

Trombositlerde kollajene bağlı sinyal ileti sistemleri

Dr. Fatih ÖZDENER

Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., Eskişehir

GİRİŞ VE AMAÇ

Damar endoteli herhangi bir neden ile hasara uğradığında, dolaşımdaki trombositler, bir trombosit agonisti olan kollajen ile temas eder ve aktive olurlar. Bu aktivasyonu, ADP, epinefrin ve serotonin gibi bazı ikincil agonistlerin salıverilmesi ve trombin, tromboksan A₂ gibi diğerlerinin de oluşturulması izler ve trombositler pozitif bir aktivasyon döngüsüne girerler¹. Agonist ile temasa geçen trombositler şekil değişikliğine uğrar ve daha sonra agregate olurlar. Agregasyon oluşabilmesi için trombositlerin üzerindeki integrin reseptör $\alpha 2\beta 3$ 'ün aktivasyonu ve fibrinojene bağlanması gerekir. Aynı fibrinojen molekülüne bağlanma birbirine yakın konumdaki trombositlerin agregat oluşturmasına yol açar².

Trombositler üzerinde kollajene bağlanan birden fazla reseptör bulunsada, trombositlerin adezyonunda en önemli rol oynayan reseptörün $\alpha 2\beta 1$ integrin molekülü olduğu, trombosit aktivasyonunun ise sinyal ileten glikoprotein VI (GP VI) aracılığı ile oluşturulduğu genel kabul görmüştür³. GP VI yakın zamanda klonlanmış ve immunoglobulin reseptör süperfamilyasına bağlı olduğu gösterilmiştir⁴. Fc reseptör γ zinciri trombositlerde GP VI ile beraber eksprese edilir ve kollajen-GP VI bağlanması sonucu İmmunoreseptör Tirozin bazlı Aktivasyon Motifindeki (ITAM) tirozinleri fosforile olur^{5,6}. Belkide bir src familyası tirozin kinazınca oluşturulan bu fosforilasyon, fosfolipaz C-gamma-2'nin (PLC $\gamma 2$) fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanan bir sinyal ileti kaskadını başlatır⁷. Bu süreç, sinyal iletimi için G proteinlerini kullanan ve PLC $\beta 2$ 'yi aktive eden diğer trombosit agonistlerinden temel anlamda farklılık göstermektedir. Öte yandan, bu tür aktivasyon, immunoglobulin reseptörlerince lenfositlerde oluşturulan ve G proteinlerinden bağımsız intraselüler kalsiyum mobilizasyonu ve protein kinaz C aktivasyonu ile devam eden iletiye benzerlikler göstermektedir⁸.

GP VI'nın kollajen ile trombositlerin aktivasyonunda sinyal ileti sistemlerinde rol oynayan

en önemli reseptör olduğunun aydınlatılması GP VI ya spesifik agonistler olan konvulksin⁹ ve kollajen ile ilişkili peptid (CRP)'nin¹⁰ kollajene bağlı trombosit cevaplarının araştırılmasında kullanılmasına yol açtı. Bu çalışmalar trombositlerde GPVI aktivasyonu sonrasında yer alan moleküllerin ve olayların kısmen aydınlatılmasını sağlamıştır. Konvulksin stimülasyonu trombositlerde Fc reseptör γ zinciri ve PLC $\gamma 2$ fosforilasyonunu da içine alan ve kollajen stimülasyonuna çok benzeyen bir tirozin fosforilasyonu profili oluşturmaktadır¹¹. Ayrıca, PLC $\gamma 2$ 'nin B lenfosit hücresi ve trombosit fonksiyonlarındaki önemi, uygun reseptörlerle sinyalin yok edildiği gen yıkma (knock-out) çalışmalarıyla da desteklenmiştir^{12,13}. Ancak PLC $\gamma 2$ 'nin moleküller aktivasyonunun mekanizmaları ve bu aktivasyonu trombositlerdeki fizyolojik olaylara ve agregasyona bağlayan yollar bilinmemektedir. Kollajen aracılı trombosit aktivasyonunda oynadığı önemli olası rolü dikkate alarak, çalışmalarımızın ilk bölümünde PLC $\gamma 2$ 'nin aktivasyonunun moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasını hedef aldık^{14,15,16}.

