

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ MÜRACAAT FORMU

PROJENİN ADI: NİTRİK OKSİDİN PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1)
PROLİFERASYON, DİFERENSİYASYON VE AKTİN HÜCRE
İSKELETİ ORGANİZASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ:
RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ OLASI KATKISI

MERSİN ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJE BİRİMİ
PROJE ÖNERİSİ BAŞVURU FORMU

ACIKLAMA: Bu form, MERSİN ÜNİVERSİTESİ Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne sunulacak olan Proje Önerilerinde bulunması gereken bölüm, bilgi, belge ve açıklamaları kapsayacak şekilde tasarlanmıştır. Formda her bir bölüm başlık halinde belirtilmiş ve gerekli durumlarda öneri sahibine yardımcı olmak amacıyla kısa açıklamalar yapılmıştır. Formu doldurmaya başlamadan önce bu açıklamaları dikkatle okuyunuz. Başvurunuzun değerlendirilebilmesi için formun eksiksiz olarak doldurulması ve istenilen belgelerin eklenmesi gerekmektedir. Proje önerisi iki kopya dosya ve bir kopya cd kaydı ile MERSİN ÜNİVERSİTESİ BAP Birimine gönderilmelidir. Bu form TUBİTAK'ın bilimsel araştırma projesi başvuru formu esas alınarak hazırlanmıştır.

Projenin Türü : Tez projesi <input checked="" type="checkbox"/> A Tipi Proje <input type="checkbox"/> B Tipi Proje <input type="checkbox"/> Güdümlü Proje <input type="checkbox"/>	BAP Proje No :
Tez projeleri ilgili Anabilim Dalı Kurul kararıyla ilgili Enstitü Müdürlüğü aracılığıyla; A ve B tipi projeler ilgili Dekanlık/Müdürlük aracılığıyla Rektörlük Makamına iletilmelidir.	

1. Başvuru Kapak Sayfası

Proje Başlığı : NİTRİK OKSİDİN PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON, DİFERENSİYASYON VE AKTİN HÜCRE İSKELETİ ORGANİZASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ: RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ OLASI KATKISI		
Öneren/Projenin Yürütüleceği Kuruluşun Adı/Yazışma Adresi : ME. Ü. TIP FAKÜLTESİ FARMAKOLOJİ AD. ME. Ü YENİŞEHİR KAMPÜSÜ 33169 MERSİN		
Proje Yürütücüsü Adı Soyadı ve Ünvanı	Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR	
İdari Görevi (varsa)	M. E. Ü. T.F. FARMAKOLOJİ AD Bölüm Başkanı	
Fakülte/Yüksekokul	Tıp fakültesi	
Bölüm/Anabilim Dalı	Farmakoloji	
Elektronik Posta Adresi	kbuyukafsar@mersin.edu.tr	
Cep Tel: 05333494001	Telefon: 3412815/1006	Faks: 3412312
TC. KİMLİK NO:	29998749692	
Önerilen Destek Miktarı (YTL) : 10000 YTL	Onaylanan Destek Miktarı (YTL) : (Boş bırakınız)	
Önerilen Proje Süresi (Ay) : 24	Onaylanan Proje Süresi (Ay) : (Boş bırakınız)	
Önerilen Başlama Tarihi : 15. 02. 2009	Onaylanan Başlama Tarihi : (Boş bırakınız)	

2. Kabul ve Taahhüt Beyanları

KABUL VE TAAHHÜT BEYANLARI (PROJE EKİBİ)

Bu başvuru formunda verilen bilimsel varsayım ve düşünceler dışındaki bütün bilgilerin doğru ve eksiksiz olduğunu; aksini açıkça belirtmediğim/belirtmediğimiz takdirde, bu formla yapılan proje önerisinde yer alan tüm resim ve ekli belge ile yayınların şahsımın/shahsımızın özgün eseri olduğunu; Türkiye Cumhuriyeti Kanunlarına ve sair mevzuat hükümleri ile Mersin Üniversitesi'nin proje değerlendirme ve destekleme kural ve usullerini bildiğimi/bildiğimizi ve bu hükümlere uygun hareket edeceğimi/edeceğimizi; MERSİN ÜNİVERSİTESİ Bilimsel Araştırma Proje Birimi'nin yukarıda anılan kural ve usullerine ilişkin düzenlemelerini gerekli gördüğünde değiştirebileceğini ve yapılacak bu değişikliklere de uymak zorunda olduğumu/olduğumuzu kabul ve taahhüt ederim/ederiz.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ		
Adı Soyadı ve Ünvanı Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR	Cep Tel 05333494001	Kurum Sicil No ME.Ü.01.6047
Çalıştığı Fakülte/Yüksekokul Tıp Fakültesi	Telefon ve Faks 3412815/1006	Elektronik Posta Adresi kansu23@yahoo.com
Bölüm / Anabilim Dalı Farmakoloji	Tarih 23.01.2009	İmzası
ARAŞTIRMACI		
Adı Soyadı ve Ünvanı Arş. Gör. Dr. A. Sencer YURTSEVER	Cep Tel 05335293866	Kurum Sicil No DR-FAR2601
Çalıştığı Fakülte/Yüksekokul Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi	Telefon ve Faks 3412815/1073	Elektronik Posta Adresi drasencer@gmail.com
Bölüm / Anabilim Dalı Farmakoloji	Tarih 23.01.2009	İmzası
ARAŞTIRMACI		
Adı Soyadı ve Ünvanı Arş. Gör. Ecz. Özge GÜLDALI	Cep Tel 05056568523	Kurum Sicil No ME. Ü.01. 0482
Çalıştığı Fakülte/Yüksekokul Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi	Telefon ve Faks 3412815/1073	Elektronik Posta Adresi ozgeguldali@gmail.com
Bölüm / Anabilim Dalı Farmakoloji	Tarih 23.01.2009	İmzası
ARAŞTIRMACI		
Adı Soyadı ve Ünvanı Arş. Gör. Vet. Hek. A. Hakan KURT	Cep Tel 05437991230	Kurum Sicil No ME. Ü.01. 0188
Çalıştığı Fakülte/Yüksekokul Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi	Telefon ve Faks 3412815/1073	Elektronik Posta Adresi Farma75@hotmail.com
Bölüm / Anabilim Dalı Farmakoloji	Tarih 23.01.2009	İmzası
ARAŞTIRMACI		
Adı Soyadı ve Ünvanı Yrd. Doç. Dr. İsmail ÜN	Cep Tel 05057715173	Kurum Sicil No ME. Ü. 01. 0123
Çalıştığı Fakülte/Yüksekokul Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi	Telefon ve Faks 3412815/1026	Elektronik Posta Adresi ismailun@mersin.edu.tr
Bölüm / Anabilim Dalı Farmakoloji	Tarih 23.01.2009	İmzası

Araştırmacı sayısı fazla ise bu sayfanın birden fazla kopyasının başvuru formuna eklenerek tam araştırmacıların listesinin verilmesi gerekmektedir.

ÖNEREN/PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ FAKÜLTE/YÜKSEKOKUL/ENSTİTÜ YETKİLİSİNİN ADI SOYADI VE ÜNVANI	TARİH	İMZA
Doç. Dr. Ülkü Çömelekoğlu		
İDARİ GÖREVİ	TELEFON/FAKS NO	ELEKRONİK POSTA ADRESİ
ME. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü	3412815/1073	ucomelek@yahoo.com

3. Özet ve Anahtar Kelimeler: Özetle konunun tarihçesi ve/veya literatürdeki yeri çok kısa belirtildikten sonra projenin özgün değeri ve beklenen sonucunun etkileri vurgulanmalıdır. Ayrıca nasıl yürütüleceği (deneysel tasarım/yaklaşım, yöntemler, ekip, aşamalar ve zaman) özetlenmelidir. Proje özetleri birer sayfayı geçmemelidir.

Proje Başlığı : NİTRİK OKSİDİN PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON, DİFERENSİYASYON VE AKTİN HÜCRE İSKELETİ ORGANİZASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ: RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ OLASI KATKISI
<p style="text-align: center;">Özet</p> <p>Rho ailesi küçük molekül ağırlıklı GTP'azlardan olan RhoA'nın aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynayarak hücre morfoloji değişiklikleri, fokal adhezyon ve stres liflerinin oluşumu, sitokinezis, hücre siklus progresyonu, diferensiyasyon gibi hücre iskeleti-bağımlı birçok hücrel işlevi düzenlediği gösterilmiştir. Rho A'nın bu etkileri Rho-kinaz, LIM-kinaz, protein kinaz N gibi alt efektörler aracılığı ile olur. Preadipositler erişkinlik boyunca yağ dokuda bulunmakta ve enerji dengesinin durumuna göre matür adipositlere proliferere ve diferensiyeye olabilmektedir. 3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz'ın (ROCK-2) inhibisyonunun adipogenezini arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, Rho inhibitör proteini p190RhoGAP knockout farelerde matür adipositlerin bulunmadığının gösterilmesinin yanı sıra, 3T3-L1 ve yabancı tip fare embriyonik fibroblast kültürlerinde Rho-kinaz aktivitesinin aşırı indüksiyonunun adipogenezini bozduğunun ortaya konulması, RhoA'nın adipogenezinin önemli bir modülatörü olduğunu göstermektedir. Diğer önemli bir modülatör ikisi yapısal, birisi indüklenebilir olmak üzere 3 farklı izoformu bulunan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimince oluşturulan parakrin vazodilatör nitrik oksit (NO). Yağ dokuda eNOS ve iNOS varlığı saptanmış ve iNOS'un abdominal obezitede gözlenen düşük dereceli kronik inflamasyon tarafından indüklendiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, adipoz doku diferensiyasyonu üzerine NO etkileri ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir: NO'nun primer sıçan kahverengi yağ doku preadipositlerinin ve sıçan beyaz yağ doku preadipositlerinin diferensiyasyonunu stimüle ettiği, 3T3-L1 preadipositlerinde ise diferensiyasyonu süprese ettiği gösterilmiştir; iNOS'ın kronik inflamasyonda adipogenezini stimüle ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra nitrik oksidin lipolizi stimüle ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Çeşitli dokularda nitrik oksit ve RhoA arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalar yapılmış, vasküler düz kasta Rho inhibisyonunun iNOS'ı stimüle ettiği, statinler tarafından Rho inhibisyonunun eNOS ekspresyonunu arttırdığı, ya da sıçan koroner endotel hücrelerinde nitrik oksitin Rho-kinaz'ı downregüle etmediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra enterositlerde yapılmış bir çalışmada nitrik oksidin enterosit</p>

migrasyonunu, RhoA'yı aktive ederek inhibe ettiğinin gösterilmesi nitrik oksit ile Rho A arasındaki ilişkinin henüz tam olarak aydınlatılmadığına işaret etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda nitrik oksit ile RhoA arasında bir etkileşim olup olmadığını incelemeyi ve RhoA'nın alt efektörleri olan ve hücre iskeleti reorganizasyonu üzerine etkili olduğu gösterilmiş olan Rho-kinaz ve LIM-kinaz'ın ekspresyonlarında değişiklik olup olmadığını ortaya koymayı planladık. Bir etkileşim olduğunun gösterilmesi durumunda bu enzimlerin aktivitesinin göstergesi olan hedef proteinlerin fosforilasyonlarındaki değişimi değerlendirmeyi ve bu etkileşimin adipositlerde aktin hücre iskeletinin reorganizasyonu ve adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisini incelemeyi amaçladık. Araştırmadan beklenen sonuç, obezitede moleküler mekanizmaların ve ilişkili hastalıkların patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktır.

