

**HÜCRE İÇİ MEKANİZMALARA DAYALI
İNTRASELLÜLER KALSİYUM ARTIŞININ
APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Elif APAYDIN

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Ocak, 2016

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1308S303**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elif Apaydın'ın “**Hücre İçi Mekanizmalara Dayalı İntrasellüler Kalsiyum Artışının Apoptoz Üzerine Etkileri**” başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 22.01.2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Zerrin İNCESU
Üye	: Doç. Dr. Pınar ÖZTOPÇU VATAN
Üye	: Yrd. Doç.Dr. Filiz ÖZDEMİR

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HÜCRE İÇİ MEKANİZMALARA DAYALI İNTRASELLÜLER KALSİYUM ARTIŞININ APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ

Elif APAYDIN

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Zerrin İNCESU

2016, 76 sayfa

Bu tez kapsamında integrinler aktif formda iken ovaryum kanser hücrelerinde (SKOV-3) ER stres oluşturulduğunda intrasellüler kalsiyum artışının apoptotik etkileri incelenmiştir. SKOV-3 hücreleri 50 µg/ml Fibronektin ile bağlandıktan sonra 30 ya da 60 dakika süre ile 24 µM TN uygulaması ile ER stresi oluşturulup, intrasellüler kalsiyum artışı ve mobilizasyonu Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM boya ile işaretlenerek floresan mikroskopta görüntülenmiştir. Fibronektine bağlı SKOV-3 hücrelerinin bağlanma kapasiteleri ER stresi sonrasında Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA) incelenmiş ve bağlamanın TN uygulama dozuna ve zamanına bağımlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. İntegrin aktivasyon düzeyi artırılmış SKOV-3 hücrelerinde, TN uygulaması sonrasında RT-PCR ile Bax, Bcl-2, Bcl-XL, sitokrom c, EndoG, AIF, kalpain 1, kalpain 2, kaspaz 3, kaspaz 8 ve FAK genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre farklı apoptotik yolların etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; oluşturulan ER stresi modelinde ve metastatik potansiyeli artırılmış SKOV-3 hücrelerinde ER stresinin apoptozu uyardığı gösterilmiş olup, kısmen apoptotik mekanizması aydınlatılmıştır. Apoptotik yolların tam olarak belirlenmesi ile elde edilecek sonuçlar, ovaryum kanserinde baskılanmış apoptoz mekanizmasının detaylarını ortaya koymakla beraber mortalite oranı yüksek olan bu kanser türünün tedavisine yönelik ilaç geliştirme açısından fayda sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: SKOV-3, ER stres, apoptoz, kalsiyum, integrin

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE EFFECTS OF INTRACELLULAR CALCIUM INCREASE ON APOPTOSIS BASED ON INTRACELLULAR MECHANISMS

Elif APAYDIN

Anadolu University

Graduate School of Sciences

High Technologies Department

Biotechnology Department

Supervisor: Prof.Dr. Zerrin İNCESU

2016, 76 pages

In this thesis, apoptotic effects of intracellular calcium increase were investigated by generating endoplasmic reticulum stress in SKOV-3 ovarian cancer cells while integrins were activated.

During the SKOV-3 cells were adhering to 50 µg/ml fibronectin, endoplasmic reticulum stress was formed with adding 24 µM tunicamycin and incubated 30 or 60 minutes. Afterwards, intracellular Ca^{+2} increase and mobility were imaged by marking with Fluo-3 AM and Rhod-2 AM dyes in fluorescent microscope. In addition to, the binding capacity of SKOV-3 cells to fibronectin was investigated by using Real Time Cell Analyser (RTCA) system and the results obtained here were showed that the adhesion of cells decreased dependent on time and dose of tunicamycin. In SKOV-3 cells whose integrin activation level increased, mRNA expression levels of Bax, Bcl-2, Bcl-XL, cytochrome c, EndoG, AIF, calpain 1, calpain 2, caspase 3, caspase 8 and FAK genes were also investigated by RT-PCR. These result indicated that in our system, SKOV-3 cells might be using the various apoptotic pathways rather than one.

In conclusion, forming stress in endoplasmic reticulum induced apoptosis in high metastatic SKOV-3 cells. The results obtained from this study would be useful for drug development intended for therapy of these cancer type whose mortality rate is high.