Trombosit reseptörlerini agregasyona bağlayan yollar karmaşıktır. Daha önceki raporlar ADP ye bağlı trombosit agregasyonu için iki ayrı P2 reseptör subtipinden aynı anda sinyal iletimi gelmesi gerektiğini gösterilmiştir (Gq ya kenetli P2Y1 ve Gi'ye kenetli P2Y12)^{17,18}. Benzer şekilde, tromboksan A₂'nin Gq aracılığı ile intraselüler kalsiyumu mobilize edebildiği ve şekil değişikliği oluşturabildiği, ancak agregasyon oluşturabilmesi için, salıverilen ve Gi stimülasyonuna yol açan diğer agonistlere gereksinim duyduğu gösterilmiştir¹⁹. Bu güne kadar tanımlanan hiçbir kollajen reseptörü G proteinlerine kenetli değildir¹. Ancak kollajen stimülasyonu, salıverilen ve G proteinlerine kenetli diğer agonistler aracılığı ile (örneğin tromboksan A₂ ve ADP) G protein aktivasyonuna sebep olabilir. Kollajenin fibrinojen reseptörünü direkt olarak ve pozitif döngü agonistlerine gerek duymadan aktive edip edemediği açık değildir. Biz de, çalışmamızın ikinci kısmında, selektif

agonistler konvulsin ve CRP'yi kullanarak, sekonder G protein sinyal ileti sisteminin, GP VI aracılı trombosit agregasyonunda ne derece katkısı olup olmadığını araştırdık^{20,21}.

MATERYAL ve YÖNTEM

PLC γ 2 Regülasyonu

İnsan PLC γ 2 tüm-uzunluk cDNA'sı pCAL-n bakteriyel ekspresyon vektörü aracılığı ile *E. coli*'de eksprese edildi ve enzim kalmodulin affinite kromatografisi²² ile saflaştırıldı. Purifiye enzim Western blotlama yöntemi ile tanındı ve aktivitesi PtdIns(4,5)P₂ miçellar essey ile test edildi¹⁶. Rekombinan PLC γ 2 rekombinan Lck, Lyn, Fyn tirozin kinazlar ile *in vitro* fosforilasyon reaksiyonuna tabi tutuldu¹⁶. Bu fosforilasyon sonunda aktivitede yükselme olup olmadığı modifiye miçellar essey ile tayin edildi. Aktivasyonda hangi tirozinlerin rol oynadığını tespit etmek amacıyla muhtemel tirozin residüleri, kesişen-polimeraz zincir reaksiyonu (overlapping PCR) yöntemi ile mutasyona uğratarak fenilalanin'e çevrildi²³. Mutant PLC lerin src familyası kinazlarınca fosforilasyonu densitometri ile, bu fosforilasyon sonucu aktivite değişikliği ise modifiye miçellar essey ile tayin edildi ve yabanıl tip ile karşılaştırıldı.

Trombositlerde GP VI Aracılı Aktivasyonun Moleküler Mekanizması²¹

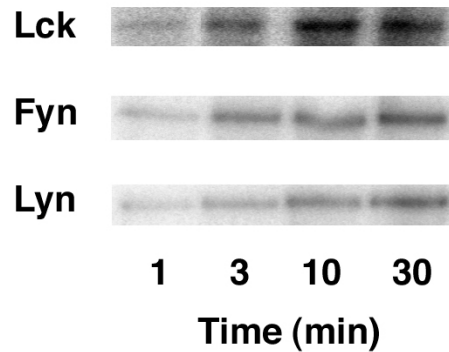
Sağlıklı gönüllü deneklerden trombosit izolasyonu ardışık sentrifugasyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Trombosit agregasyonu lumiagregometrede (Chrono-Log, Havertown, PA), 37° C'de dengelenmiş küvette ve çalkantı halindeki trombositlerde tayin edildi. Ca²⁺ mobilizasyonu çalışmaları için, trombosit zengin plazma önceden Fura PE-3 acetoxy-methyl ester ile inkübe edildi ve daha sonra yıkanan trombositler fluorometriye tabi tutuldu. Ca²⁺ mobilizasyonunun trombosit aktivasyonundaki rolü 5,5'-dimethyl-BAPTA inkübasyonu ile saptandı (sitozolik Ca²⁺ şelatörü). Trombosit sekresyonu [³H] 5-HT ölçümü metodu ile yapıldı. Antagonist eklemeleri agonistten 1 (bir) dakika önce yapılırken, protein kinaz C inhibisyonu için 3 (üç) dakika Ro 31-8220 inkübasyonu yapıldı.

BULGULAR

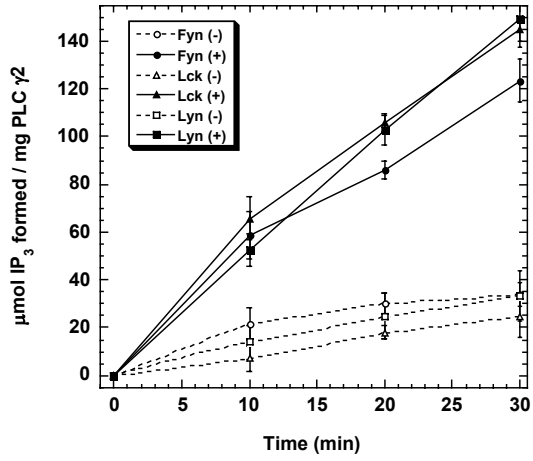
PLC γ 2'nin Tirozin Fosforilasyonu ile Regülasyonu ve Bu Regülasyonun Kollajene Bağlı Trombosit Yanıtındaki Önemi