Bu çalışmada hem deney hem kontrol gruplarında diferensiyasyonun indüklenmesi amacı ile aynı protokol kullanılacaktır: Hücreler konfluent olana kadar %10 CS/ DMEM'de (%10 calf serum/ Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum) çoğaltılacak, konfluent olduğu gün 0.gün kabul edilerek, hücreler iki gün süreyle %10 CS/ DMEM'de çoğaltılıp, ardından 0.5 mM IBMX, 0.25 µM deksametazon, ve 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM'de (fetal sıgır serumu/Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum) 2 gün diferensiyasyon indüklenecek, ardından 2 gün süresince hücreler insülin içeren %10 FBS/DMEM içerisinde inkübe edilecektir ve devamında 8. Güne kadar %10 FBS/DMEM de inkübasyon sürdürülecektir. Medyum her gün değiştirilecektir.

Diferensiyasyonun değerlendirilmesi amacı ile hem kontrol hem de deney gruplarında hücreler oil red O boyanacak ve gliserol-3 fosfat dehidrogenaz (GPDH) enziminin aktivitesi analiz edilecektir. Proliferasyonun değerlendirilmesi için hem kontrol ve hem de deney gruplarında MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) proliferasyon analizi yapılacaktır. Diferensiyasyon ve proliferasyon sırasında hücrelerin aktin hücre iskeleti organizasyonlarının görülmesi amacı ile hem kontrol ve hem de deney gruplarında hücreler F-aktin'e özgü bir fluoresan boya olan Oregon green falloidin ile boyanacaktır.

Western blot analizi için kontrol grubunda 0, 2, 4, 6, 8. günlerde, eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve Rho-kinaz enziminin aktivite göstergesi olan LIMK fosforilasyonu bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β-aktin'e göre normalize edilecektir.

Deney gruplarında Western blot analizi için 3T3-L1 hücreleri 6 gruba ayrılacak ve aşağıda belirtilen uygulamalar yapılacaktır:

1. 0-8. günler arasında hücre kültürü ortamında nitrik oksit donörü DETA-NO (2,2'-(Hidroksinitrozohidrazono) bis-etanimin) varlığında (10^{-8} - 10^{-6} M), RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve Rho-kinaz enziminin aktivite göstergesi olan LIMK fosforilasyonu bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β-aktin'e göre normalize edilecektir.

2. 0-8. günler arasında nitrik oksit donörü sodyum nitrit (NaNO_2) varlığında (10^{-4} - 10^{-3} M)

RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu, bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

3. 0-8. günler arasında hücre kültürü ortamında iNOS indükleyicisi lipopolisakkarid (LPS) varlığında (10-100 ng/ml) ya da yokluğunda eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu gösterilecek ve NOS enzim inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) uygulaması ile eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonunun ne ölçüde değişeceği, bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir

4. 0-8 günler arasında hücre kültürü ortamında iNOS indükleyicisi lipopolisakkarid (LPS) uygulamasının (10-100 ng/ml) eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu üzerine etkisi, bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

5. 0-8. günler arasında hücre kültürü ortamında spesifik Rho-kinaz inhibitörü (S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-isokinolinil) sulfonil] homopiperazin, 2HCl (H1152) varlığında (10^{-8} - 10^{-7} M) eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

6. 0-8. günler arasında hücre kültürü ortamında Rho aktivatörü lizofosfatidik asit (1-Oleoyl-*sn*-gliserol 3-fosfat sodyum tuzu) varlığında (10^{-7} - 10^{-6} M), RhoA translokasyonu, iNOS ve eNOS enzim ekspresyonu özgül antikolar kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Kansu Büyükaşar'dır. Projede görev alacak araştırmacılar olarak Arş. Gör. Dr. A. Sencer Yurtsever, Arş. Gör. Ecz. Özge Güldalı, Arş. Gör. Vet. Hek. A.Hakan Kurt, Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün belirlenmiştir. Proje süresi toplam 2 yıl olarak planlanmıştır. Proje çalışmalarına kabul tarihinden itibaren başlanacaktır. İlk 6 ay proje kapsamında bulunan sarf malzemelerin alımları ve çalışma ile ilgili literatür taraması yapılacak, hücre kültürü çalışması başlatılacaktır. İkinci 6 ay içerisinde hücre kültürü çalışması devam ettirilerek, çalışmada kullanılan ajanların diferensiyasyon, enzim ekspresyon ve aktiviteyi üzerine etkileri ölçülecek ve ilişkili proteinlerin fosforilasyonu ve aktin hücre iskeletine etkileri değerlendirilecektir. Üçüncü 6 ayda western blot yapılacaktır. Dördüncü 6 aylık dönemde veriler toplanıp değerlendirilecek, istatistiksel yöntemler kullanılarak sonuçlar yorumlanacak ve proje sonuç raporu hazırlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: 3T3-L1, RhoA, Rho-kinaz, LIM-kinaz, Nitrik oksit, Nitrik oksit sentaz, MYPT1

Amaç: Önerilen projenin amacı ve erişilecek çıktı(lar) açıkça yazılmalıdır. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir.)

Bu çalışmanın amacı nitrik oksidin preadipositlerde (3T3-L1) proliferasyon, diferensiyasyon ve aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine etkilerini incelemek ve Rho/rho-kinaz yolağının bu etkilere olası katkısını araştırmaktır.

5. Konu ve Kapsam: Önerilen projenin konusu ve kapsamı net olarak tanımlanmalı; amaç ile ilişkisi açıklanmalıdır. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir.)

Bu projede beyaz yağ doku adiposit öncülü 3T3-L1 fare embriyonik fibroblast kültüründe küçük molekül ağırlıklı G proteini RhoA ile nitrik oksit arasındaki ilişkinin ortaya konulması ve bu etkileşimin RhoA'nın Rho-kinaz, LIM-kinaz gibi alt efektörlerinin ekspresyon ve aktivitesi üzerine etkilerinin, aktin hücre iskeletinde ortaya çıkabilecek değişikliklerin incelenmesinin yanısıra, preadiposit proliferasyonu, diferensiyasyonu ve adipogenez üzerine etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Projenin hedeflenen sonucu, obezite ile ilgili mekanizmaların moleküler düzeyde anlaşılmasına yönelik bir katkı oluşturmaktır.

6. Literatür Özeti: Proje konusu ile ilgili alanda ulusal ve uluslararası literatür taranarak, **ham bir literatür listesi değil**, kısa bir literatür analizi verilmelidir. Bu analiz, önerilen araştırma konusunun literatürdeki önemini ve doldurulması gereken boşluğu ortaya koymalıdır. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir.)

Obezite endüstrileşmiş ülkelerde sık görülen bir sağlık sorunudur ve insülin rezistansı, Tip-2 diyabet, hipertansiyon, kanser, safra kesesi hastalığı ve ateroskleroz gibi birçok patolojik bozuklukla ilişkilidir (1). Son 20 yılda azalmış fiziksel aktivite ve fazla miktarda ucuz, yüksek enerjili gıda tüketimini içeren Batı yaşam tarzına adapte olan gelişmekte olan ülkelerde obezite olguları üçe katlanmıştır. Obezite primer olarak beyaz yağ dokunun yağ kitlesinin artışı ile karakterizedir (3). Günümüzde DSÖ (Dünya sağlık örgütü) tarafından yapılan obezite tanımına göre dünyada 1.7 milyar insan fazla kilolu (vücut kitle indeksi > 25) ve bunların 400 milyonu obezdir (Vücut kitle indeksi > 30) (2, 3).

Memelilerde iki tip yağ dokusu bulunmaktadır: Beyaz yağ doku ve kahverengi yağ doku. Beyaz yağ doku enerji depolanmasından, kahverengi yağ doku ise enerji harcanmasından sorumludur. Kahverengi yağ dokunun ana işlevi besin kaynaklı enerjiyi ısıya dönüştürmek ve vücut sıcaklığını belirli bir düzeyde tutmaktır (4). Beyaz yağ doku yaşam boyu organizmanın enerji durumuna bağlı olarak hücrel kompozisyon ve boyut açısından büyük değişimler gösterebilir. Bireyler harcadıklarından fazla enerji aldıklarında beyaz yağ doku kitlesi preadiposit (adiposit öncülü hücre) havuzundan yeni adipositlerin (yağ hücresi) alınması ve varolan adipositlerin daha fazla hücre içi lipid birikmesi sonucu genişlemesi yolu ile artar (5). Adipositler kondrojenik, osteojenik, myojenik ve adipojenik diferensiyasyon potansiyeli olan pluripotent mezenşimal kök hücrelerden farklılaşırlar (6, 7, 8). Son çalışmalarda yetişkin yağ dokudan izole edilen stromal hücrelerden preadipositlerin elde edilebildiği

gösterilmiştir (6, 9).

Beyaz yağ doku, yoğun olarak yağ depolanması için farklılaşmış, içi lipid ile dolu ve çevresi kolajen lif ağı ile çevrili hücreler olan adipositlerle (yağ hücreleri) dolu özelleşmiş bir gevşek bağ dokusudur (3, 11). Beyaz yağ doku adipositlere ek olarak fibroblastlar, preadipositler, perisitler, monositler, makrofajlar ve endotelyal hücreleri de içerir. Bu hücreler yaygın olarak yağ dokunun stromal vasküler fraksiyonu olarak adlandırılır (10, 11). Yağ doku kitlesinin artışı dokuda bulunan adipositlerin boyutunda artış ve *de novo* adiposit diferensiyasyonu (farklılaşması) yolu ile olur (3). Yağ dokuda lipidler, adiposit içinde özelleşmiş organeller olan lipid damlacıkları içinde depolanır. Yağ dokudaki lipid damlacıkları uniloküler ya da multiloküler olabilir. Uniloküler hücrelerde hücre çekirdeğini plazma membranına doğru iten tek büyük bir lipid damlacığı hücreye taşlı yüzük görünümü verir (11). Lipid damlacığı adipositin büyük bir parçası olduğundan (adiposit kitlesinin %95'i), adipositte depolanan yağ miktarındaki değişime bağlı olarak adiposit hücre büyüklüğü 25-250 µm arasında değişmektedir. Olgun adipositin içindeki lipid damlacığının aşırı büyüklüğünden ötürü bu hücreler orijinal olarak lipid depo hücreleri olarak kabul edilmişlerdir.