Keywords: SKOV-3, ER stress, apoptosis, calcium, integrin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabır ve anlayışla bilim insanı olmayı öğreten, yolumu aydınlatan fikirleri ve tecrübeleriyle ufkumu genişleten, hata yaptığımda bile hoşgörüsüyle motive eden, güleryüzünü hiçbir zaman esirgemeyen, en iyi koşullarda çalışmamız için uğraşan, her koşulda beni dinleyen ve yol gösteren, bana bilimi ve biyokimyayı sevdiren sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin İncesu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Her sorunumda kapısını çaldığım, umutsuzluğa düştüğümde cesaretlendiren, bilgi ve tecrübeleriyle önerilerini sunan, desteğiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Filiz Özdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince hiçbir yardımı ve desteği esirgemeyen değerli hocalarım, Doç. Dr. Yusuf Özkay ve Yrd. Doç. Dr. Gülay Büyükköroğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, en zor zamanlarımda bile varlıklarıyla beni neşelendiren, çalışmalarım sırasında her türlü yardımı sağlayan, akşam laboratuvarında çalışmalarım bitene kadar sabırla bekleyen, karda, yağmurda, karanlıkta beni yalnız bırakmayan değerli çalışma arkadaşlarım, Nur İpek Önder Mert'e, Ahmet Mert'e, Mesut Şen'e, Aysun Ayrım'a, Kadri Güleç'e, Seda Tarhan'a, Erman Özer'e teşekkürlerimi sunarım.

Sevgisini ve ilgisini her zaman üzerimde hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan aileme, kuzenlerime ve ikinci ailem olarak gördüğüm Işıl Balaban ve Zafer Aydın'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLERiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	iiix
SİMGE VE KISALTMALARx
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. İntegrinler (Hücre Yüzey Bağlanma Reseptörleri)	4
1.2. İntegrin Ekspresyonunun Kanserdeki Rolü	8
1.3. İntegrin ve Apoptoz İlişkisi.....	10
1.4. Sitoplazmik Kalsiyum Artışı ile İntegrin Etkileşimi	11
1.5. Kalsiyum İyonunun Apoptozdaki Rolü.....	13
1.6. İntegrin Ekspresyonunun Ovaryum Kanseriindeki Rolü	15
2 GEREÇLER	17
2.1. Hücre Hattı	17
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
2.3. Kullanılan Cihazlar	17
3. YÖNTEMLER	19
3.1. Hücre Kültürü	19
3.2.Kalsiyum Dağılımının Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi	19
3.3. Hücre Adezyonu	20
3.4. mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi (Gerçek-zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR) Analizleri.....	21
3.4.1. Total RNA izolasyonu.....	21
3.4.2. RNA'nın kalitesi, saflığı ve miktarının belirlenmesi	21
3.4.3. Total RNA örneklerinden cDNA sentezi.....	21
3.4.4. Primer dizilerinin seçilmesi	22
3.4.5. Gerçek-zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR) Analizleri.....	23
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	25
4.1.İntrasellüler Kalsiyum Dağılımının Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi	25

4.2. Mitokondriyal Kalsiyum Artışının Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi	32
4.3. Tunikamisinin Hücre Adezyonu Üzerine Etkisi	48
4.4. Tunikamisin Uygulaması Sonrasında mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	50
4.5. Sonuç ve Öneriler	64
KAYNAKLAR.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Metastaz oluşum evreleri	2
Şekil 1.2. İntegrin heterodimerleri ve ligantlar	4
Şekil 1.3. İntegrin yapısı.....	5
Şekil 1.4. Aktif ve inaktif integrin.....	6
Şekil 1.5. İntegrin aktivasyonu sonrasında iskelet elemanlarını kümelenmesi.....	7
Şekil 1.6. ER ve mitokondri arasındaki Ca^{+2} ilişkisi.....	14
Şekil 4.1. Ca^{+2} problemlerinin (Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM) hücre içine geçişi ve Ca^{+2} ile bağlanması	26
Şekil 4.2. Fibronektin kaplı plakalarda 1mM $CaCl_2$ HEPES buffer içerisinde SKOV-3 hücrelerinin 12 μM TN uygulaması sonrasında kalsiyum dağılımının floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	27
Şekil 4.3. Fibronektin kaplı plakalarda 1mM $CaCl_2$ HEPES buffer içerisinde SKOV-3 hücrelerinin 18 μM TN uygulaması sonrasında kalsiyum dağılımının floresan mikroskop ile görüntülenmesi	29
Şekil 4.4. Fibronektin kaplı plakalarda 1mM $CaCl_2$ HEPES buffer içerisinde SKOV-3 hücrelerinin 24 μM TN uygulaması sonrasında kalsiyum dağılımının floresan mikroskop ile görüntülenmesi	31
Şekil 4.5. Kaplama yapılmadan Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunun floresan mikroskopda 40 \times büyütmede görüntüleri.....	34
Şekil 4.6. Fibronektin kaplı kuyucuklarda Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunun floresan mikroskop 40 \times büyütmede görüntüleri.....	36
Şekil 4.7. Kaplamasız kuyucuklarda Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin kalsiyumsuz HEPES buffer içerisinde TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunun floresan mikroskop görüntüleri.....	39
Şekil 4.8. Fibronektin Kaplı kuyucuklarda Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin kalsiyumsuz HEPES buffer içerisinde TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunun floresan mikroskop görüntüleri.....	42
Şekil 4.9. Fibronektin kaplanmış ya da kaplanmamış plakalarda SKOV-3 hücreleri Rhod- 2 AM ile işaretlenmesi sonrasında 5mM EGTA uygulaması sonucunda floresan mikroskop görüntüleri.....	45

