, AT1 reseptörünün uyarılması sonucu Ras uyarımı üzerinden p38 MAPK aktivasyonunun gerçekleştiği, spontan hipertansif ratlarda yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur (6). Ayrıca, yine Ang II uyarımı sonrasında Ras üzerinden p38 MAPK uyarılarak protein ekspresyonunu için gerekli olduğu kardiyak fibroblastlar ile yapılan bir başka çalışmada da belirtilmiştir (7).

Şu ana kadar yapılan çalışmalar farklı hücre kültürlerinde Ang II'nin AT1 reseptörü yoluyla hem NAD(P)H oksidaz üzerinden ROS üretimi yoluyla hem de Ras-MAPKKK (Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz Kinaz) yolu üzerinden p38 MAPK'ı fosforile ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, primer rat vasküler düz kas hücrelerinde Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK kinazın fosforilasyonunun, Ras alt yolağı üzerinden veya NAD(P)H oksidaz aktivasyonu sonucu meydana geldiğini ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültüründe aktivatör olarak kullanılan Anjiyotensin II ve Ras inhibitörü olan FTS Sigma'dan, NAD(P)H oksidaz inhibitörü olarak kullanılan DPI Calbiochem'den satın alındı. AT1 antagonisti losartan, Merck Sharp&Dohme firması tarafından hediye edildi. Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS), kalsiyum klorür (CaCl₂), hepes, elastaz, kollejenaz, soya tripsin inhibitör, sığır serum albumin, fetal sığır serum, L-glutamin, penisilin-streptomisin, DMEM, sitokrom c ve süperoksit dismutaz Sigma'dan satın alındı. Tripsin-EDTA, ICN'den satın alındı. p38 MAPK primer ve sekonder antikorları Chemicon firmasından temin edildi. Analiz için sete yüklenecek olan numunelerin protein içeriği Pierce marka mikroprotein deney kiti kullanılarak standardize edildi. Western blot için Mini-Protean II Western Blot seti (Bio-Rad) kullanıldı. Sinyallerin görüntülenmesinde kemilüminesan kiti (Bio-Rad) kullanıldı. Membran olarak 0,2 µm por genişliğindeki Schleicher&Schuell marka nitroselüloz membran kullanıldı.

Membranlar filme aktarılırken Amersham Hyperfilm ECL kullanıldı. Filmlerin geliştirilmesi esnasında Illu-gater marka developer ve fiksatif kullanıldı.

İmmünohistokimyasal analizler için primer ve sekonder antikorlar Sigma'dan alındı ve Dako marka immünohistokimya kiti kullanıldı.

Hücre Kültürü

Vasküler düz kas hücreleri, erkek wistar ratların torasik aortalarından, Çetin ve arkadaşlarının metodu kullanılarak enzimatik ayrıştırma yöntemi ile izole edildi. Besi yeri olarak Dulbecco's Modified Eagle's besi yeri (DMEM) kullanıldı (8). Deneylerde 6. ve 10. pasajlar arasındaki hücreler kullanıldı. Kültürdeki hücrelerin vasküler düz kas hücreleri olduğu düz kas hücrelerine özgü α-aktin boyamaları ile immünohistokimyasal yöntem aracılığıyla tesbit edildi.

Süperoksit Anyon Ölçümü

Süperoksit anyon miktarı, Süperoksit dismutaz ile inhibe olabilen sitokrom c redüksiyon yöntemiyle Görlach ve arkadaşlarının önerdiği metoda göre yapıldı (9).

Western Blot

Vasküler düz kas hücreleri istenilen yoğunluğa ulaşınca, daha önce denenerek belirlenmiş olan konsantrasyon ve sürelerde, gerekli aktivatör ve inhibitörler ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda buz üzerine alınan hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkandıktan sonra proteaz inhibitör kokteyli içeren lizis tamponu ilave edildi. Buz içerisinde sonikasyon uygulanan lizis tamponu ve hücre karışımı daha sonra mikrosantrifüjde +4 °C'de 17.500 x g'de 25 dakika santrifüj edildi. Protein miktarları hesaplanan lizatlardan ve Laemmli tamponundan belirlenen hacimlerde alınarak 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı ve soğuması beklendi. Yükleme hazır olan numuneler son hacimde 30 µg protein olacak şekilde %10'luk SDS-PAGE jeline aktarıldı. Yü-

rütme işlemi sonrasında jelden proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması (Blotting) işlemi yapıldı. Blotting tankından çıkarılan membranlar %5'lik süt tozu içeren TBST ile blokama işlemine tabi tutuldu. Blokama sonrasında membranlar 1:2000 dilüsyon olacak şekilde uygun primer antikor ile inkübe edildi. Membranlar HRP işaretli sekonder antikor ile inkübe edildi.

ECL solusyonu ile tüm yüzeyi kaplanan membranlar inkübasyon süresi sonunda filme alındı. Filme aktarılan sinyaller, bilgisayar ortamında Windows XP işletim sisteminde çalışan Alpha DigiDoc 1000 programı ile film üzerinde oluşan bantların densitometrik analizi yapılarak elde edilen veriler grafik haline dönüştürüldü. Birbirinden bağımsız zamanlarda yapılan en az 4 tekrarın sonuçları Microsoft Office Excel 2007 yardımıyla grafik haline dönüştürüldü. Elde edilen verilerin her bir ortalaması alınarak standart sapma değerleri hesaplanarak grafik üzerinden değerlendirildi.

Bulgular

VDK Hücrelerinde Optimum p38 MAPK Fosforilasyonu İçin Gerekli Ang II Konsantrasyon ve İnkübasyon Süresinin Saptanması

Primer VDK hücrelerinde Ang II'nin, p38 MAPK'ı aktive eden en uygun konsantrasyonunu bulabilmek için 6 kuyucuklu petri kabı içerisindeki hücre kültürleri 0.1, 1, 10, 100 ve 1000 nM olmak üzere beş farklı Ang II konsantrasyonu ile 5 dakika inkübe edildi. Western blot deneyi sonucunda kontrol gruplarına kıyasla 100 nM'a kadar konsantrasyon artışıyla doğru orantılı fosforilasyon artışı saptandı. 10, 100 ve 1000 nM konsantrasyonlardaki fosforilasyon artışları birbirine yakın olmasına rağmen p38 MAPK'ı en iyi aktive eden konsantrasyon 100 nM olarak bulundu (Şekil 1.A ve B). Bu sonuçlar Ang II'nin, VDK hücrelerini doza bağımlı bir şekilde aktive ettiğini göstermektedir.