Bununla birlikte, günümüzde bilinmektedir ki yağ doku, salgıladığı leptin, adiponektin, resistin, visfatin, anjiyotensin, IL-1 (İnterlökin-1), IL-6 (İnterlökin-6), IL-8 (İnterlökin-8), TNF-α (Tümör nekroz faktör-alfa) gibi adipoz doku kaynaklı faktörlerle (adipokinler ya da adipositokinler) birçok fizyolojik işlevi düzenleyen bir endokrin organ olarak etki göstermektedir (10). Yağ doku stromal vasküler fraksiyonunun içindeki birçok hücre immün sistem hücresi olduğundan, yağ doku immün yanıtta da kritik rol oynar (10). Ayrıca, yağ dokunun salgıladığı sitokinler aracılığı ile obezitede gözlenen kronik düşük dereceli inflamasyona neden olduğu ve bu inflamatuvar durumun insülin rezistansı, tip 2 diyabet, kanser, aterosklerotik kalp ve damar hastalığı, romatoid artrit, Alzheimer hastalığı gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (11). Bu nedenlerden ötürü obeziteye yol açan moleküler mekanizmaların aydınlatılması önem arz etmektedir.

Mayalardan insanlara kadar bütün ökaryot hücrelerde bulunan ve 100'den fazla üyeye sahip Ras süper ailesini oluşturan küçük G proteinleri, moleküler ağırlıkları 20-40 kilodalton olan monomerik G proteinleridir (12). Ras süper ailesini oluşturan (Ras, Rho, Arf, Rab ve Ran) 5 gruptan birisi olan Rho protein ailesi, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynayarak hücre morfogenez ve migrasyonuna etki eder (13). Memelilerde Rho ailesi 22 üyesi bulunan 8 alt gruba bölünebilir: Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp, Wrch-1); Rac (Rac1-3, RhoG); Rho (RhoA, RhoB, RhoC); Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE); RhoD (RhoD ve Rif); RhoH/TTF; RhoBTB (RhoBTB1 ve RhoBTB2); ve Miro (Miro-1 ve Miro-2) (14). RhoA, vücutta en fazla eksprese edilen ve en çok çalışılan Rho proteini alt tipidir (15, 16). Rho ailesi üyesi küçük molekül ağırlıklı GTPazlar hücre şekil ve motilite değişiklikleri, hücre kontraksiyonu, fokal adhezyon ve stres liflerinin oluşumu, trombosit agregasyonu, sitokinez, hücre siklüsü progresyonu, akson büyüme ve yönlenmesi gibi hücre iskeleti bağımlı birçok hücresel işlevi

düzenlerler (15). Bunun yanı sıra Rho proteinlerinin nöronlar, T lenfositler, myositler, adipositler ve keratinositleri içeren birçok hücre tipinde diferensiyasyona karıştığı gösterilmiştir (15, 16)

Memeli Rho proteinlerinin tanımlanan birçok alt efektörleri arasında Rho-kinaz (Rho-kinaz β /ROCK-1, Rho-kinaz α /ROCK-2) (17, 18, 19), protein kinaz N (PKN) (20), myozin fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi (21), p140mDia (Drosophila gen Diaphanous) (22), sitron (citron) (23), sitron kinaz (24), rofilin (rhophilin) (25), rhotekin (26), fosfolipaz D1 bulunmaktadır (27). Rho proteinlerinin alt efektörü olan Rho-kinaz'ın da çok sayıda sübstratı tanımlanmıştır. Bunlar myozin hafif zincir fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi, myozin hafif zinciri (MHZ), addusin (adducin), intermediyer filamentler, ERM proteinleri (ezrin/radiksin/moesin), vimentin, desmin gibi ara filamentler, glial fibriler asidik protein (GFAP), nörofilamentler ve LIM-kinaz'dır (28, 29, 30). Bunlardan MHZ, ERM ailesi proteinleri ve addusin hem Rho-kinaz'ın ve hem de myozin fosfatazın substratlarıdır. ERM proteinleri hücre iskeleti düzenlenmesinde rol oynayan aktin bağlayıcı proteinlerdir (30, 31). Aktivitesi MHZ fosforilasyonu tarafından düzenlenen myozin-2'nin sitokinez ve hücre yayılımı için temel itici güç olduğu gösterilmiştir (32, 33, 34). Fokal adezyonların ve stres liflerinin oluşumunun da MHZ fosforilasyonuna bağımlı olduğu gösterilmiştir (32, 33, 35, 36). MHZ, myozin fosfataz tarafından defosforile edilerek inaktive edilmektedir (37). Myozin fosfatazın, myozin fosfataz hedefleyici alt ünitesinin (MYPT1, M130/133, MBS) fosfataz aktivitesini modüle ettiği bilinmektedir (36). ROCK, hem MYPT'yi Treonin696 ve treonin853 bölgelerinden fosforilleyerek myozin fosfataz aktivitesini inhibe etmek yolu ile, hem de MHZ'yi direkt olarak fosforile ederek aktomyozin kontraktilitesini düzenler (38, 39, 40).

Rho-kinazın alt efektörü olan LIM-kinaz'ın iki izoformu bulunmaktadır (LIMK-1, LIMK-2) (41, 42, 43). Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada LIMK-1 ve LIMK-2'nin fare dokularında yaygın olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (44). Her iki izoform da Rho-kinaz tarafından fosforile edilmelerinden ardından aktin depolimerize edici faktör olan kofilini fosforile ederek inaktive eder ve aktin stres liflerinin ve fokal adezyonların oluşmasını indükler (42, 43, 45, 46). Son çalışmalardan birinde ROCK-1'in embriyonik fibroblast ve Swiss 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde TGF- β 'nin (Transforme edici büyüme faktörü beta) aracılık ettiği bir sinyal yolağı ile LIMK-2'yi aktive ederek kofilin fosforilasyonu yolu ile aktin hücre iskeletini düzenlediği gösterilmiştir (43).

3T3-L1 (fare embriyonik fibroblast) hücrelerinde Rho-kinaz'ın (ROCK-2) inhibisyonunun adipogenezi arttırdığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, Rho inhibitör proteini p190RhoGAP knockout farelerde matür adipositlerin bulunmadığının gösterilmesinin yanı sıra, 3T3-L1 ve yabanıl tip fare embriyonik fibroblast kültürlerinde Rho-kinaz aktivitesinin aşırı indüksiyonunun adipogenezi bozduğunun ortaya konulması, Rho/Rho-kinaz yolağının adipogenezinin önemli bir modülatörü olduğunu göstermektedir (47).

Diğer önemli bir modülatör birçok farklı hücre tarafından üretilen, kısa ömürlü (3-5 saniye), 1.5

nm'lik kısa bir mesafede etki gösteren, inflamasyon, vasküler tonüs kontrolü ve metabolizma gibi birçok fizyolojik olaya karışan parakrin vazodilatör nitrik oksittir (NO) (48, 49, 50, 51). Hücre tipine bağlı olarak NO, üç NO sentaz (NOS) izoformu tarafından katalizlenen bir enzimatik reaksiyonla sentezlenir (49, 50). Nöronal NOS (nNOS, NOS1) ve endotelial NOS (eNOS, NOS3) yapısaldir ve intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonlarını arttıran uyarılardan sonra küçük miktarlarda NO üretirler. Üçüncü izoform, indüklenebilir NOS (iNOS, NOS2) ise Ca^{2+} 'dan bağımsızdır; sitokinler ve bakteriyel lipopolisakkarid gibi etkenlerce indüksiyon sonrası makrofajlar ve diğer birçok çekirdekli hücreler tarafından eksprese edilir (51). iNOS'ın indüksiyonu yapısal NOS izoformlarının indüksiyonuna göre çok daha büyük miktarda ve çok daha uzun süreli nitrik oksit salınımına neden olur. iNOS indüksiyonu gen transkripsiyonunu gerektirdiğinden, etkene maruziyetten saatler sonra başlar ve günlerce devam edebilir (52). Nitrik oksidin ana hedefi çözümlü guanilil siklazdır (53). Nitrik oksit guanilil siklaza bağlanarak onu aktive eder. Guanilil siklazın aktivasyonu sonucunda GTP'den (guanozin trifosfat) sGMP (siklik guanozin monofosfat) sentezi artar. sGMP ise protein kinaz G'yi aktive eder (54). Nitrik oksidin demire olan afinitesi nedeniyle bir trikarboksilik asit siklusu enzimi olan akonitaz gibi demir içeren diğer bazı metalloproteinler de nitrik oksidin hedefleri arasındadır (54). Nitrik oksit, sitokrom oksidazın inhibisyonu yolu ile mitokondriyal solunumu inhibe eder. Yapısında hem grubu içeren sitokrom P450 enzimlerinin inhibisyonu inflamatuvar karaciğer hastalığında major patolojik mekanizmadır (54). Farelere nonspesifik NOS inhibitörü N^G -nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) uygulamasının ağırlık artışı ve gıda alımını azalttığı gösterildiğinden dolayı nitrik oksidin enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (55). Beyaz ve kahverengi yağ dokuda eNOS ve iNOS'un eksprese edildiği gösterilmiştir (50, 51, 56, 57, 58, 59). Ayrıca nitrik oksit metabolitlerinin plazma düzeyleri ile vücut kitle indeksi ve vücut yağ kitlesi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (60, 61, 62). Obez fareler ve Zucker diyabetik sıçanlarında karaciğer, iskelet kası ve beyaz yağ dokusunda iNOS ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (63, 64). Farelerde iNOS gen delesyonunun fazla yağlı diyetle indüklenen insülin direncine karşı koruyucu etkisinin olduğunu gösterilmesi, nitrik oksidin insülin direnci gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir (64). Bunun yanı sıra, diyabetik hastalarda plazma nitrit düzeyleri orta düzeyde yükselmiştir (65). İnsan yağ dokusunda eNOS mRNA ve protein ekspresyonunun iNOS'tan 10 kat fazla olduğu bulunmuştur (58). Son çalışmalardan birisinde iNOS'ın abdominal obezitede gözlenen düşük dereceli kronik inflamasyon tarafından indüklendiği gösterilmiştir (66). Bunun yanı sıra endotoksemi sırasında yağ dokunun iNOS ekspresyonunun ana kaynağı olduğu gösterilmiştir (67). 3T3-L1 hücre kültüründe NO'in yağ dokudan salınan ve monosit migrasyonu, fibrinoliz ve anjiogeneze (yeni damar oluşumu) karışan, viseral yağ birikimini ve bununla ilişkili inflamasyonu etkileyen plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) ve inflamatuvar bir sitokin olan IL-6 mRNA ekspresyonlarını arttırdığının gösterilmesi NOS aktivitesinin inhibe edilmesinin beyaz yağ dokuda inflamasyonu düzeltebileceğini düşündürmektedir (60).