Şekil 4.10. SKOV-3 hücrelerinin Ru360 ile ön muamele edilerek ya da edilmeden Rhod- 2 AM ile işaretlenmesi sonrasında TN uygulamasının floresan mikroskop görüntüleri	47
Şekil 4.11. SKOV-3 hücreleri fibronektin kaplı E-platelere tunikamisin (TN) uygulamasının hücre bağlanmasına etkisi.....	48
Şekil 4.12. Fibronektin ile kaplanmış ya da kaplanmamış E-plakalarda SKOV-3 hücrelerinin TN uygulaması ile 2 saat inkübasyon sonucunda ışık mikroskopu görüntüleri.....	49
Şekil 4.13. Total RNA agaroz jel görüntüleri.....	50
Şekil 4.14. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kalpain-1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	52
Şekil 4.15. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Bax geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	53
Şekil 4.16. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında AIF geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	53
Şekil 4.17. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında AIF geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	54
Şekil 4.18. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında sitokrom c geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	55
Şekil 4.19. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kalpain-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	55
Şekil 4.20. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında IRE1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	56
Şekil 4.21. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kaspaz-3 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	57
Şekil 4.22. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kaspaz-8 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	57

Şekil 4.23. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında FAK geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	58
Şekil 4.24. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Bcl-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	59
Şekil 4.25. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Bcl-XL geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı.....	22
Çizelge 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonları için kullanılan primer dizileri assay ID'leri.....	23
Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu için hazırlanan karışım.....	23
Çizelge 3.4. PCR döngüleri sıcaklık ve süreleri.....	24

SİMGE VE KISALTMALAR

- ECM : Ekstrasellüler Matriks
- FAK : Fokal Adezyon Kinaz
- ERK : İntegrin Sinyal İlgili Kinaz
- ILK : İntegrin Bağlı Kinaz
- SKOV-3: Ovaryum kanseri hücre hattı
- PKC : Protein Kinaz C
- ER : Endoplazmik Retikulum
- PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RTCA : Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
- μ l : Mikrolitre
- μ m : Mikrometre
- μ M : Mikromolar
- ml : Mililitre
- mM : Milimolar
- EDTA : Etilen Diamin Tetraasetik Asit
- ELISA : Enzim Bağlı İmmunosorbent Yöntem