Ang II'nin p38 MAPK kinaz aktivasyonunu maksimum arttırdığı süreyi belirlemek için hücreler, 100 nM Ang II ile 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika olmak üzere 5 farklı sürede aktive edilerek western blot analizi ile p38 MAPK aktivasyonları incelendi (Şekil 2.A ve B). Kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon görülürken 2 ve 5. dakikalarda aktivasyon artışı saptandı. 5. dakikada maksimum seviyeye çıkan aktivasyon giderek azaldı ve 30. dakikada bazal seviyedekine yakın bir düzeye geldi. Western blot sonuçları 100 nM Ang II'nin p38 MAPK'ı 5. dakikada maksimum aktive ettiğini göstermektedir. Şekil 2.B'de western blot sonuçlarının grafiğe aktarılmış hali gösterilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan western blot deneylerinde VDK hücreleri 100 nM konsantrasyonda Ang II ile 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

VDK Hücrelerinde Ang II Aracılı p38 MAPK Fosforilasyonunda AT1 Reseptörünün Rolü

Ang II'nin MAP kinaz ailesinin bir üyesi olan p38 MAPK'ı fosforile eden sinyallerinin AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiğini göstermek amacıyla AT1

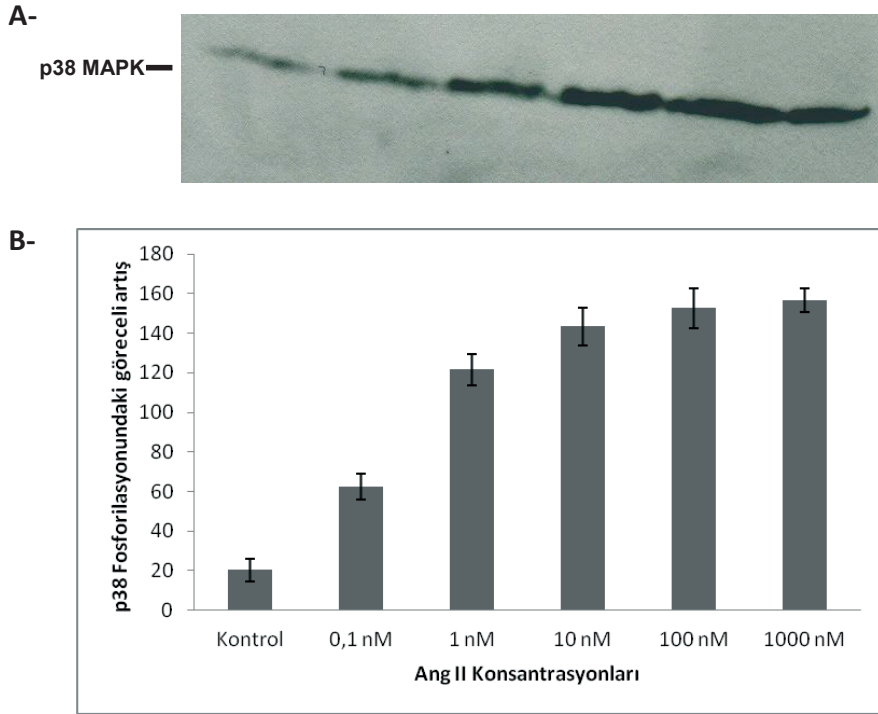
reseptör antagonisti olan losartan kullanıldı (Şekil 3). Kültürdeki VDK hücreleri, literatürdeki verilere uygun olarak 10^{-5} M losartan ile 10 dakika inkübe edildi. Losartan 10^{-5} M konsantrasyonda ve 10 dakika boyunca uygulandığında AT1 reseptörünü etkili bir şekilde bloke etmektedir. Kontrol grubu herhangi bir aktivatör ya da inhibitör ile inkübasyona bırakılmayan hücrelerde, bazal seviyedeki p38 MAPK fosforilasyonunu göstermektedir. VDK hücrelerinin Ang II ile uyarımı sonrasında AT1 reseptör blokörü olan losartanın tek başına VDK hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Losartan ile inkübasyona bırakılan VDK hücrelerinin Ang II ile uyarılması sonucunda p38 MAPK fosforilasyonunun kontrol ile aynı düzeyde kaldığı görülmüştür. Elde edilen western blot sonuçlarına göre VDK hücrelerinde Ang II uyarımından sonra p38 MAPK fosforilasyonu AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiğini göstermiştir.