Bununla birlikte, adipoz doku diferensiyasyonu üzerine NO etkileri ile ilgili çalışmalarda farklı

sonuçlar elde edilmiştir. NO'nun *in vitro* olarak sıçan kahverengi adipositlerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve adipojenik marker genler olan PPAR γ (peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör γ) ve uncoupling protein 1 (eşleneme proteini 1) ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (68, 69). NO'nun primer sıçan kahverengi yağ doku preadipositlerinin ve sıçan beyaz yağ doku preadipositlerinin diferensiyasyonunu stimüle ettiği (70), 3T3-L1 preadipositlerinde ise diferensiyasyonu süprese ettiği gösterilmiştir (71). Son çalışmalardan birisinde iNOS'ın kronik inflamasyonda adipogenezisi stimüle ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra nitrik oksidin lipolizi stimüle ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (72, 73).

Çeşitli dokularda nitrik oksit ve Rho/Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar yapılmıştır. Örneğin vasküler düz kasta Rho inhibisyonunun iNOS'ı stimüle ettiği (74), statinler tarafından Rho inhibisyonunun eNOS ekspresyonunu arttırdığı (75) ya da sıçan koroner endotel hücrelerinde nitrik oksitin Rho-kinaz'ı downregüle etmediği gösterilmiştir (76). Son çalışmalardan birinde farelerin spinal kordunda prostaglandin E3 reseptörü (EP3) agonisti ONO-AE-248 tarafından indüklenen nitrik oksit oluşumunun spesifik Rho-kinaz inhibitörü H-1152 tarafından tümüyle ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (77). Bunun yanı sıra enterositlerde yapılmış bir çalışmada nitrik oksidin RhoA'yı aktive ederek enterosit migrasyonunu inhibe ettiğinin gösterilmesi, nitrik oksit ile Rho/Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkinin tutarsız olduğuna işaret etmektedir (78). Bu nedenle, nitrik oksidin preadipositlerde (3T3-L1) proliferasyon, diferensiyasyon ve aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine etkilerini incelemeyi ve Rho/rho-kinaz yolağının bu etkilere olası katkısını araştırmayı planladık. Çalışmamızda gerek nitrik oksit donörleri ve inhibitörlerinin varlığında ya da yokluğunda RhoA, Rho-kinaz ve LIM-kinaz'ın enzim ekspresyonunda ve bu enzimlerin aktivite göstergesi LIM-kinaz fosforilasyonunda değişiklik olup olmadığını ve gerekse Rho aktivatör ve inhibitörlerinin varlığında ya da yokluğunda eNOS ve iNOS enzimlerinin ekspresyonunda değişiklik olup olmadığını incelemeyi amaçladık. Aynı zamanda deney ve kontrol gruplarında preadipositlerin proliferasyonu ve diferensiyasyonundaki değişimleri araştırmayı ve aktin hücre iskeleti organizasyonundaki değişiklikleri incelemeyi amaçladık. Araştırmadan beklenen sonuç, obezitede moleküler mekanizmaların detaylarının anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Gregoire FM, Smas CM, Sul SK.** Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*, **1998**; 78 (3): 783-809.
2. **Hossain P, Kavar B, El Nahas M.** Obesity and Diabetes in the Developing World —A Growing Challenge. *N.Engl.J. med*, **2007**; 356 (3): 213-215.
3. **Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J.** The Secretory Function of Adipocytes in the Physiology of White Adipose Tissue. *J Cell Physiol*, **2008**; 216: 3–13.

4. **Chernogubova E.** Adrenergic stimulation of glucose uptake in Brown Adipocytes. Doktora tezi. Stocholm Üniversitesi, Stockholm, İsveç, **2005**.
5. **Schling P, Löffler G.** Cross Talk Between Adipose Tissue Cells: Impact on Pathophysiology. *News Physiol Sci*, **2002**; 17: 99-104.
6. **Schaffler A, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Böhler C.** Role of Adipose Tissue as an Inflammatory Organ in Human Diseases. *Endocrine Reviews*, **2006**; 27 (5): 449–467.
7. **Otto TC, Lane MD, Cox MM.** Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **2005**; 40: 229–242.
8. **Dani C.** Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cells Tissues Organs*, **1999**; 165: 173–180.
9. **Case J, Horvath TL, Howell JC, Yoder MC, March KL, Srour EF.** Clonal multilineage differentiation of murine common pluripotent stem cells isolated from skeletal muscle and adipose stromal cells. *Ann NY Acad Sci*, **2005**; 1044: 183–200.
10. **Desruisseaux MS, Nagajyothi, Trujillo ME, Tanowitz HB, Scherer PE.** Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. *Infection and Immunity*, **2007**; 75 (3): 1066–1078.
11. **Fantuzzi G.** Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology*, **2005**; 115(5):911-919
12. **Takai Y, Sasaki T, Matozaki T.** Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **2001**; 81:153-208.
13. **Sorokina EM, Chernoff J.** Rho-GTPases: New members, new pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2005**; 94 (2): 225-231.
14. **Bryan BA, Mitchell DC, Zhao L, Ma W, Stafford LJ, Teng BB, Liu M.** Modulation of Muscle Regeneration, Myogenesis, and Adipogenesis by the Rho Family Guanine Nucleotide Exchange Factor GEFT. *Molecular And Cellular Biology*, **2005**; 11089–11101.
15. **Miao L, Calvert JW, Tang J, Zhang JC.** Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. *Life Sci*, **2002**; 71: 1175-1185.
16. **Boettner B, Van Aelst L.** The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*, **2002**; 286: 155-174
17. **Kang L, Nagy LE.** Chronic ethanol feeding supresses β -adrenergic receptor-stimulated lipolysis in adipocytes isolated from epididimal fat. *Endocrinology*, **2006**; 147: 4330-4338.
18. **Nobes C, Hall A.** Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr. Opin. Genet. Dev*, **1994**; 4: 77-81.
19. **Nakagawa O.** ROCK-I and ROCK-II two izoforms of Rho-associated coiled coil forming protein/serin treonin kinase in mice. *FEBS Lett*, **1996**;392:189-193.
20. **Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu K, Kaibuchi K .** Identification of a putative target for Rho as a serine-threonine kinase, PKN. *Science*, **1996**; 271: 648-650
21. **Kimura K, Ito M, Mutsuki Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **1996**; 273: 245-248.
22. **Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S.** p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*, **1997**; 16: 3044-3056.
23. **Madaule P, Furuyashiki T, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Morii N , Narumiya S.** A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett*, **1995**; 77: 243-248.
24. **Madaule P, Eda M, Watanabe N, Fujisawa K, Matsuoka T, Bito H, Ishizaki T, Narumiya S** Role of Citron

Kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, **1998**; 394: 491-4.

25. **Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S.** Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science*, **1996**; 271: 645-648.
26. **Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S.** Rhotekin, a New Putative Target for Rho Bearing Homology to a Serine/Threonine Kinase, PKN, and Rhophilin in the Rho-binding Domain. *J. Biol. Chem*, **1996**; 271: 13556-13560
27. **Singer W.D, Brown HA, Sternweis PC.** Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem*, **1997**; 66: 475-509.
28. **Shimokawa H, Takeshita A.** Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2005**; 25: 1767-1775.
29. **Mueller BK, Mack H, Teusch N.** Rho-kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov*, **2005**; 4: 387-398.
30. **Tsukita S, Yonemura S.** Cortical Actin Organization: Lessons From ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteins. *The Journal Of Biological Chemistry*, **1999**; 274 (49): 34507–34510
31. **Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S.** Rho-Kinase Phosphorylates COOH-terminal Threonines of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins and Regulates Their Head-to-Tail Association. *The Journal of Cell Biology*, **1998**; 140 (3): 647–657
32. **Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchii K.** Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *The Journal Of Biological Chemistry*, **1996**; 271 (34): 20246–20249
33. **Matsumura F, Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S.** Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis. *Cell structure And Function*, **2001**; 26: 639-644
34. **Cramer LP, Mitchison TJ** Myosin Is Involved in Postmitotic Cell Spreading, *The Journal of Cell Biology*: **1995**; 131(1): 179-189
35. **Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F.** Distinct Roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3T3 Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, **2000**; 150(4): 797–806
36. **Chrzanowska-Wodnicka M, Burrige K.** Rho-stimulated Contractility Drives the Formation of Stress Fibers and Focal Adhesions. *The Journal of Cell Biology*, **1996**; 133(6): 1403-1415
37. **Pfizer G.** Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*, **2001**; 91: 497–503
38. **Hirano K.** Current topics in regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci*, **2007**; 31: 1-7.
39. **Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K.** Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental Cell Research*, **2000**; 261 (1): 44-51
40. **Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M.** Regulation of the Cytoskeleton And Cell Adhesion By The Rho Family GTPases In Mammalian Cells. *Annual Review of Biochemistry*, **1999**; 68: 459-486
41. **Ridley AJ.** Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science*, **2001**; 114: 2713-2722
42. **Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T.** Specific Activation of LIM kinase 2 via Phosphorylation of Threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent Protein Kinase. *The Journal Of Biological Chemistry*, **2001**; 276 (1): 670–676
43. **Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C.** LIM-kinase 2 and Cofilin Phosphorylation Mediate Actin Cytoskeleton Reorganization Induced by Transforming Growth Factor. *The Journal Of Biological Chemistry*, **2005**; 280 (12): 11448–11457.
44. **Acevedo K, Moussi N, Li R, Soo P, Bernard O.** LIM Kinase 2 Is Widely Expressed in All Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **2006**; 54 (5): 487–501