Fosfolipaz Cgamma2 (PLC γ 2)'nin trombositlerde kollajene bağlı, B lenfositlerinde ise antijene bağlı sinyal iletilerinde rol oynadığı düşünülmektedir. Tirozin kinazların PLC γ 2'yi aktive ettiği ileri sürülmüştür. İnsan PLC γ 2'sinin cDNA'sını bakteride eksprese ettik ve rekombinant enzimi saflaştırdık. Rekombinant enzim aktivitesi optimal aktivite 1 ila 10 microM kalsiyum seviyelerinde olmak üzere kalsiyuma bağımlı idi. Rekombinant PLC γ 2 ve rekombinant Lck, Lyn ve Fyn tirozin kinazları ile yapılan çalışmalar PLC γ 2'nin tirozin fosforilasyonunun enzimi aktive ettiğini gösterdi (Şekil 1 ve 2).

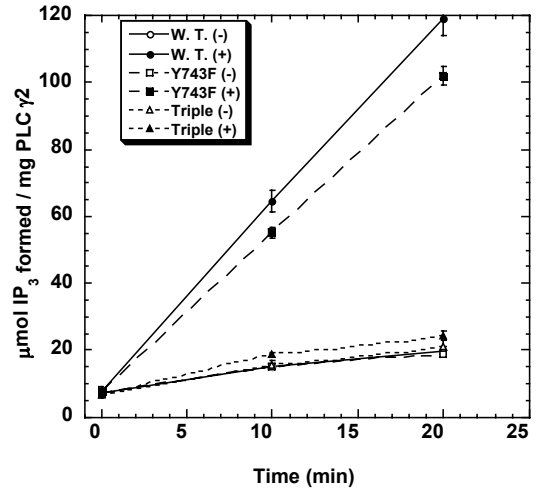
Nokta yönelimli mutajenez çalışmaları ile spesifik tirozin rezidülerinin PLC γ 2'nin aktivasyonunda oynadığı rolü araştırdık. SH2-SH3 bağlanma bölgesinde bulunan 3 tirozin rezidüsünün (T743, T753 ve T759) mutajenez ile fenilalanine çevrilmesi, Lck ile oluşturulan fosforilasyonun azalmasına ve Lck bağımlı PLC γ 2 aktivasyonunun tamamen yok olmasına neden oldu (Şekil 3 ve 4). Bu rezidülerin ayrı ayrı mutajenezi, PLC γ 2'nin Lck ile aktivasyonundan T753 ve T759'un sorumlu olduğunu T743 ün ise aktivasyonda rol oynamadığını gösterdi.



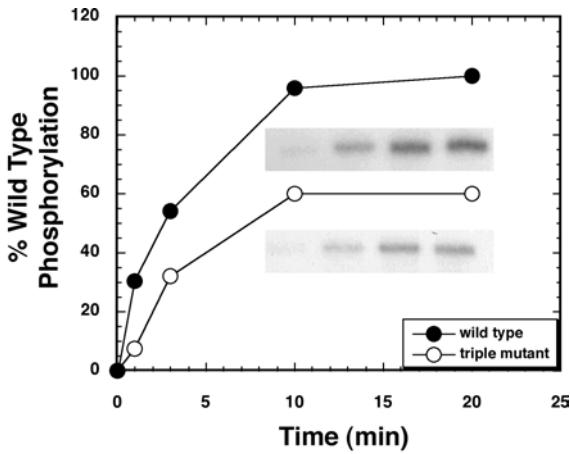
Şekil 1. Rekombinant PLC γ 2'nin rekombinant Lck, Fyn and Lyn tirozin kinazlarınınca fosforilasyonunu gösteren otoradyogram. Reaksiyonlar, Lck, Fyn, Lyn ve PLC γ 2 bir *in vitro* kinaz tampon çözeltisi içinde karışım halinde bulunurlarken, 25 μ M [³²P]ATP eklenerek başlatıldı ve belirtilen sürelerde 25°C de yürütüldü.



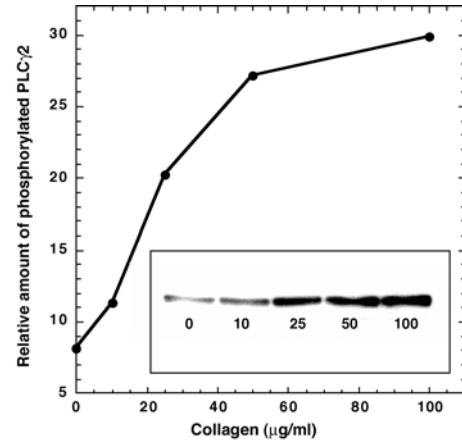
Şekil 2. Src familyası tirozin kinazlarınca fosforilasyonun rekombinant PLC γ 2'nin katalitik aktivitesine olan etkisi. Rekombinant PLC γ 2, ATP'nin varlığı (kapalı semboller) yada yokluğunda (açık semboller) Lck, Fyn yada Lyn ile *in vitro* fosforilasyona tabi tutuldu ve daha sonra modifiye miçellar essey ile aktivitesine bakıldı. Triton X-100 (0.015 %) esseyde bulunduruldu ve IP $_3$ oluşumu sintillasyon sayımı ile tayin edildi.