Ang II'nin NAD(P)H Oksidaz Üzerinden Süperoksit Anyon Üretimine Etkisi

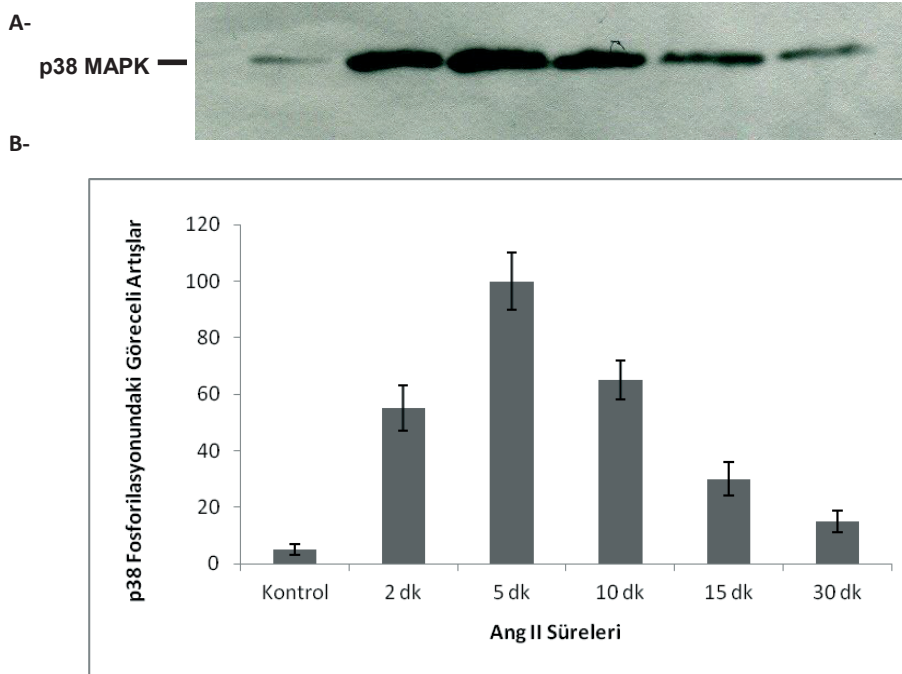
Primer vasküler düz kas hücre kültüründe Ang II uyarımının süperoksit anyon üretimi üzerine olan etkisini göstermek için hücreler 1 saat 100 nM Ang II ile inkübe edildikten sonra sitokrom C redüksiyonu yöntemiyle süperoksit anyonu ölçüldü. Belirgin bir şekilde artan süperoksit anyonu, hücrelerin önce AT1 inhibitörü olan losartan ile inkübe edilmesi sonucunda kontrol seviyesine kadar düştü (Şekil 4). NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan DPI kullanımı da yine süperoksit anyon miktarını kontrol seviyesine kadar düşürdü. Bu veriler, Ang II'nin NAD(P)H oksidaz üzerinden süperoksit anyonu üretimini uyardığını göstermiştir.

VDK Hücrelerinde Ang II Üzerinden p38 MAPK Fosforilasyonunda Ras Proteininin Rolü

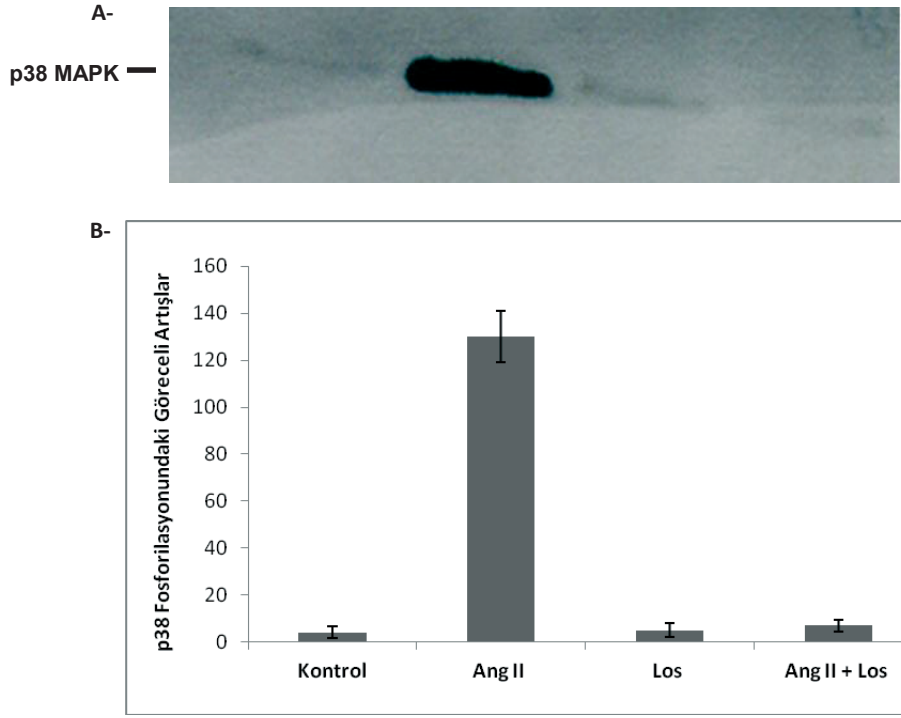
VDK hücrelerinde Ang II uyarımı sonrasında AT1 reseptörü üzerinden aktive olan G proteinleri vasıtasıyla Ras'ın p38 MAPK fosforilasyonu üzerine olan etkisi incelendi. Herhangi bir aktivatör ve inhibitör ile inkübasyona bırakılmayan hücrelerden oluşan kontrol grubunda p38 MAPK fosforilasyonunu gösteren bir bant oluşmamıştır (Şekil 5). VDK hücrelerinin Ang II ile uyarımı sonrasında fosforilasyon düzeyinde kontrole kıyasla anlamlı bir artış gerçekleşmiştir. Ras inhibitörü FTS'nin çözücüsü olan DMSO'nun uyarıcı bir etkisinin olmadığını gözlemek için, DMSO tek başına VDK hücreleriyle inkübasyona bırakılmış ve p38 MAPK fosforilasyonunu gerçekleştirmediği gözlemlenmiştir. VDK hücrelerinin DMSO ve Ang II ile uyarılması sonucunda yine p38 MAPK fosforilasyonunda anlamlı bir artış görülmüştür. Bu artışın Ang II'nin hücreleri tek başına uyarımından daha fazla görülmemesi, DMSO'ün tek başına ya da Ang II uyarımı üzerine bir etkisi olmadığını kanıtlamıştır. Ras inhibitörü FTS'nin ise tek başına herhangi bir uyarana sebebiyet vermediğini göstermek için FTS ile