45. **Sumi T, Matsumoto K, Takai Y, Nakamu T.** Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *The Journal of Cell Biology*, **1999**; 147 (7): 1519–1532
46. **Amano T, Tanabe K, Eto T, Narumiya S, Mizuna K.** LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem J*, **2001**; 354: 149-159
47. **Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, Tomita T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Itoh H, Narumiya S, Nakao K.** Genetic and Pharmacological Inhibition of Rho-Associated Kinase II Enhances Adipogenesis. *The Journal of Biochemistry*, **2007**; 282 (40): 29574- 29583
48. **Engeli S, Janke J, Gorzelniak K, Böhnke J, Ghose N, Lindschau C, Luft FC, Sharma AM.** Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *Journal of Lipid Research*. **2004**; 45: 1640- 1648
49. **Christopherson K S, ve Bredt DS.** Perspectives series: nitric oxide and nitric oxide synthases. *J. Clin. Invest* **1997**; 100: 2424–2429
50. **Michel T, Feron O.** Nitric oxide synthases: which, how, and why? *J. Clin. Invest.* **1997**; 100: 2146–2152
51. **Klatt P, Cacho J, Crespo MD, Herrea E, Ramos P.** Nitric oxide inhibits isoproterenol-stimulated adipocyte lipolysis through oxidative inactivation of the β -agonist. *Biochemistry Journal*, 2000; 351:485-493
52. **Garcia X ve Stein F.** Nitric Oxide. *Seminars in Pediatric Infectious Disease*, **2006**; 17:55-57
53. **Denninger JW ve Marletta MA.** Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999; 1411: 334-350
54. **Katzung BG.** Basic and Clinical Pharmacology. 10th ed., Singapore: McGraw-Hill Companies, **2007**.
55. **Morley JE ve Flood JF.** Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *American Journal of Physiology*, **1994**; 266: R164–R168
56. **Ignarro LJ.** Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int. Suppl*, **1996**; 55: 2–5.
57. **Elizalde M, Rydén M, Harmelen VV, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C, Ramel S, Ölund A, Arner P, Andersson K.** Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *Journal of Lipid Research*, **2000**; 41: 1244-1251
58. **Ribiere C, Jaubert AM, Gaudiot N, Sabourault D, Marcus ML, Boucher JL, Denis-Henriot D, Giudicelli Y.** White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem Biophys Res Commun*, **1996**; 222: 706–712
59. **Giordano A, Tonello C, Bulbarelli A, Cozzi V, Cinti S, Carruba MO, Nisoli E.** Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Letters*, **2002**; 514: 135-140
60. **Ryden M, Elizalde M, Harmelen VV, Ohlund A, Hoffstedt J, Bringman S, Andersson SK.** Increased expression of eNOS protein in omental vs subcutaneous adipose tissue in obese human subjects. *In Journal of Obesity*, **2001**; 25: 811–815.
61. **Choi JW, Pai SH, Kim SK, Ito M, Park CS, Cha YN.** Increases in nitric oxide concentrations correlate strongly with body fat in obese humans. *Clinical Chemistry*, **2001**; 47: 1106–1109.
62. **Nozaki M, Fukuhara A, Segawa K, Okuno Y, Abe M, Hosogai N, Matsuda M, Komuro R, Shimomura I.** Nitric oxide dysregulates adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2007**; 364: 33–39
63. **Perreault M, Marette A.** Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature Medicine*, **2001**; 7: 1138–1143.
64. **Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M.** A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes*, **2005**; 54: 1340–1348.
65. **Ferlito S, Gallina M.** Nitrite plasma levels in type 1 and 2 diabetics with and without complications. *Minerva Endocrinology*, **1999**; 24: 117–121.

66. **Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O.** Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, **2007**; 3 (12):716-724
67. **Kapur S, Marcotte B, Marette A.** Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, **1999**; 276:635-641
68. **Nisoli E, Clementi E, Tonello C, Sciorati C, Briscini L, Carruba MO.** Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures. *British Journal of Pharmacology*, **1998**; 125: 888–894.
69. **Engeli S, Janke J, Gorzelniak K, Böhnke J, Ghose N, Lindschau C, Luft FC, Sharma AM.** Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *Journal of Lipid Research*. **2004**; 45: 1640- 1648
70. **Yan H, Aziz E, Shillabeer G, Wong A, Shanghavi D, Kermouni A, Abdel-Hafez M, Lau DCW.** Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture. *Journal of Lipid Research*, **2002**; 43:2123-2129.
71. **Hiroyuki K, Naoko M, Takako K, Shin-Ya T, Megumi W, Tohru M, Teruo K, Hideo Y.** Nitric oxide suppresses preadipocyte differentiation in 3T3-L1 culture. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2007**; 300(1-2): 61-67
72. **Penforis P, Marette A.** Inducible Nitric Oxide Synthase Modulates lipolysis in adipocytes. *Journal of Lipid Research*, **2005**, 46: 135- 142
73. **Andersson K, Gaudiot N, Ribiere C, Elizalde M, Giudicelli Y, Arner P.** A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *British Journal of Pharmacology*, **1999**; 126: 1639– 1645
74. **Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK.** Rho-kinase mediates hypoxia induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **2002**;106:57-62
75. **Rikitake Y, Liao JK.** Rho GTP'ases, statins and nitric oxide. *Circ Res*, **2005**;97:1232-1235
76. **Tiftik RN, Erol A, Çınar MG, Kubat H, Ark M, Ülker S, Büyükaşar K.** Nitric oxide does not downregulate Rho-kinase (ROCK-2) expression in rat coronary endothelial cells. *Cardiovascular Pharmacology*, **2008**; 51(2):140-7.
77. **Matsumura S, Abe T , Mabuchi T, Katano T , Takagi T , Okuda-Ashitaka E , Tatsumi S , Y Nakai Y, Hidaka H, Suzuki M , Yasuharu Sasaki Y, Minami T, Ito S.** Rho-kinase mediates spinal nitric oxide formation by prostaglandin E2 via EP3 subtype. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**; 338 550–557
78. **Cetin S, Leaphart CL, Li J, Ischenko I, Hayman M, Upperman J, Zamora R, Watkins S, Ford HR, Wang J, Hackam DJ.** Nitric oxide inhibits enterocyte migration through activation of RhoA-GTPase in a SHP-2-dependent manner. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **2007**; 292: G1347-G1358.
79. **Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane D.** adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **1997**. 13: 231–259
80. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS.** Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*, **1998**; 78 (3): 783-809
81. **Gregoire FM.** Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell. *Exp Biol Med*, 2001; 226 (11): 997–1002
82. **Feve B.** Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2005**; 19 (4): 483–499
83. **Kanzaki M, Pessin JE.** Caveolin-associated Filamentous Actin (Cav-actin) Defines a Novel F-actin Structure in Adipocytes. *The Journal of Biological chemistry*, **2002**; 277(29): 25867–25869

7. Özgün Değeri: Önerilen çalışmanın özgün değeri açıkça belirtilmelidir. Önerilen yeni teknoloji, metot veya kuramın literatüre nasıl bir katkısı olduğu açıklanmalıdır. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir.)

Yağ dokuda eNOS, iNOS ve Rho kinaz'ın ekspresyonunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra nitrik oksidin ve Rho kinaz'ın ayrı ayrı adiposit proliferasyonu ve diferensiyasyonu üzerine etkileri farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak nitrik oksidin yağ dokuda RhoA/Rho-kinaz/LIM-kinaz yoluyla ile etkileşimini ortaya koyan ve bu etkileşimin Rho-kinaz'ın alt efektörü olan LIM-kinaz

ekspresyonu ve aktin hücre iskeleti ile ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe nitrik oksidin proliferasyon, diferensiyasyon ve aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine etkileri incelenecek ve Rho/rho-kinaz yolağının bu etkilere olası katkısı araştırılacaktır. Çalışmamız önemli bir sağlık sorunu haline gelen obezite ile ilgili moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

8. Yaygın Etkisi/Katma Değeri: Projenin gerçekleştirilmesi sonucunda ulusal ekonomiye, toplumsal gönence ve bilimsel birikime yapılabilecek katkılar ve sağlanabilecek yararlar tartışılmalı, elde edileceği umulan sonuçlardan kimlerin ne şekilde yararlanabileceği belirtilmelidir. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir.)

Günümüzde obezite, pandemi olarak adlandırılacak kadar hızlı bir artış göstermektedir ve özellikle morbidite ve mortalitesi yüksek kalp hastalıkları, kanser, insülin direnci ve diyabet gibi kronik hastalıklarla ilişkisinden ötürü önlenmesi ve tedavisi büyük önem taşıyan bir sağlık sorunudur. Bu nedenle, obezitede rol oynayan moleküler mekanizmaların açık olarak ortaya konulması etkin tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini sağlayarak toplumsal refaha ve ulusal ekonomiye önemli katkılar sağlayacaktır.

Yağ dokuda eNOS, iNOS ve Rho kinaz'ın ekspresyonunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra nitrik oksidin ve Rho-kinaz'ın adiposit proliferasyonu ve diferensiyasyonu üzerine etkilerini gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Ancak, şu ana kadar nitrik oksidin yağ dokuda oluşturduğu etkilerine RhoA/Rho-kinaz yolağının bir katkısının olup olmadığını ortaya koyan ve bu etkileşimin Rho-kinaz'ın alt efektörü olan LIM-kinaz ekspresyonu ve aktin hücre iskeleti ile ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, nitrik oksidin preadipositlerde (3T3-L1) proliferasyon, diferensiyasyon ve aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine etkilerini incelemeyi ve Rho/rho-kinaz yolağının bu etkilere olası katkısını araştırmayı planladık. Çalışmamız bu yönüyle literatüre bütüncül ve farklı bir bakış getirmeyi ve önemli bir sağlık sorunu haline gelen obezite ile ilgili moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

9. Yöntem: Araştırmanın tasarımı/yaklaşımları ile uyumlu olarak incelenmek üzere seçilen (amaç ve kapsamla uyumlu olması da gereken) parametreler sıralanmalıdır. Bu parametrelerin incelenmesi için uygulanacak yöntem ile kullanılacak materyal açık-seçik biçimde tanımlanmalıdır. Yapılacak ölçümler (ya da derlenecek veriler), kurulacak ilişkiler ayrıntılı biçimde anlatılmalıdır. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir.)

Hücre Kültürü

Adiposit diferensiyasyonunun araştırılması amacı ile kullanılan hücre kültürleri ya fare, sıçan veya insandan alınan yağ dokularının stromal vasküler fraksiyonundan elde edilen primer kültürler ya da klon hücre kültürleridir (79, 80). Klon hücre kültürleri iki tipte olabilir: adipoz hücre soyuna (lineage) yönelmemiş fibroblastik multipotent hücre kültürleri ya da adipoz hücre soyuna yönelmiş preadiposit hücre kültürleri. Klon hücre kültürlerinin primer kültürlerle kıyasla homojen bir hücre popülasyonu sağlamak ve sınırsız sayıda kültüre edilebilmek gibi avantajları bulunmaktadır. Bu hücre kültürlerinin adipositlere diferensiyasyonunun indüklendiğinde hücreler yapısal ve biyokimyasal olarak adiposit karakteristiklerini gösterirler (80). Bunun yanı sıra bu hücreler farelerin abdominal bölgesine inoküle edildiklerinde, görünüm olarak normal yağ dokudan ayırt edilemeyen beyaz yağ doku oluşturmuşlardır

(82). Diferensiyasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan klon hücre tipi 3T3-L1 hücreleridir. Hem primer preadiposit hücre kültürleri hem de klon hücre kültürleri diferensiyasyon için temas inhibisyonuna gereksinim duyarlar. Bu nedenle, hücre diferensiyasyonu çalışması için hücre kültürlerinin konflüent hale gelmesi beklenir. Ayrıca diferensiyasyon için hücre kültür ortamına deksametazon, 3-izobütül-1-metilksantin (IBMX) ve insülin gibi diferensiyasyon indükleyicilerin katılması gerekmektedir (81).

Bu çalışmada yurtdışından dondurulmuş olarak satın alınıp kullanılacak olan beyaz yağ hücresi öncülü fare embriyonik fibroblast klon hücre tipi olan 3T3-L1 hücreleri kullanılacaktır. Başlangıç klon hücre kültürü, hücre kültürü odasında yatay akım kabininde oda sıcaklığına getirilerek çözüldükten sonra 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına ekilerek %10 CS/DMEM'de inkübe edilecektir. Hücre kültür medyumunu her gün değiştirilerek hücreler çoğaltılacak, hücreler konfluent olmadan önce her 3. günde yeni flasklara pasajlanacaktır. Bu şekilde çoğaltılan 3T3-L1 hücrelerin bir kısmı daha sonraki çalışmalar için kullanılmak üzere dondurulacak ve -80°C sıcaklıkta saklanacaktır.