Şekil 4. SH2-SH3 bağlantı bölgesi tirozin mutasyonlarının (Y743/753/759F) PLC γ 2'nin Lck'ye bağlı aktivasyonuna olan etkileri. Yabancı tip ve üçlü mutant PLC γ 2 rekombinant Lck ile fosforilasyona tabi tutuldu ve daha sonra PLC γ 2 aktivitesi modifiye miçellar essey ile tayin edildi.



Şekil 3. Yabancı tip (kapalı sembol) ve üçlü mutant (Y743/753/759F) (açık sembol) PLC γ 2'nin Lck ile *in vitro* fosforilasyonunu gösteren otoradyogram. Yabancı tip ve üçlü mutant PLC γ 2 BL21 bakteriyel hücrelerinde eksprese edildi ve rekombinant Lck ile fosforilasyona tabi tutuldu (bant şiddetleri densitometri ile ölçülmüştür).



Şekil 5. İnsan trombositlerinde, PLC γ 2'nin kollajene bağlı fosforilasyonunun, fosfospesifik antikorlar ile gösterilmesi. Yıkılmış trombositler belirtilen konsantrasyonlardaki kollajen ile 2 dakika 37° C'de stimulusuna tabi tutuldu. Proteinler SDS-PAGE ile ayrılarak Western blotlama yapıldı. (Grafik blotun nicelendirilmiş şeklini göstermek-tedir).

Bu sonuçları doğrulamak için PLC γ 2'de fosforile edilmiş T753 ve T759 rezidülerini de içine alan bir peptidi kullanarak bir antikor oluşturduk. Bu antikor Western blotlamada 753 ve 759 rezidülerinde fosforile olmuş PLC γ 2'yi tanıırken, fosforile olmamış ya da 753 ve 759'u fenilalanine çevrilmiş PLC γ 2'yi tanımadı. Bu antikoru kullanarak, kollajen ile stimülasyonun trombositlerde PLC γ 2'nin 753 ve 759 pozisyonlarında fosforilasyonuna yol açtığını gösterdik (Şekil 5). Bu çalışmalar bu iki tirozin rezidüsünün PLC γ 2'nin regülasyonunda önemli rolü olduğunu gösterdi.

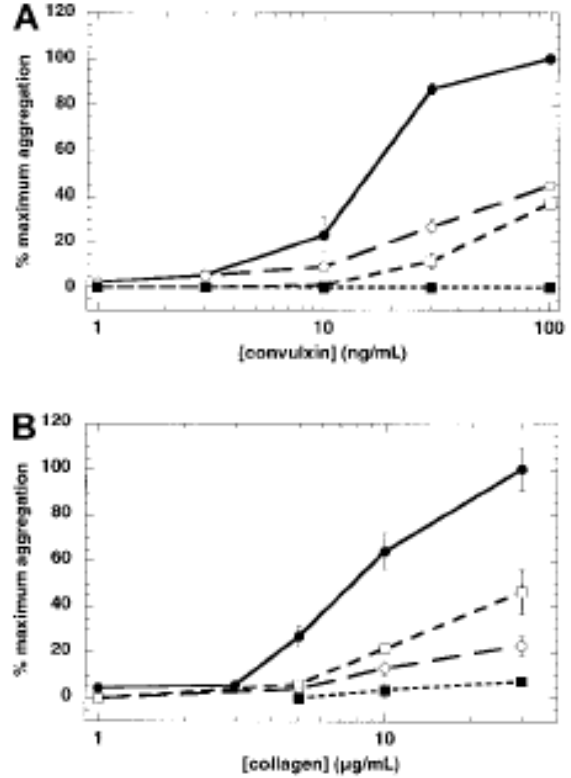
GP VI Aracılı Trombosit Aktivasyonunda Rol Alan Sinyal İletisi Sistemleri

Kollajen trombositleri glikoprotein VI aracılı sinyal ileti ile aktive eder. Kollajenin adhere trombositlerde fibrinojen reseptörlerini pozitif döngü agonistleri olmadan direkt olarak aktive edip edemeyeceği açık değildir. Bizde selektif GP VI agonistleri olan konvulksin ve kollajenle ilişkili peptid (CRP) aynı zamanda da kollajen kullanarak, sekonder G protein sinyal ileti mekanizmalarının, GP VI'ya bağlı trombosit agregasyonundaki katkısını araştırdık.