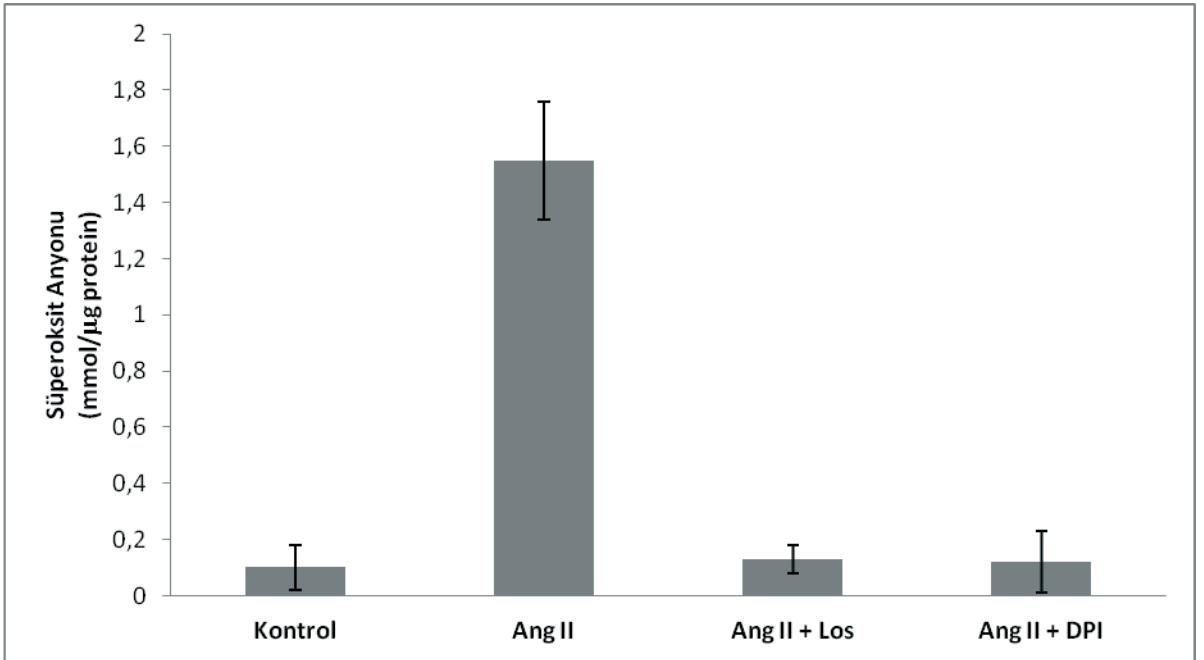
Şekil 1: Ang II'nin farklı konsantrasyonlarının VDK hücrelerinde p38 MAPK üzerine etkisi. VDK hücre kültürleri Ang II'nin 0,1, 1, 10, 100 ve 1000 nM konsantrasyonlarında inkübe edildi ve p38 MAPK aktivasyonları incelendi. Elde edilen sonuçlar, Ang II'nin p38 MAPK fosforilasyonu üzerinde doz bağımlı bir etkisi olduğunu göstermektedir. **A.** p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. Blot sonuçları en az 4 tekrar yapılan deneylerden bir tanesidir. **B.** Farklı Ang II konsantrasyonlarında p38 MAPK fosforilasyonunun değişimini grafiksel olarak göstermektedir.



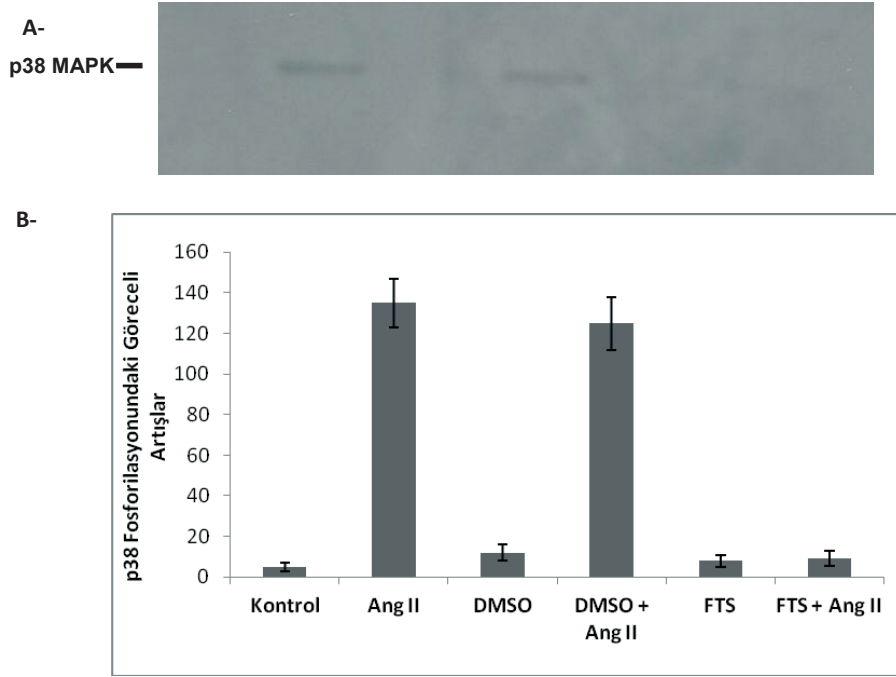
Şekil 2: Ang II'nin VDK hücre kültürlerinde farklı sürelerde p38 MAPK aktivasyonları. Hücreler 100 nM Ang II ile 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika boyunca inkübe edildi ve p38 MAPK fosforilasyonu incelendi. Elde edilen bulgular doğrultusunda VDK hücre kültürlerinde 100 nM Ang II uyarımının 5. dakikada p38 MAPK'ı maksimum düzeyde fosforile ettiği gözlemlendi. **A.** p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi. Blot sonuçları en az 4 tekrar yapılan deneylerden bir tanesidir. **B.** p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmesi. VDK hücre kültürlerinde 100 nM Ang II'nin 5. dakikada p38 MAPK'ı maksimum düzeyde fosforile ettiği gözlemlendi.



Şekil 3: VDK hücre kültürlerinde AT1 reseptörünün rolü. VDK hücreleri 100 nM Ang II ile uyarıldı ve p38 MAPK fosforilasyonu izlendi. Hücreler 10 dakika 10-5 M losartan ile inkübe edildikten sonra 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldığında herhangi bir p38 MAPK fosforilasyonu gözlenmedi. A. p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. Blot sonuçları en az 4 tekrar yapılan deneylerden bir tanesidir. B. p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmiştir.”