Diferensiyasyon protokolü

Hem deney hem kontrol gruplarında diferensiyasyonun indüklenmesi amacı ile aynı protokol kullanılacaktır: Hücreler konfluent olana kadar %10 CS/ DMEM'de (%10 calf serum/ Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu) çoğaltılacak, konfluent olduğu gün 0.gün kabul edilerek, hücreler iki gün süreyle %10 CS/ DMEM'de çoğaltılıp, ardından 0.5 mM IBMX, 0.25 µM deksametazon, ve 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM'de (fetal sığır serumu/Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu) 2 gün diferensiyasyon indüklenecek, ardından 2 gün süresince hücreler insülin içeren %10 FBS/DMEM içerisinde inkübe edilecektir ve devamında 8. Güne kadar %10 FBS/DMEM de inkübasyon sürdürülecektir. Medyum her gün değiştirilecektir.

Diferensiyasyonun değerlendirilmesi

Deney ve kontrol gruplarında diferensiyasyon ve hücre içi lipid birikiminin değerlendirilmesi için ayrılmış hücreler 8. gün 2 kez PBS (fosfatla tamponlanmış tuzlu su solüsyonu) ile yıkanacaktır. Bunu takiben hücreler 1 saat süresince fikse edilip ardından % 0.6 Oil Red-O solüsyonunda (%60 izopropil alkol, %40 su) 2 saat süre ile oda ısısında bekletilerek boyanacaktır. Boyanan hücreler makroskopik ve mikroskopik olarak görüntülenecektir. Hücreler daha sonra bağlanmamış boyayı çıkarmak için distile suyla yıkanacaktır. Bağlı (boyanmış) Oil Red-O izopropil alkol ile hücrelerden ayrıştırılacak ve ELISA okuyucu cihazda 510 nm optik adsorbansta ölçülerek miktarı tayin edilecektir.

Diferensiyasyonun değerlendirilmesi amacı ile kullanılacak diğer metod gliserol-3 fosfat dehidrogenaz (GPDH) enziminin aktivitesinin analizidir. Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz enzimi NAD'i (Nikotinamid adenin dinükleotid) koenzim olarak kullanarak dihidroksiaseton fosfat ile gliserol-3-fosfat arasında reversibl bir reaksiyonu katalize eder. Bu enzimin aktivitesi öncül hücrelerin adipositlere diferensiyasyonu sırasında anlamlı olarak artar. Bu nedenle GPDH enzim aktivitesinin izlenmesi, yağ

sentezinin göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Hem kontrol hem de deney gruplarında GPDH enziminin aktivitesinin analizi için ayrılmış hücreler 8. gün iki kez PBS ile yıkanacak, ardından 30 dakika süresince 37°C’de lizis tamponunda (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM β-merkaptotanol) inkübe edilecektir. Ardından hücreler kazınacak ve 4°C’de 15000 rpm (dakikada devir sayısı) hızda 30 dakika boyunca santrifüjlenecektir. Daha sonra 0.2 M trietanolamin-EDTA tamponu, 89µg/ml NADH ve 1 mM β-merkaptotanol 100 µl hücre lizatına son hacim 1 ml olacak şekilde eklenecektir. 36.4 µg/ml dihidroksiaseton fosfatın eklenmesinden sonra hızla 366 nm adsorbansta NADH oksidasyonu ölçülecektir.

Proliferasyonun değerlendirilmesi

Hücre proliferasyonunu değerlendirmek amacı ile günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazları tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi ve ortaya çıkan bu ürünün miktarının bir spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan hızlı ve güvenilir bir metod olan MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) hücre proliferasyon analizidir. Hem kontrol hem de deney gruplarında adiposit proliferasyonunun değerlendirilmesi için ayrılmış hücrelere MTT hücre proliferasyon analizi yapılacaktır. Bu amaçla hücreler pleytlere ekilerek 0, 2, 4, 6, 8. günlerde hücreler fenol red içermeyen RPMI1640 ile yıkancaktır. Ardından filtre edilmiş 0.5mg/ml konsantrasyondaki MTT solüsyonundan medyumdaki MTT oranı %15 olacak şekilde eklenecek ve 37°C’de 3 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon periyodunun bitiminde değişmemiş MTT dikkatle boşaltılacak ve oluşmuş olan formazan kristalleri 1 ml asidifiye edilmiş izopropil alkol (absolü izopropil alkol içerisinde 0.04 M HCl) eklenerek çözülecektir. Formazan kristallerinin tümüyle çözüldüğünden emin olmak için solüsyon uniform bir renk alana kadar birkaç kez pipetaj yapılacaktır. Ardından 570 nm adsorbansta ELISA okuyucusunda okunacaktır. Negatif kontrol olarak hücresiz pleytlere aynı yolla uygulanmış MTT’nin adsorbansı ölçülecektir.

Aktin hücre iskeleti boyanması

Adipogenez sırasında adipositler fibroblastik hücrelerden yuvarlak lipid yüklü hücrelere dönüşürler. Daha önceki çalışmalarda adiposit diferensiyasyonu sırasında aktin hücre iskeleti organizasyonunun fibroblastlardaki tipik stres lifi aktin yapısından adipositlerin plazma membranının iç yüzeyindeki görece kalın kortikal aktin hattına dramatik değişimi gösterilmiştir (83, 84). Bu nedenle, çalışmamızda kontrol ve deney gruplarında adiposit diferensiyasyonu sırasında oluşan aktin hücre iskeleti organizasyonundaki değişimleri göstermek amacı ile F-aktin’e özgü fluoresan boyalar olan ve Amanita Phalloides’ten izole edilen falloidin türevlerinden birisi olan oregon green falloidin’i kullanmayı planlamaktayız. Oregon green falloidin, nanomolar konsantrasyonlarda kullanılmakta, antikordardan farklı olarak F-aktin’e bağlanma kapasitesi doku ya da hücrenin türüne ya da kaynağına göre değişmemekte, nonspesifik bağlanma gözardı edilebilecek düzeyde olmakta ve boyanmış bölgeler ile

boyanmamış bölgeler arasındaki kontrast çok belirgin olmaktadır.

Hem kontrol hem de deney gruplarında 0, 2, 4, 6, 8. günlerde aktin hücre iskeleti boyanması için ayrılmış 3T3-L1 hücreleri önce 1 dakika % 4 formaldehit ve % 0.1 triton X içeren PBS'de fikse edilecektir. Ardından hücreler % 4 formaldehit içeren PBS'de 15 dakika inkübe edilecektir. Hücreler 5 dakika süresince % 0.1 triton X içeren PBS'de yıkanarak permeabilize edilecek ve %3 sığır serum albümini içeren PBS'de 60 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edilecektir. Hücreler oregon green falloidin ile boyanarak F-aktin (fibriler aktin) fluoressan mikroskopta görüntülenecektir.

Western blot protokolü

Kontrol grubu

0, 2, 4, 6, 8. günlerde eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve Rho-kinaz enziminin aktivite göstergesi olan LIMK fosforilasyonu bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

Deney grupları

Grup 1: 0-8. günler arasında hücre kültürü ortamında nitrik oksit donörü DETA-NO (2,2'-(Hidroksinitrozohidrazono) bis-etanimin) varlığında (10^{-8} - 10^{-6} M), RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve Rho-kinaz enziminin aktivite göstergesi olan LIMK fosforilasyonu bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

Grup 2: 0-8. günler arasında nitrik oksit donörü sodyum nitrit (NaNO_2) varlığında (10^{-4} - 10^{-3} M) RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu, bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

Grup 3: 0-8 günler arasında hücre kültürü ortamında iNOS indükleyicisi lipopolisakkarid (LPS) varlığında (10-100 ng/ml) ya da yokluğunda eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu gösterilecek ve NOS enzim inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) uygulaması ile eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonunun ne ölçüde değişeceği, bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

Grup 4: 0-8 günler arasında hücre kültürü ortamında iNOS indükleyicisi lipopolisakkarid (LPS) uygulamasının (10-100 ng/ml) eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu üzerine etkisi, bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

Grup 5: 0-8. günler arasında hücre kültürü ortamında spesifik Rho-kinaz inhibitörü (S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-isokinolinil) sulfonil] homopiperazin, 2HCl (H1152) varlığında (10^{-8} - 10^{-7} M) eNOS, iNOS, RhoA, ROCK-1, ROCK-2, LIMK enzim ekspresyonları ve LIMK fosforilasyonu bu enzimlerin özgül antikoları kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize

edilecektir.

Grup 6: 0-8. günler arasında hücre kültürü ortamında Rho aktivatörü lizofosfatidik asit (1-Oleoyl-*sn*-gliserol 3-fosfat sodyum tuzu) varlığında (10^{-7} - 10^{-6} M), RhoA translokasyonu, iNOS ve eNOS enzim ekspresyonu özgül antikorlar kullanılarak Western blot yöntemi ile gösterilecektir. Sonuçlar β -aktin'e göre normalize edilecektir.

10. Yönetim Düzeni: Projede görev alacak yürütücü ve araştırmacıların adları belirtilerek herbirinin projedeki işlevi, sorumluluğu, projeye katkı oranları (%) ve çalışma ilişkileri tanımlanmalıdır. (TEZ PROJELERİ HARİÇ)

ARAŞTIRMACI Ad, Soyad, Ünvan	PROJEDEKİ GÖREVİ (Yürütücü/Araştırmacı)	PROJEYE KATKI ORANI (%)
PROJEDEKİ SORUMLULUĞU ve ÇALIŞMA İLİŞKİLERİ		
PROJEDEKİ SORUMLULUĞU ve ÇALIŞMA İLİŞKİLERİ		
PROJEDEKİ SORUMLULUĞU ve ÇALIŞMA İLİŞKİLERİ		
PROJEDEKİ SORUMLULUĞU ve ÇALIŞMA İLİŞKİLERİ		

11. Araştırma Olanakları: Öneren kuruluştaki var olan ve projede kullanılacak altyapı olanakları bu bölümde verilecektir. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir)

Çalışmamızda ME. Ü. T. F. Farmakoloji anabilim dalında mevcut olan hücre kültürü odasındaki hücre kültürü cihazları (liste aşağıda verilmiştir.) ve Western blot analizi için gerekli ekipman kullanılacak, aktin hücre iskeletinde oluşacak değişikliklerin görülmesi amacı ile hücrelerin boyanması ve floresan mikroskopta görüntülenmesi işlemleri ME. Ü. T. F. Mikrobiyoloji Anabilim dalında mevcut bulunan floresan mikroskop kullanılarak yapılacaktır. Bölümümüzün altyapı olanakları bu projeyi yürütmek için yeterlidir.