ADP kurtarıcıları ve ADP reseptör antagonistleri konsantrasyon-etki eğrisini konvulksinin düşük konsantrasyonlarında hafif sağa kaydırırken yüksek konsantrasyonlarda konvulksin ile oluşturulan trombosit agregasyonlarını etkilemediler.

ADP reseptör antagonistleri kollajen ve CRP ile bütün konsantrasyonlarda oluşturulan trombosit agregasyonu konsantrasyon etki eğrisini sağa kaydırdılar. Trombositlerin Protein kinaz C inhibitörü Ro 31-8220 ya da kalsiyum şelatörü 5,5-dimetil-BAPTA ile inkübasyonu konvulksin ile oluşturulan trombosit agregasyonu konsantrasyon etki eğrisini sağa kaydırdı. Ro 31-8220 ve dimetil-BAPTA'nın beraber kullanılması konvulksine bağlı agregasyonu tamamen inhibe etti (Şekil 6). Kalsiyum ya da protein kinaz C ile regüle edilen yolların inhibisyonu fibrinojen reseptör aktivasyonunun inhibisyonuna yol açarken her iki yolağın birden blokajı fibrinojen reseptör aktivasyonunun yok olmasına yol açmıştır (Şekil 7). Sonuç olarak, kollajen stimülasyonu sonucu GP VI sinyalleriyle oluşan fibrinojen reseptör aktivasyonunda, salıverilen ADP ve tromboksan A2'nin önemli bir rolü yoktur. Protein kinaz C ve kalsiyum

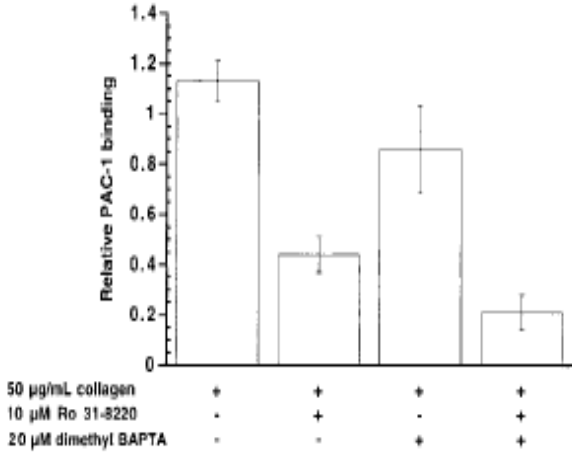
tarafından regüle edilen yollar bağımsız olarak GP VI aracılı trombosit agregasyonuna katkıda bulunurlar.



Şekil 6. Protein kinaz C inhibitörü Ro 31-8220 ve sitoplazmik Ca²⁺ şelatörü 5-5'-dimetil-BAPTA'nın GPVI-aracılı trombosit agregasyonuna etkileri. Konvulksin (A) ve kollajen (B) stimülasyonu sonucu oluşan trombosit agregasyonu, Ro 31-8220 (10 mikrom, açık yuvarlak sembol), dimetil-BAPTA (20 mikrom, açık kare sembol) ve (Ro 31-8220+ dimetil-BAPTA) (sırasıyla 10 mikrom ve 20 mikrom, kapalı kare sembol) ün etkileri araştırıldı. Kontrol yanıt hiçbir ajanın kullanılmadığı (kapalı yuvarlak sembol) eğridir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Damar zedelenmesi sırasında, trombositlerin subendotel dokuda bulunan kollajene adezyonu, trombosit aktivasyonundaki ilk basamaktır. Kollajenin fizyolojik pH da çözünür olmaması ve katı bir yüzey oluşturması gibi sebepler, kollajen-trombosit interaksyonunu diğer agonistlerle olan aktivasyona göre daha karmaşık yapmaktadır. Kollajene adhere olmuş trombositlerin aktivasyonu, tromboksan A₂ ve ADP gibi çözünebilir agonistlerin oluşumu ve/veya salıverilmesine dolayısıyla da adhere olmamış trombositlerin de aktivasyonuna yol açmaktadır¹.



Şekil 7. Ro 31-8220 ve dimetil-BAPTA'nın, trombositlerde kollajene bağlı fibrinojen reseptör aktivasyonuna etkileri. Aspirinlenmiş ve yıkanmış insan trombositleri, Ro 31-8220 (10 mikroM) ve/veya dimethyl-BAPTA (20 mikroM) ile inkübe edildikten sonra 10 mikrometre filtreden geçirildi ve trombositlerin üzerindeki aktif fibrinojen reseptörü PAC-1 antikoruna ile nicelendirildi.