Şekil 4: VDK hücrelerinde 1 saat 100 nM Ang II uygulanması sonucunda süperoksit anyon üretimi kontrolün yaklaşık olarak 1,6 katı yükselmiştir. AT1 inhibitörü losartan 30 dak ve 10 µM konsantrasyonda ön inkübasyonu takiben Ang II ilavesi sonrasında süperoksit anyon konsantrasyonunu kontrol seviyesine düşmüştür. NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan DPI 30 dak ve 10 µM uygulanmasından sonra süperoksit anyon konsantrasyonu da kontrol seviyesine düşmüştür.



Şekil 5.: VDK hücre kültürlerinde p38 MAPK aktivasyonunda Ras'ın rolü. A. VDK hücreleri bir Ras inhibitörü olan FTS ile 10 μ M konsantrasyonda, 12 saat inkübe edildikten sonra 100 nM Ang II uyarıldığında p38 MAPK aktivasyonu tamamen baskılandı. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun p38 MAPK aktivasyonu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir. Blot sonuçları en az 4 tekrar yapılan deneylerden bir tanesini göstermektedir. B. p38 MAPK fosforilasyonu grafiksel olarak gösterilmiştir.

birlikte inkübasyona bırakılmış hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonu gözlenmemiştir. DMSO'da çözünmüş olan FTS ile inkübasyona bırakılan hücrelerin Ang II ile uyarılması sonucunda ise p38 MAPK fosforilasyonunun baskılandığı görülmektedir. Bu bulgu bize Ras'ın bloke edilmesi halinde Ang ile uyarılmış VDK hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmediğini göstermektedir.

Ang II Üzerinden p38 MAPK Fosforilasyonunda NAD(P)H Oksidazın Rolü

Bu çalışmamızda ise VDK hücrelerinde Ang II uyarımı sonrasında AT1 reseptörü üzerinden NAD(P)H oksidaz aracılığıyla p38 MAPK fosforilasyonu takip edildi (Şekil 6). VDK hücrelerinin Ang II ile uyarımı sonrasında p38 MAPK fosforilasyonunda daha önceki deneylerimizde olduğu gibi belirgin ve kontrole göre anlamlı bir artış gerçekleşmiştir. İnhibitörün çözücüsü olan DMSO'nun herhangi bir uyarıcı etkisini gözlemek için DMSO ile inkübasyona bırakılmış hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmediği görüldü. DMSO ile inkübasyon sonrasında Ang II ile uyarılan VDK hücrelerinin sonucunda p38 MAPK fosforilasyonunda anlamlı bir artış olması da uyarımın sadece Ang II'den kaynaklandığını düşündürmektedir. Sadece NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI'nin uyarıcı veya inhibe etkisinin olmadığını göstermek için ise DPI ile inkübasyona bırakılan hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonu gerçekleşmemiştir. NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI sonrasında Ang II ile hücrelerin uyarılması sonucunda p38 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmediği görülmektedir (Şekil 6).

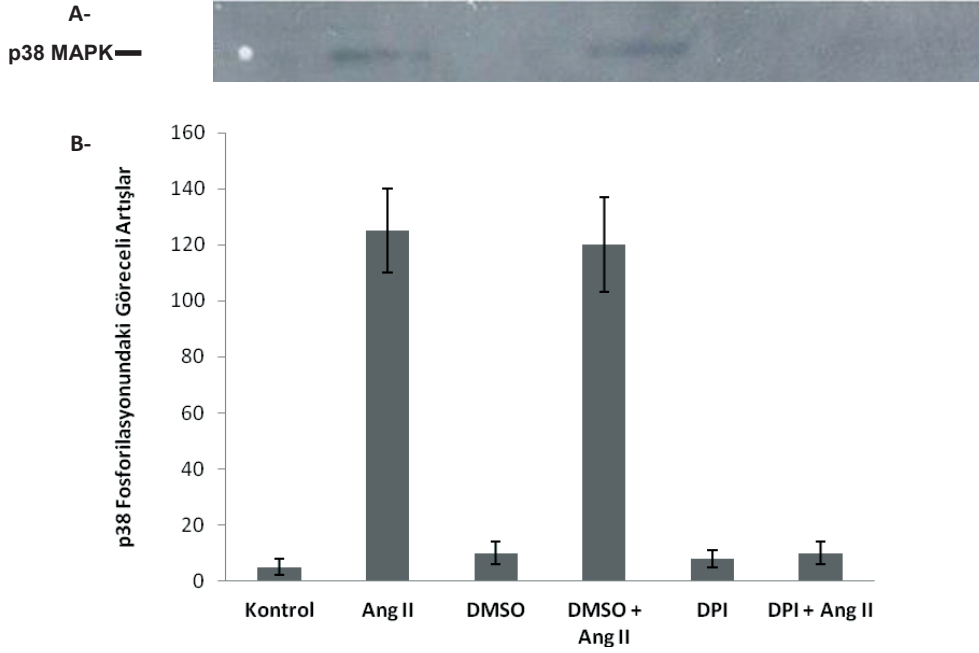
Bu bize NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI'nin, Ang II sinyal alt yolunda p38 MAPK fosforilasyonunu bloke ettiğini yani p38 MAPK fosforilasyonunun NAD(P)H oksidaz üzerinden meydana geldiğini göstermiştir.