12. PROJEDE KULLANILACAK MEVCUT MAKİNE – TEÇHİZAT LİSTESİ*

ADI/MODELİ	PROJEDE KULLANIM AMACI
Heal Force HFsafe 1200/C+safety cabinet Laminar Flow cihazı	Hücre Kültürü uygulamaları için
Heal Force HF90 Smart Cell inkübatör	Hücre kültürü uygulamaları için
Nüve SL350 rotary shaker	Western blot uygulamaları için
Velp scientifica Rx3 vortex	Solüsyon hazırlama işlemleri için
Hettich Mikro 22 R desktop santrifüj	Hücre kültürü ve izolasyon işlemleri için
Electrolux Buzdolabı/ Derin dondurucu	Hücre kültürü malzemelerinin saklanması için
Bosch -20°C derin dondurucu	Hücre kültürü malzemeleri ve izole hücre ve proteinlerin saklanması için
BioRad Mini Protean 3 cell elektroforez sistemi	Western blot çalışmaları için
BioRad Mini Transblot elektroforetik tranfer sistemi	Western blot çalışmaları için
BioRad Power Pac 300 güç kaynağı	Western blot çalışmaları için
Thermo Electron corporation Jouan VX 490S -80° C derin dondurucu	İzole hücre ve proteinlerin saklanması için
Organon Teknika microwell system reader 230 s ELISA okuyucu	Western blot için protein miktar tayini, MTT hücre proliferasyon analizi ve diğer spektrofotometrik ölçümler için
Olympus BX50 floresan mikroskop	Aktin hücre iskeleti değişimlerin floresan boyama ile görüntülenmesi için

Fakülte/Yükseköğretim kurumlarının ilgili birimlerinde mevcut olup projede kullanılacak olan makine ve teçhizatın dökümü yapılmalıdır.

13 – PROJENİN AŞAMALARI
(Çalışma Takvimine Ek)

AŞAMA	İŞ TANIMI	TAHMİNİ TARİH VEYA ZAMAN ARALIĞI	GÖREVLİ PERSONEL
	Proje için gerekli malzemelerin temin edilmesi	4 ay	Arş. Gör. Dr. A. Sencer Yurtsever, Arş. gör. Vet. Hek. A. Hakan Kurt, Arş. Gör. Ecz. Özge Güldalı, Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün, Prof. Dr. Kansu Büyükaşar
	3T3-L1 hücre kültürü ortamının başlatılması ve ön deneyler	4 ay	Arş. Gör. Dr. A. Sencer Yurtsever, Arş. gör. Vet. Hek. A. Hakan Kurt, Arş. Gör. Ecz. Özge Güldalı, Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün, Prof. Dr. Kansu Büyükaşar
	Diferensiyasyonun değerlendirilmesi	4 ay	Arş. Gör. Dr. A. Sencer Yurtsever, Arş. gör. Vet. Hek. A. Hakan Kurt, Arş. Gör. Ecz. Özge Güldalı, Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün, Prof. Dr. Kansu Büyükaşar
	Western blot analizi çalışmaları	4 ay	Arş. Gör. Dr. A. Sencer Yurtsever, Arş. gör. Vet. Hek. A. Hakan Kurt, Arş. Gör. Ecz. Özge Güldalı, Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün, Prof. Dr. Kansu Büyükaşar
	Sonuçların değerlendirilmesi ve literatür araştırması	4 ay	Arş. Gör. Dr. A. Sencer Yurtsever, Arş. gör. Vet. Hek. A. Hakan Kurt, Arş. Gör. Ecz. Özge Güldalı, Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün, Prof. Dr. Kansu Büyükaşar
	Proje sonuç raporunun yazılması	4 ay	Arş. Gör. Dr. A. Sencer Yurtsever, Arş. gör. Vet. Hek. A. Hakan Kurt, Arş. Gör. Ecz. Özge Güldalı, Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün, Prof. Dr. Kansu Büyükaşar

14. Başarı Ölçütleri ve B Planı: Hangi işlemlerin, ne ölçüde gerçekleştirilmesi durumunda projenin tam anlamıyla başarıya ulaşmış sayılabileceği belirtilmelidir. Bu ölçütler açık olarak sıralanmalı, herbirinin önem derecesi açıklanmalı, tümünün gerçekleştirilememesi durumunda, başarı oranı belirlenmesine yardımcı olabilecek ipuçları verilmelidir. Projenin önerildiği şekilde yürütülmesini önemli ölçüde aksatan öngörülmemiş gelişmelerle karşılaşılması durumunda başvurulacak "B Planı" ana hatlarıyla açıklanmalıdır. (Yazım alanı gerektiği kadar uzatılabilir.) (TEZ PROJELERİ için tez başlığı ve konu değişikliğinin gerekli görüldüğü hallerde)

--

15. Bütçe ve Gerekçesi:

Proje Bütçesi düzenlenirken; satın alınması öngörülen teçhizat, satın alınacak sarf malzemesi ve hizmet türleri ile istenen seyahat ödenekleri ile ilgili bilgiler, projede yardımcı personel veya bursiyer olarak görev alacak kişilerin (yüksek lisans öğrencisi, doktora öğrencisi, doktora sonrası araştırmacı, teknisyen, mühendis vb) sayısı, niteliği, projede görev alacağı süre (ay olarak) ve aylık burs miktarı/aylık ücreti (tüm yasal kesintiler dahil brüt ücret) ve projede yapacakları çalışmalar ekteki tablo formatlarında verilmelidir.

GENEL BÜTÇE (YTL)

Önerilen (Doldurunuz)

Katkı Kaynağı	Makine Teçhizat	Sarf Malzemesi	Hizmet Alımı	Seyahat	Bursiyer*	Toplam
BAP Biriminden talep edilen		10.000 YTL				10000 YTL
Öneren Kuruluş Katkısı						
Destekleyen Diğer Kuruluş						
Toplam		10.000 YTL				10.000 YTL

Onaylanan (Boş Bırakınız)

Katkı Kaynağı	Makine Teçhizat	Sarf Malzemesi	Hizmet Alımı	Seyahat	Bursiyer*	Toplam
BAP Biriminden onaylanan						
Düzeltilmiş Toplam						

*Kullanımına izin verildiği takdirde

BÜTÇE GEREKÇESİ

Makine Teçhizat

Makina ve teçhizat alımı yapılmayacaktır.

Sarf Malzemesi

3T3-L1 klon preadiposit hücre kültüründe nitrik oksidin adiposit proliferasyonu, diferensiyasyonu, aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine etkilerinin incelenmesi ve bu etkide Rho/Rho-kinaz yolağının olası katkılarının araştırılması amacı ile yapılacak olan hücre kültürü çalışmaları, adiposit diferensiyasyonunun ve proliferasyonunun değerlendirilmesi ve western blot çalışmaları ile fluoresan mikroskopta Oregon green falloidin ile boyanmış hücrelerin görüntülenmesi amacı ile satın alınıp kullanılacaktır.

Hizmet Alımı

Hizmet alımı yapılmayacaktır.

Bursiyer

Çalışmada bursiyer bulunmamaktadır.

Seyahat

Çalışma ile ilgili bir seyahat planlanmamıştır.

SONUÇ

Çalışmamız hücre kültürü çalışması için laboratuvarımızda hazırlanan hücre kültürü odasının altyapı olanakları ve western blot için mevcut bulunan makine teçhizat ile yapılacaktır. Önerilen bütçe deneylerin yapılabilmesi için gerekli asgari miktarda sarf malzemesinin alımı amacı ile kullanılacaktır.

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ/ FARMAKOLOJİ BÖLÜMÜ/ANABİLİM DALI
VAR OLAN ALT YAPI OLANAKLARI**

A- MAKİNE VE TEÇHİZAT

Heal Force HFsafe 1200/C+safety cabinet Laminar Flow cihazı	Hücre Kültürü uygulamaları için
Heal Force HF90 Smart Cell inkübatör	Hücre kültürü uygulamaları için
Nüve SL350 rotary shaker	Western blot uygulamaları için
Velp scientifica Rx3 vortex	Solüsyon hazırlama işlemleri için
Hettich Mikro 22 R desktop santrifüj	Hücre kültürü ve izolasyon işlemleri için
Electrolux Buzdolabı/ Derin dondurucu	Hücre kültürü malzemelerinin saklanması için
Bosch -20°C derin dondurucu	Hücre kültürü malzemeleri ve izole hücre ve proteinlerin saklanması için
BioRad Mini Protean 3 cell elektroforez sistemi	Western blot çalışmaları için
BioRad Mini Transblot elektroforetik tranfer sistemi	Western blot çalışmaları için
BioRad Power Pac 300 güç kaynağı	Western blot çalışmaları için

B- SARF MALZEMESİ

C- HİZMET ALIMI

ALINMASI ÖNERİLEN MAKİNE – TEÇHİZAT LİSTESİ(*)			
ADI/MODELİ	ALIM TÜRÜ	TOPLAM BEDELİ (KDV dahil YTL)	KULLANIM GEREKÇESİ(**)
	<input type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı		
	<input type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı		

(*) İstenilen teçhizatla ilgili teknik şartname ile proforma fatura ya da teklif mektubu eklenmelidir.

(**) Gerekli olduğunda ek sayfada açıklama yapınız.

ALINMASI ÖNERİLEN SARF MALZEME LİSTESİ*		
ADI	ALIM TÜRÜ	TOPLAM BEDELİ (KDV dahil YTL)
p-LIMK-1/2(Thr 508/505)-R antikor(Santa Cruz: sc 28409-R)	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	800
LIMK-2 (H-78) antikor (Santa Cruz: sc-5577)	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	800
LIMK-1 (H-84) antikor (Santa Cruz: sc-5576)	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	800
(S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-isokinolinil) sulfonil] homopiperazin, 2HCl.(H1152) 1 mg(Calbiochem: 555550)-Rho kinaz inhibitörü	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	800
NOS2(C-19) antikor (Santa Cruz: sc-649)	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	800
NOS3(C-20)antikor (Santa Cruz: sc-654)	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	800

Oleoyl-L- α -lizofosfatidik asit sodyum tuzu 1 mg (Sigma-aldrich -L7260) 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	143
Hücre kültürü çoklu kuyucuklu plate 24 kuyucuklu(100 adet/paket) 2 paket	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	260
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1X) likid (yüksek glukoz içerikli) 20 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	350
Dihydroxyacetone phosphate dilithium salt (Sigma-Aldrich: D7137) 5 mg 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	260
β -Nicotinamide adenine dinucleotide,reduced, disodium salt hydrate (NADH) 100 mg (Sigma-Aldrich:N8129) 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	95
Triethanolamine Buffer solution120 ml(Sigma-Aldrich:T0449) 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	110
Eppendorf tüpü 1.5 ml steril. 1 paket	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	55
15 ml tüp steril(100 ad/paket) 1 paket	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	55
Tripsin EDTA sol 100 ml 4 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	22
General Cell Collection: 3T3 L1 mouse embryo (HPA: 86052701) frozen 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	500
FBS (invitrogen:10106-169) 1adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	200
L- Glutamine 100 ml (Biochrom:K0283) 2 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	75
Penicilline/ streptomycine 100 ml (Biochrom A2213) 3 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	75
Amphotericin B 50 ml (Biochrom: A2612) 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	75
Oregon green phalloidin 488, 300 U amb.(Invitrogen 07466) 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	1600
Bovine calf serum(heat inactivated) 500 ml 3 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt ii <input type="checkbox"/> Yurt dışı	600
2 ml hacimde vidalı kapaklı kryotüp100 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	50
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich: M5655) 1 gr. 1 adet	<input checked="" type="checkbox"/> Yurt içi <input type="checkbox"/> Yurt dışı	130

*Alan gerektiği kadar uzatılabilir. Proforma faturalar mutlaka eklenmelidir.