Çalışmamızın ilk bölümünde, trombositlerin kollajen ile aktivasyonunda önemli rol oynadığı öne sürülen intraselüler sinyal ileti enzimi PLC γ 2'nin tirozin fosforilasyonu ile nasıl regüle edildiğini araştırdık. Bu amaçla, katalitik olarak aktif PLC γ 2'yi *E. coli*'de eksprese ettik ve biyokimyasal analiz için yetebilecek miktarda saflaştırdık. İlk amacımız PLC γ 2'yi spesifik olarak fosforile eden ve aktivasyonda anahtar rol oynayan tek bir tirozin kinaz bulmak idi. PLC γ 2 fosforilasyonunda rol oynayabileceği öne sürülen³ Lck, Lyn ve Fyn tirozin kinazlarının üçü de fosforilasyon ve aktivasyon sağladı. SH2-SH3 bağlantı bölgesindeki tirozinleri mutasyona uğramış PLC γ 2 de Lck ile fosforile olabilmekte ancak aktive olamamaktadır. Bu sonuç, PLC γ 2'nin fosforilasyon seviyesinin aktivasyon seviyesini yansıtmadığını göstermektedir. Aktive etmeyen bu tür fosforilasyonların doğası bilinmemektedir. *In vitro* koşullarda olan fosforilasyonun daha az spesifik olması ya da bu tür fosforilasyonların aktivasyon artışından daha farklı regülasyona neden olabilmeleri akla gelen olasılıklardır.

PLC γ 1'i aktive ettiği düşünülen bütün mekanizmalar SH bölgesini modüle etmektedir²⁴. Bu nedenle PLC γ 2'nin Lck ile aktivasyonun mekanizmalarını araştırırken SH2-SH3 bağlantı bölgesindeki tirozinleri (Y743, Y753 and Y759) *in vitro* mutajenez yöntemi ile fenilalanine dönüştürdük. Bütün tirozinlerin fenilalanine dönüştürüldüğü mutant (üçlü mutant) PLC γ 2, Lck ile %40 oranında daha az fosfo-

rile oldu. Aktivasyon çalışmalarında, PLC γ 2'nin Lck ile aktivasyonu, hem üçlü mutant hemde Y753F/Y759F ikili mutantta tamamen yok olurken, Y743F mutasyonu aktivasyonu etkilemedi. Olasılıkla Lck Y743 tirozinini fosforile etmemektedir yada fosforile etmekte ancak bu fosforilasyonun PLC γ 2'nin aktivasyonuna katkısı olmamaktadır. Böylece, PLC γ 2'nin Lck ile aktivasyonuna, Y753 ve Y759 tirozinlerinin fosforilasyonun aracılık ettiğini mutajenez çalışması ile göstermiş olduk. Bu tirozinlerde PLC γ 2'nin fosforile edilip edilmediğini monitorize etmek amacıyla ikili-fosforilasyona spesifik antikor oluşturduk. Bu antikoru kullanarak insan trombositlerinin kollajen ile stimülasyonu sonucunda PLC γ 2'nin Y753 ve Y759 tirozinlerinde fosforile edildiğini gösterdik ve bu fosforilasyonların *in vivo* koşullarda PLC γ 2 aktivasyonunda rol oynadığına dair kanıt sunduk.

Kollajenin trombositlerde, tromboksan A₂ ve ADP'nin ikincil rollerine ihtiyaç duymadan, fibrinojen reseptörü α 2 β 3'ü aktive edip edemeyeceği açık değildir. Çalışmamızın ikinci kısmında, kollajen stimülasyonu ve PLC γ 2 aktivasyonu sonrasında, fibrinojen reseptörü aktivasyonuna kadar trombositlerde gelişen sinyal ileti sistemlerini araştırdık. Kollajen ile stimüle edilen trombositlerde, ADP reseptör antagonistlerinin ortamda bulunması, fibrinojen reseptör aktivasyonunu engellemedi. PKC tarafından regüle edilen yolaklar Ro 31-8220 ile bloke edildiğinde, hem sekresyona yol açan yolaklar, hem de bağımsız olarak fibrinojen reseptörü α 2 β 3 aktivasyonuna yol açan yolaklar blokaja uğramaktadır. Bu koşullar altında, kalsiyuma bağlı yolaklar α 2 β 3 aktivasyonuna yeterli olmuştur. Aynı şekilde, kalsiyuma bağlı yolaklar dimetil-BAPTA ile bloke edildiğinde, hem sekresyona yol açan yolaklar hem de bağımsız olarak α 2 β 3 aktivasyonuna yol açan yolaklar blokaja uğramaktadır. Bu koşullar altında da, PKC tarafından regüle edilen yolaklar α 2 β 3 aktivasyonuna yeterli olmaktadır. Yani, PLC γ 2 aktivasyonunu takip eden moleküler olaylar olan kalsiyum mobilizasyonu ve PKC aktivasyonu birbirlerinden bağımsız olarak α 2 β 3 fibrinojen reseptörü aktivasyonuna neden olabilmektedir.