VDK Hücrelerinde Ang II'nin NAD(P)H Oksidaz Üzerinden ERK1/2 Fosforilasyonuna Etkisi

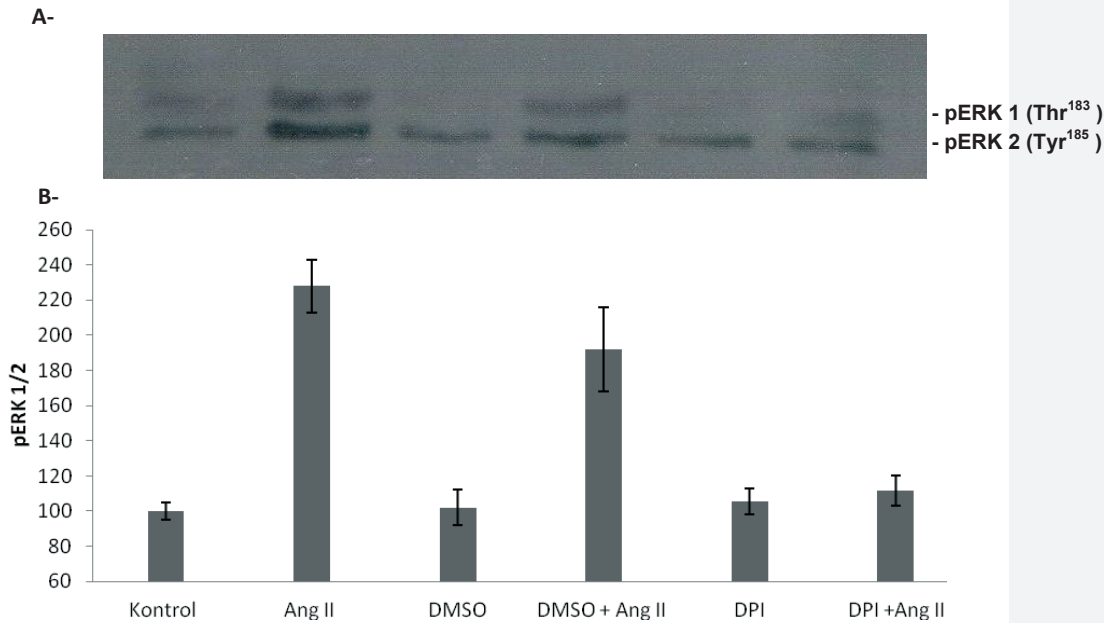
VDK hücreleri Ang II ile uyarımı Erk 1/2 aktivasyonu gerçekleştirildiği gösterildikten sonra (Şekil 7) bu aktivasyon yolu üzerinde NAD(P)H oksidaz'ın rolü araştırıldı. VDK hücrelerinin NAD(P)H oksidaz üzerinden Erk1/2 aktivasyonunu takip etmek için hücreler öncelikle NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan DPI ile inkübe edildikten sonra Ang II ile stimülasyonu sonucunda Erk 1/2 fosforilasyonunun da baskılandığı görüldü. Bu sonuç, Ang II uyarımında hem p38 MAPK aktivasyonunun hem de Erk 1/2 aktivasyonunun NAD(P)H oksidaz üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Tartışma

Damar duvarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün kontrolünde temel role sahip olan Anjiyotensin II, vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan güçlü bir damar daraltıcı hormon olarak tanımlanır (1,2). Son yıllarda yapılan birçok çalışma, bu peptidin AT1 reseptörü üzerinden iletilen intraselüler sinyallerinin, VDK hücrelerinin büyümesi ve damar duvarlarında meydana gelen inflamasyonlarla ilişkili, hipertansiyon, ateroskleroz, miyokard infarktüsü, vasküler ve miyokardiyal yeniden düzenlenme ile konjestif kalp yetmezliği



Şekil 6: VDK hücre kültürlerinde p38 MAPK aktivasyonunda NAD(P)H oksidaz'ın rolü. VDK hücrelerinin NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI ile 20 μ M konsantrasyonda, 30 dakika süreyle inkübasyonu takiben 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarılması sonrasında p38 MAPK fosforilasyonu gösterilmektedir. Fosforilasyon sadece Ang II ile uyarıma göre belirgin şekilde Kontrol grubuna yakın seviyede baskılanmıştır. **A.** p38 MAPK fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. Blot sonuçları en az 4 tekrar yapılan deneylerden bir tanesidir. **B.** p38 MAPK fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 7: VDK hücre kültürlerinde Erk 1/2 aktivasyonunda NAD(P)H oksidaz'ın rolü. VDK hücrelerinde NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI ile 20 μ M konsantrasyonda, 30 dakika inkübasyonu takiben 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarılması sonrasında Erk 1/2 fosforilasyonu gösterilmektedir. DPI, Erk 1/2 fosforilasyonunu belirgin şekilde azaltmıştır. **A.** Erk1/2 fosforilasyonunun western blot analizi gösterilmiştir. Blot sonuçları en az 4 tekrar yapılan deneylerden bir tanesidir. **B.** Erk 1/2 fosforilasyonunun grafiksel olarak gösterilmiştir.

gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (10). Ang II uyarımı sonrasında gerçekleşen hücre içi sinyal iletim yollarının açığa kavuşturulması bizlere bu kardiyovasküler hastalıkların altında yatan temel mekanizmaları anlaşılması için bir ışık tutabilir.

Ang II'nin, MAPK aktivasyonunu ve çeşitli proteinlerdeki tirozin ve treonin birimlerinin fosforilasyonunu uyardığı bilinmektedir. p38 MAPK sinyal yolağı, Ang II'nin vasküler düz kas hücreleri üzerindeki vazokonstriktör etkisi ile selektif bir şekilde ilişkilidir. Vasküler düz kas hücrelerinde p38 MAPK'nın enzimatik aktivasyonu ise AT1 reseptörü vasıtasıyla ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla gerçekleşmektedir (2). Oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklar üzerine olan etkisi sebebiyle, çalışmamızda Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK fosforilasyonu gerçekleşirken bu yolk üzerinde bulunduğu düşünülen Ras ve NAD(P)H oksidaz'ın hangi sırayla ve ne önemde rol aldığını inceledik.