HİZMET ALIMI LİSTESİ		
İÇERİĞİ	NEREDEN/KİMDEN ALINACAĞI	TOPLAM BEDELİ (KDV dahil YTL)

SEYAHAT GİDERLERİ			
	KiŐi Adedi	Seyahat Adedi (kez)	Toplam (gün/kiŐi)
Yolluk (*)			
Harcırah			
Araç Kirası			-

(*) Yol gideri özel oto veya resmi oto olması halinde katedilen mesafe tahmini km olarak bildirilecektir.

16. Özgeçmiş: Yürütücü ve araştırmacıların özgeçmişleri(Mersin Üniversitesi Akademik Personel Bilgi Sistemi çıktısı), ekte verilen formatta hazırlanarak eklenmelidir.

DAHA ÖNCE VEYA HALEN YÜRÜTÜCÜ VE/VEYA ARAŞTIRICI OLARAK GÖREV ALDIĞI BAP PROJELERİ

Projedeki Görevi	Proje Adı ve Kodu	Projeden Çıkan Yayınlar (ulusal/uluslararası makale, bildiri, poster. İstenirse ayrı bir sayfa olarak verilebilir)	Sonuçlanma Tarihi
Yürütücü	İnsan Safra Kesesi Kontaktıl Aktivitesinde Rho/Rho-kinaz Sinyalizasyonunun Olası Rolü. BAP-TF DTB (KB) 2005-2	Büyükaşar K, Akça T, Tiftik RN,Şahan-Fırat S, Aydın S.Contribution of Rho-Kinase in human gallbladder contractions. <i>Eur. J. Pharmacol</i> , 2006; 540:162-167	21.12.2006
Araştırmacı	Rho-kinaz ve Siklooksijenaz İnhibitörleri ile Siklofosfamid Kombinasyonlarının Çeşitli Tümör Hücre Serilerine Etkileri. BAP-SBE TTB (ED) 2006-1 DR	Derici E, Aras Ateş N, Büyükaşar K,Tiftik RN.Kronik myeloid lösemi K562 hücre hattında siklofosfamidin apoptoza etkisi. <i>Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi</i> , 2008;1(2):12-18	01.06.2008
Yürütücü	Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Androjenik Hormonların Rho-Kinaz ekspresyonu Üzerine Etkisi. BAP-SBE FB (AHK) 2006-3 YL	Yayın hazırlığı devam ediyor	08.12.2007
Yürütücü	İnsan Eritrositlerinde Rho Rho-kinaz sinyal ileti Mekanizmasının Fonksiyonel Önemi. BAP-SBE FB (RNT) 2007-2 DR	Devam ediyor	
Araştırmacı	İnce Barsaklarda İskemi ve Reperfüzyon Uygulanan Deneklerde Rho-kinaz inhibitörü Y 27632 Uygulamasının kan ve doku lipid peroksidasyonu, ROCK ve ekspresyonu ve ileal patoloji üzerin etkisi.BAP-TF CTB (MMD) 2007-2	Yayın hazırlığı devam ediyor	25.08.2008
Araştırmacı	Deneysel Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Astrosit Kök Hücre Naklinin Bilişsel ve motor Yetiler Üzerine Etkilerinin Araştırılması. BAP-TF ÇSH (BAÖ) 2008-3 TU	Devam ediyor	

ÖZGEÇMİŞ
(Mersin Üniversitesi Akademik Personel Bilgi Sistemi çıktısı)

1. GENEL

DÜZENLEME TARİHİ	:	
T.C. KİMLİK NO	:	29998749692
ÜNVANI ADI SOYADI	:	Prof. Dr. Kansu Büyükaşar
YAZIŞMA ADRESİ	:	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD Yenişehir Kampüsü Yenişehir/ Mersin
DOĞUM TARİHİ ve YERİ	:	09/02/1969 K. Maraş
TEL : 3412815/1006		GSM: 05333494001
E-POSTA : kbuyukafsar@mersin.edu.tr		FAKS : 3412312

2. EĞİTİM (Son aldığınız dereceden / diplomadan başlayarak yazınız)

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE (*)	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
1994-1996	Doktora	Çukurova Üniversitesi	Farmakoloji
1991-1994	Yüksek Lisans	Çukurova Üniversitesi	Farmakoloji
1990-1991	Yabancı Dil Hazırlık	Çukurova Üniversitesi	İngilizce
1986-1990	Lisans	Ege Üniversitesi	Eczacılık
1983-1986	Lise	Ferit Çobanoğlu Ticaret Lisesi, Adana	
1980-1983	Ortaokul	Yavuzlar Ortaokulu, Adana	
1975-1980	İlkokul	Mimar Sinan İlkokulu, Adana	

(*) Diploma Türü (Lisans, Y.Lisans, vb.)

3. AKADEMİK ve MESLEKİ DENEYİM

GÖREV DÖNEMİ	ÜNVAN	ÜNİVERSİTE	BÖLÜM
1991-1996	Arş. Gör.	Çukurova Üniversitesi	Tıp Fakültesi Farmakoloji AD
1999-2001	Yrd. Doç. Dr.	Mersin Üniversitesi	Tıp Fakültesi Farmakoloji AD
2001-2006	Doç. Dr	Mersin Üniversitesi	Tıp Fakültesi Farmakoloji AD
2006	Prof. Dr.	Mersin Üniversitesi	Tıp Fakültesi Farmakoloji AD

4. YAYIN BİLGİLERİ

ISI indexine kayıtlı dergilerde yayınlanan	31
Diğer indexlere kayıtlı / Hakemli dergilerde yayınlanan	1
Indexlere kayıtlı / Hakemli konferans kitaplarında yayınlanan	
Diğer yayınlar	
TOPLAM	32

5. YAYINLARINIZA ALDIĞINIZ TOPLAM ATIF SAYISI (*Web of Science*'a göre) : 200

6. PROJE DENEYİMİ

YER ALDIĞINIZ PROJE SAYISI	Proje yürütücüsü olarak	Araştırmacı olarak
Kurumsal (BAP vb.)	4	2
Ulusal	1	1
Uluslararası		

7. DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER (Hakemlik/Danışmanlık/Editörlük Deneyimi)

Son bir yılda uluslararası indekslere kayıtlı makale/derleme için yaptığımız danışmanlık sayısı	3		
Son bir yılda projeler için yaptığımız danışmanlık sayısı	3		
Danışmanlığımızı yaptığımız öğrenci sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Y.Lisans	4	1
	Doktora		2
	Uzmanlık	2	1
Editör/Yardımcı Editör olduğunuz dergiler	1- 2- 3-		

8. SEÇİLMİŞ YAYINLAR (Proje konusuyla ilgili en önemli 5 yayınıız)

YAZAR(LAR)	MAKALE/BİLDİRİ BAŞLIĞI	DERGİ/TOPLANTI ADI	CİLT/SAYI/SAYFA	TARİH
Tiftik RN, Erol A, Çınar MG, Kubat H, Ark M, Ulker S, Büyükaşar K	Nitric oxide does not downregulate Rho-kinase (ROCK-2) expression in rat coronary endothelial cells.	Journal of Cardiovascular Pharmacology	51: 140-147	2008
Inan S, Büyükaşar K.	Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice.	British Journal of Pharmacology	155: 44-51	2008
Turna B, Cinar MG, Canda AE, Orhan EC, Tiftik NR, Nazli O, Büyükaşar K	Role of Rho-kinase in contractions of ureters from rabbits with unilateral ureteric obstruction	British Journal of Urology	100: 1166-1171	2007
Levent A, Büyükaşar K	Expression of Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) and its substantial role in the contractile activity of the sheep ureter	British Journal of Pharmacology	143: 431-437	2004
Büyükaşar K, Nelli S, Martin W	Formation of nitric oxide from nitroxyl anion: Role for quinone and ferricytochrome c	British Journal of Pharmacology	132: 165-172	2001

9. PROJE KONUSUNDA YETKİNLİĞİNİZİ VURGULAMAK İÇİN GEREKLİ GÖRDÜĞÜNÜZ DİĞER BİLGİLER

Uzun süredir çeşitli dokularda hem nitrik oksit ve hem de Rho/Rho-kinaz yolağının etkileri üzerine çalışmaktayım. Her iki yolak ile ilgili olarak kapsamlı bir literatür bilgisine sahibim. Nitrik oksit ve Rho/Rho-kinaz yolağının çeşitli doku ve hücrelerde ekspresyonu ve fizyolojik ya da patolojik durumlardaki etkileri ile ilgili olarak yaptığım deneylerin sonuçlarını gösteren çalışmalar ISI web indeksine kayıtlı dergilerde yayınlanmıştır. Laboratuvarımızda Western blot çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca uzun süreden beri çeşitli dokuların primer hücre kültürleri ya da klon hücre hatları ile hücre kültürleri yapılmaktadır. Hücre kültürü için yeterli olanakların bulunduğu hücre kültürü odamız mevcuttur.

17. Diğer: Aşağıdaki “Proje Başvurusu Kontrol Listesi” mutlaka doldurulmalıdır. Bu liste, başvuru sahiplerinin yapmaları gereken kontrolleri hatırlatmak için konulmuştur. Kontrol listenizde bir eksiklik bulunuyor ise Proje Önerinizi MERSİN ÜNİVERSİTESİ Bilimsel Araştırma Proje Birimi’ne yollamadan önce bu eksikliğini tamamlamanız gerekmektedir.

PROJE BAŞVURUSU KONTROL LİSTESİ

Başvuru Formu ve Ekinde Olması Gerekenler:

Başvuru kapak sayfası	Var
İmza sayfaları (Kabul ve Taahhüt Beyanları)	Var
Özet ve Anahtar Kelimeler	Var
Amaç	Var
Konu ve Kapsam	Var
Literatür Özeti	Var
Özgün Değeri	Var
Yaygın Etkisi/Katma Değeri	Var
Yöntem	Var
Yönetim Düzeni	Var
Araştırma olanakları	Var
Başarı Ölçütleri ve B Planı	Var
Bütçe ve Gerekçesi	Var
Proje Ekibinin (yürütücü ve araştırmacılar) Özgeçmişi	Var
Diğer (EKLER)	Var
Başvuruda yer alan tüm dokümanları bire bir içerecek şekilde hazırlanmış CD	Var