Sonuç olarak, PLC γ 2'nin tirozin fosforilasyonunun, enzimi aktive ettiğine dair ilk kanıtı sunmuş bulunmaktayız. Ancak sadece fosforilasyon enzimin aktive edildiğini kanıtlama-

maktadır, çünkü, PLC γ 2'nin mutant formları aktive olmadan fosforile edilebilmektedir. Src familyası tirozin kinazları PLC γ 2'yi gereksiz tirozinlerde de fosforile edebilmekte ancak aktivasyon için SH2-SH3 bölgesindeki iki tirozinin (Y753 ve Y759) fosforilasyonu gerekmektedir. Trombositlerde, kollajen stimulas-yonu sonucunda, PLC γ 2'nin Y753 ve Y759 tirozinlerinde fosforile edildiğinin, fosfospesifik antikor ile gösterilmesi, sonuçlarımızı canlı hücrelerde *ex vivo* olarak desteklemektedir. Ayrıca kollajen stimulas-yonu sonrası fibri-nojen reseptör aktivasyonu birbirinden bağımsız PKC ve kalsiyum regulas-yonlu yollarla oluşturulmakta ve saliverilen ikincil agonist-lerin, GP VI aracılı primer sinyale katkısı, birincil agregasyon tepkisinin sadece potansiyeli edilmesinde olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Brass LF. More pieces of the platelet activation puzzle slide into place. *J Clin Invest.* 1999;104:1663-1665.
2. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost.* 1999;82:318-325.
3. Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today.* 1998;19:260-264.
4. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem.* 1999;274:29019-29024.
5. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem.* 1997;272:23528-23531.
6. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 1997;413:255-259.
7. Daniel JL, Dangelmaier C, Smith JB. Evidence for a role for tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 2 in collagen-induced platelet cytosolic calcium mobilization. *Biochem J.* 1994;302:617-622.
8. Brass LF, Manning DR, Cichowski K, Abrams CS. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb Haemost.* 1997;78: 581-589.
9. Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:13576-13583.
10. Knight CG, Morton LF, Onley DJ, et al. Collagen platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res.* 1999;41:450-457.
11. Asazuma N, Wilde JI, Berlanga O, et al. Interaction of LAT with multiple adapter proteins in platelets activated by the GPVI selective ligand, convulxin. *J Biol Chem.* 2000;275:33427-33434.
12. Hashimoto A, Takeda K, Inaba M, Sekimata M, Kaisho T, Ikehara S, Homma Y, Akira S and Kurosaki T (2000) Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J Immunol* 165:1738-1742.
13. Wang D, Feng J, Wen R, Marine JC, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson CW, Cleveland JL, Murray PJ and Ihle JN (2000) Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* 13:25-35.
14. Ozdener, F., Kunapuli, S.P., Daniel, J.L. Expression of enzymatically active phospholipase Cgamma-2 in *E. coli*. *J Biochem Mol Biol.* 35(5): 508-512, 2002.
15. Ozdener, F., Kunapuli, S.P., Daniel, J.L. Carboxyl terminal sequence of phospholipase C gamma-2. *Platelets.* 12(2):121-3, 2001.
16. Ozdener, F., Dangelmaier, C., Ashby, B., Kunapuli, S.P., Daniel, J.L. Activation of phospholipase C-gamma-2 by tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 62:1-8, 2002.
17. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation, I: evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem.* 1998;273:2024-2029.
18. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation, II: the P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem.* 1998;273:2030-2034.
19. Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem.* 1999;274:29108-29114.
20. Ozdener, F., Quinton, T.M., Kunapuli, S.P. Molecular mechanism of Glycoprotein VI-mediated platelet activation. *BLOOD* 96: (11) 246a, Part 1, Suppl. NOV 16 2000
21. Quinton TM, Ozdener F, Dangelmaier C, Daniel JL, Kunapuli SP. Glycoprotein VI-mediated platelet fibrinogen receptor activation occurs through calcium-sensitive and PKC-sensitive pathways without a requirement for secreted ADP. *Blood.* 99(9):3228-34, 2002.
22. Zheng CF, Simcox T, Xu L and Vaillancourt P (1997) A new expression vector for high level protein production, one step purification and direct isotopic labeling of calmodulin-binding peptide fusion proteins. *Gene* 186:55-60.
23. Higuchi R, Krummel B and Saiki RK (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* 16:7351-7367.

24. Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim SR, Kwon KS and Rhee SG (1998) Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. J Biol Chem 273:4465-4469.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatih Özdenler
Adresi : Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim D. Eskişehir
Doğum tarihi : 5 Haziran 1966
Doğum Yeri : Mardin
Tel : (222) 239 29 79/4568
E-mail : fozdener@ogu.edu.tr
Faks : (222) 239 37 72

Eğitim Durumu

Doktora sonrası eğitim. Sol Sherry Thrombosis Research Center, Temple Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2000-2001)
Doktora (Farmakoloji), Temple Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.D. Philadelphia, Pennsylvania, USA (1995-2000)
Tıp Doktoru, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara, TÜRKİYE (1983-1990)

Çalışma Tecrübesi

1. Yardımcı Doçent, Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.D., Eskişehir (2003-)
2. Öğretim Görevlisi, Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.D., Eskişehir (2001-2003)
3. Araştırma görevlisi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.D. İstanbul (1992-1994)
4. Asistan, Koşuyolu Kalp ve Araştırma Hastanesi, Anesteziyoloji A.D. İstanbul (1991-1992)
5. Pratisyen Hekim, Sıtma Savaş Birimi, İl Sağlık Müdürlüğü, Mardin (1990-1991)

Üyelikler

1. Türk Farmakoloji Derneği
2. Türk Hematoloji Derneği
3. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics
4. Mid Atlantic Pharmacological Society

Burslar

Doktora sonrası araştırma bursu, Sol Sherry Thrombosis Research Center, Temple Üniversitesi, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2000-2001)
Predoktoral araştırma bursu, Temple Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.D. Philadelphia, Pennsylvania, USA (1998-2000)
Y.Ö.K. yurtdışı doktora bursu (1995-1998)

Yayın Listesi

I. Araştırma Projeleri

1. Daniel JL, Özdenler F. Trombositlerde kollajene bağlı fosfolipaz Cgamma2 aktivasyonunun moleküler mekanizması: syk ve lyn'in rolü. American Heart Association.
2. Özdenler F. Türk toplumunda 5-HT2A reseptör farmakogenetiği. Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu projesi (devam ediyor)

II. Araştırma Makaleleri

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Ozdenler F, Ozdemir V. Fasidotril. Curr Opin Invest Drugs (2003) 4(9) 1113-1119.
2. Quinton TM, Ozdenler F, Dangelmaier C, Daniel JL, Kunapuli SP. Glycoprotein VI-mediated platelet fibrinogen receptor activation occurs through calcium-sensitive and PKC-sensitive pathways without a requirement for secreted ADP. Blood. 99(9):3228-34, 2002.
3. Ozdenler F., Dangelmaier, C., Ashby, B., Kunapuli, S.P., Daniel, J.L. Activation of phospholipase C-gamma-2 by tyrosine phosphorylation. Mol Pharmacol. 62:1-8, 2002.
4. Ozdenler, F., Kunapuli, S.P., Daniel, J.L. Expression of enzymatically active phospholipase Cgamma-2 in E. coli. J Biochem Mol Biol. 35(5): 508-512, 2002.
5. Ozdemir V, Fourie J, Ozdenler F. Aripiprazole - A monograph. Curr Opin Invest Drugs (2002) 3(1) 113-120.
6. Ozdenler, F., Kunapuli, S.P., Daniel, J.L. Carboxyl terminal sequence of phospholipase C gamma-2. Platelets. 12(2):121-3, 2001.
7. Xu, W., Ozdenler, F., Li, J. G., Chen, C., de Riel, J. K., Weinstein, H., Liu-Chen, L. Y. Functional role of the spatial proximity of Asp114(2.50) in TMH 2 and Asn332(7.49) in TMH 7 of the mu opioid receptor. FEBS Lett. 447 (2-3): 318-324, 1999.

III. Bildiriler

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Ozdenler, F., Gulbas, Z., Ozdemir, V. Evidence for a functional role of 5-Hydroxytryptamine-2a receptor gene polymorphism in platelet aggregation. XIX. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. July 2003
2. Erol, K., Sirmagul, B., Ozdenler, F., Gulbas, Z. The effect of calcium channel blockers on NO system and platelet aggregation in rabbits. The Pharmacologist 44. Number 2. Suppl. 1. 2002
3. Ozdenler, F., Quinton, T.M., Kunapuli, S.P. Molecular mechanism of Glycoprotein VI-mediated platelet activation. Blood 96: (11) 246a, Part 1, Suppl. NOV 16 2000

4. Ozdener, F., Dangelmaier, C., Ashby, B., Kunapuli, S.P., Daniel, J.L. Activation of PLC-gamma-2 by tyrosine phosphorylation. *Blood* 96: (11) 246a, Part 1, Suppl. NOV 16 2000
5. Ozdener, F., Kunapuli, S. P., Smith J.B., Daniel, J.L. Studies on platelet activation by collagen: Expression of enzymatically active phospholipase C-gamma-2 in *E. coli*. *Thromb Haem.* 2006 Suppl. S AUG 1999
6. Ozdener, F., Kunapuli, S. P., Smith J.B., Daniel, J.L. Studies on platelet activation by collagen: Expression of enzymatically active phospholipase C-gamma-2 in *E. coli*. *Thromb Haem.* 2006 Suppl. S AUG 1999
7. Suzer, O., Ozkan, A.K., Ozdener, F., Suzer, A., Aykac, Z., Ozuner, Z. Trimetazidine does not reduce ischemia-reperfusion induced arrhythmias in isolated perfused rat hearts. *Br J Anesth.* 76: Suppl 1., MAY 1996