İlk olarak, primer vasküler düz kas hücrelerinde Ang II uyarımı ile optimum inkübasyon süresi ve Ang II'nin dozuna bağımlı oluşan p38 MAPK fosforilasyonu incelenmiştir. p38 MAPK fosforilasyonu için Ang II ile optimum inkübasyon süresinin 5 dakika olduğu ve en yüksek fosforilasyonu Ang II'nin 100 nM konsantrasyonunda olduğu durumda bulunmuştur. Elde ettiğimiz verilerin, hem Meloche ve arkadaşlarının hem de Ushio-Fukai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda buldukları sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür (2, 11). Bu verilere bağılı kalarak, bundan sonraki deneysel prosedürlerde Ang II inkübasyonları; 100 nM konsantrasyon ve 5 dakika olarak kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda Ang II ile uyarım sonrasında VDK hücrelerinde AT1 reseptörleri üzerinden G proteinlerinin aktivasyonu sonrasında Src adı verilen adaptör bir proteinin aktive olduğu ve bununda gelişme faktörü bağlayıcı protein olan Grb2 üzerinden Sos'u aktive ettiği gösterilmiştir (4). Sos ise Ras üzerindeki GDP-GTP değişimini katalizleyen bir guanin nükleotid değiştirici faktördür. Ras, sinyal transdüksiyonunda merkezi bir oyuncudur. Aynı çalışmalarda Ras'ın MAP kinaz yoluna öncülük eden Raf ve NAD(P)H oksidazı aktive ettiği bulunmuştur (1,12). Ushio-Fukai ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, Ang II uyarımıyla G proteini üzerinden aktive olan Ras'ın, NAD(P)H oksidaz bağımlı yollar üzerinden p38 MAPK'ı aktive ettiği gösterilmiş bununla birlikte p38 MAPK ile PI-3 kinaz ve Raf arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya koyulması için daha fazla araştırma yapılması gerektiği bildirilmiştir (11). Kyaw ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da, Ang II uyarımı sonrasında antioksidantların kullanımının, p38 MAPK aktivasyonunu durdurduğunu belirtmişlerdir (13).

Çalışmamızda, Ang II uyarımı sonrasında AT1 reseptörü üzerinden G proteinlerinin aktivasyonu yoluyla p38 MAPK fosforilasyonu yolağında Ras'ın oynadığı rolü göstermek amacıyla VDK hücreleri, bir Ras inhi-

bitörü olan FTS ile inkübe edilmiştir. Ang II ile uyarım sonrasında VDK hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyonunda bir artış olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç, VDK hücrelerinde FTS'nin GTP-bağlayan Ras'ı inhibe etmesi nedeniyle Ras-Raf-NAD(P)H oksidaz kavşağını bloke ettiğini düşündürmüştür.

Ang II üzerinden aktive olan G proteini sinyallerinin tirozin kinazlar, PLA2 ve PLD üzerinden NAD(P)H oksidaz sistemini aktive etmek suretiyle veya Ras üzerinden Raf yoluyla p38 MAPK aktivasyonunun gerçekleşebileceği daha önceden yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1). Yaptığımız deneylerde, Raf ve NAD(P)H oksidaz enzimlerinin üst yolağında bulunan Ras inhibe edildiğinde, Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür.

Literatürde Ang II uyarımı sonrasında Ras-Raf ve NAD(P)H oksidaz yollarının hangisinin p38 MAPK fosforilasyonunda baskın olduğu ve Ras'ın NAD(P)H oksidaz sistemini aktive edip etmediği tam olarak gösterilmemiştir. Daha önceden yapılan çalışmalardan Ras'ın doğrudan Raf-1'i fosforilleyerek MAPK aktivasyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir (14). Bilinen yolkta VDK hücre kültürlerinde Ang II uyarımlı p38 MAPK aktivasyonunun Ras bağımlı olduğu ve Raf üzerinden p38 MAPK'ı aktive ettiği gösterilmiştir.

Nickenig, Ang II uyarımının ROS bağımlı yolların aktivasyonu üzerinden NAD(P)H oksidaz'ı aktive ettiğini bildirmiştir (3). Obata ve arkadaşları ile Ushio-Fukai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, NAD(P)H oksidaz tarafından üretilen süperoksit anyonu ve hidrojen peroksidin her ikisinin de p38 MAPK'ı aktive ettiği gösterilmiştir (14, 15). Yaptığımız çalışmada, Ang II uyarımı sonrasında süperoksit anyon üretiminin arttığını ve bunun da NAD(P)H oksidaz aracılığı ile gerçekleştiğini ortaya koyduk. Hücre içerisinde süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit konsantrasyonunun yükselmesi NAD(P)H oksidaz ile ilişkili olduğu için bu enzimin inhibe edilmesi, Ang II uyarımı sonrasında gerçekleşmesi beklenen p38 MAPK aktivasyonunu tamamen baskılamış olabilir. FTS kullanılarak Ras'ın inhibe edilmesi sonucu p38 MAPK fosforilasyonunun baskılanması bize Ras'ın NAD(P)H oksidaz'ın üst yolağında olduğunu düşündürmüştür.

Ang II uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz'ın p38 MAPK fosforilasyonu üzerine olan etkisini incelemek için hücreler NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI ile inkübe edilmiş ve ardından Ang II ile uyarılmıştır. Deneysel sonucunda NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI'nin Ang II uyarımlı p38 MAPK fosforilasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. p38 MAPK fosforilasyonundaki inhibisyonun NAD(P)H oksidazın inhibisyonu sonucu ROS üretimindeki azalmadan dolayı olduğu söylenebilir. Fakat Ras-Raf yolu üzerinden olması beklenen p38 MAPK fosforilasyonunun da inhibe olması, bize Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK aktivasyonunun sadece NAD(P)H oksidaz sistemi üzerinden olduğunu düşündürmüştür. Bu durum aynı zamanda Ras'ın etkilerini NAD(P)H ok-

sidaz üzerinden gösterdiğinin de kanıtıdır (Şekil 8). Ushio-Fukai ve arkadaşları da vasküler düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada elde ettikleri bulgulara benzer sonuçlar bulmuşlardır (11). Elde ettikleri sonuçlara göre, primer VDK hücrelerinde Ang II uyarımı sonucu p38 MAPK fosforilasyonundaki artışta, H₂O₂ ve O₂ gibi reaktif oksijen radikallerinin kritik bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

Ancak yaptığımız çalışmalarda NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan DPI kullanılarak Ang II uyarımı sonrasında Erk 1/2 aktivasyonunu kısmen inhibe ettiğini bulunmuştur. Yamakawa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada VDK hücrelerini lizofosfatidil kolin ile aktive etmeleri sonucunda NAD(P)H oksidaz enziminin aktive olduğu ve hem p38 MAPK hemde ERK 1/2 fosforilasyonunun gerçekleştiğini göstermişlerdir (16). Fakat Touyz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise Ang II uyarımının NAD(P)H oksidaz ile aktive olmasını takiben sadece p38 MAPK aktivasyonunun gözlendiğini, Erk 1/2 aktivasyonunun gözlenmediğini rapor etmişlerdir (17). Çalışmalarda ortaya çıkan bu çelişkinin daha fazla incelenmesinin gerektiğini düşünüyoruz.

Sonuç olarak, VDK hücrelerinde Ang II uyarımı sonucu AT1 reseptörü üzerinden işleyen Ras-NAD(P)H oksidaz yolu p38 MAPK aktivasyonu için düşünülen esas yoldur (Şekil 8). Bu yolağın daha iyi anlaşılması kar-

diyovasküler hastalıkların altında yatan patolojik mekanizmaların ve herhangi bir stres uyarımı sonucunda meydana gelen iskemi, infeksiyon hastalığı ve inflamatuvar artrit gibi hastalıkların hücresel mekanizmaların anlaşılmasına ve tedavi ya da profilaksi amaçlı ilaç geliştirilmesine imkan sağlayabilir.

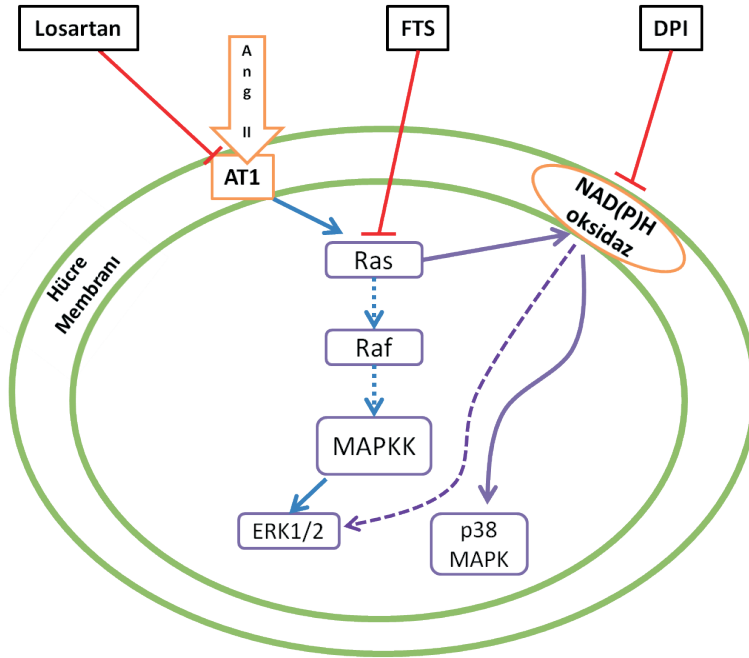
Gelecekte hücre içi süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi ROS'ların ölçülmesi ve p38 MAPK fosforilasyonu üzerinde etkili diğer stres kaynaklı yolların ayrıntılı olarak araştırılması konulara bakış açısını genişletebilir. Ras ve NAD(P)H oksidaz üzerinden üretilen fizyolojik ve patolojik düzeydeki ROS'ların p38 MAPK aktivasyonu üzerindeki etkilerini gösteren daha ileri çalışmalar bu konunun bütünlüğünün anlaşılmasında yardımcı olabilir.

Bilgi ve Teşekkür

Bu proje Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2004.04.0103.003 Proje numarası ile desteklenmiştir.

Çıkar çatışması

Bu çalışmada yazarlar, konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmamaktadır.



Şekil 8: Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK fosforilasyon yolağı. Ang II uyarımı sonrasında p38 MAPK fosforilasyonunda rol alan Ras ve NAD(P)H oksidaz aynı yolak üzerinden fosforilasyonu kontrol etmektedir. Losartan AT1 inhibitörü, FTS ise Ras inhibitörü ve DPI'da NAD(P)H oksidaz inhibitörü olarak etki etmektedir.

Referanslar

- [1] Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000; 52:639-672.
- [2] Meloche S, Landry J, Huat J, Haule F, Marceau F, et al. p38 MAP Kinase pathway regulates Angiotensin II induced contraction of vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: 741-751.
- [3] Nickenig G. Central Role of the AT₁-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens* 2002; 16:26-33.
- [4] Yin G, Yan C, Berk BC. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(6):780-783.
- [5] Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 2000; 91:21-27.
- [6] Kishi T, Hirooka Y, Konno S, Ogawa K, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor-activated caspase-3 through ras/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in the rostral ventrolateral medulla is involved in sympathoexcitation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2010; 55:291-297.
- [7] Li L, Dong F, Cheng W, Jin-Yu W, Xiao-Bing C, Dan W, Yun Z, Li-Ling W. Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF- β 1 pathways in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2011; 91, 80-89.
- [8] Cetin A, Ozturk OH, Tokay A, Akçit F, Caglar S, et al. Angiotensin II-induced MAPK phosphorylation mediated by Ras and/or phospholipase C-dependent phosphorylations but not by protein kinase C phosphorylation in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Pharmacology* 2007; 79(1):27-33.
- [9] Görlach A, Brandes RP, Bassus S, Kronemann N, Kirchmaier CM, et al. Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB J* 2000; 14:1518-1528.
- [10] Bradford CB, Marshall AC. Ang II signal transduction in vascular smooth muscle; Role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997; 80:607-616.
- [11] Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, et al. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274(32):22699-22704.
- [12] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81(2):807-869
- [13] Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res* 2001; 24(3): 251-261.
- [14] Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 2000; 28(4 Suppl):N67-77.
- [15] Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; 273(24):15022-15029.
- [16] Yamakawa T, Tanaka S, Yamakawa Y, Kamei J, Numaguchi K, et al. Phosphatidylcholine activates extracellular signal-regulated kinases 1/2 through reactive oxygen species in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(5):752-758.
- [17] Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2004; 22(6):1141-1149.