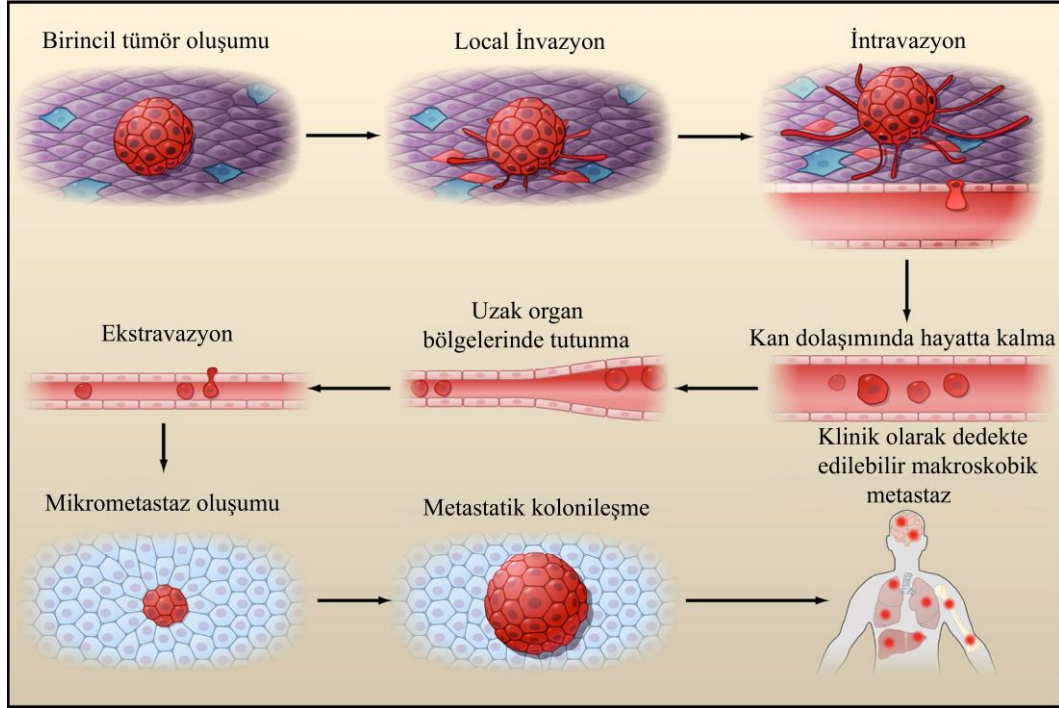
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doku ya da organ bölgesinde normal büyüme limitini aşan, aşırı agresif hücrelerin çoğalması ve kümelenmesi “kanser” olarak adlandırılmaktadır. Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşebilmesi için anti-büyüme sinyallerine duyarsız olmaları, apoptozdan (programlı hücre ölümü) kaçabilmeli, anjiogenez oluşumunu sürdürebilmeli, sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olmalı ve dokuyu invaze edebilmeli buna bağlı olarak da metastaz oluşturabilmelidir. Birçok kanser türünün epitel doku hastalığı olduğu (Cairns, 1975), ancak ileri aşamalarda kanser hücrelerinin mezoderm ve endodermal bölgelerde invazyon yaptığı yani metastaz oluşturduğu bilinmektedir. Metastaz, bu invaziv kanser hücrelerinin vücuttaki diğer organlara yayılma olayıdır ve bu olay, insan kanserlerinde % 90'nın ölüm ile sonuçlanmasına neden olmaktadır (Weigelt ve ark., 2005). Kanser teşhisi konan hastaların % 50'sinin ise metastaza sahip olduğu gösterilmiştir. Metastaz; aktif bir işlem olup, çoklu basamak sistemine sahiptir (Şekil 1.1). Bu basamaklardan bir tanesinin başarısız olması tüm metastaz işleminin sonlanmasına neden olmaktadır ve heterojen tümör hücre popülasyonu içinde ancak % 0.01'den daha küçük sayıda hücre metastatik özelliğe sahip olup, metastaz basamaklarını başarı ile tamamlamaktadır (Ray ve Jablons, 2009; Schirmacher, 1985). Ancak, bu şekilde tümör hücreleri klinik açıdan saptanabilen lezyonlar oluşturabilir. Metastatik potansiyele sahip hücrelerin oluşum aşamasında, bu hücrelerin subpopülasyonlarında ya da disemine olmuş hücrelerde bir seri mutasyon gerçekleştiği ve bu şekilde metastatik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Nowell, 1976). Metastaz basamakları şu şekilde tanımlanmaktadır;

1. Tümör hücrelerinin ekstrasellüler matriks proteinler (ECM, örneğin; kolajen, laminin, fibronektin ve proteoglikanlar) ile olan bağlantılarını koparmaları,

2. Kan damarlarında sirkülasyon, yaşam (kan damarları ile gerçekleşen yayılıma haematogenous adı verilmektedir ve sarkoma kanser tipi ile özellikle böbreklerden orijin alan karsinomalar için uygun yayılım tipidir) ve kan akımına karşı kan damar endotel hücrelerine bağlanmanın gerçekleştirilmesi. Bu aşamada,

tümör hücreleri bağışıklık sistem hücrelerinden kaçınmalı ve lenfosit, makrofaj ve natural killer hücrelerinin saldırılarına karşı duyarlı olmalıdır. Bununla birlikte,



Şekil 1.1 Metastaz oluşum evreleri (Bishoy, 2012)

tümör hücreleri kan akımını türbülansı ile ilgili ortaya çıkan mekanik strese ve toksik etkiye sahip olan yüksek oksijen stresine karşıda dayanıklı olmak zorundadır.

3. Lenfatik ya da peritoneel boşluğa geçiş (lenf kanalı ile yayılıma lenfatik yayılım adı verilmektedir ve birçok karsinoma için uygun yayılım tipidir) (Braun ve ark., 2000).

4. Metastatik bölgede yani hedef organda (akciğer, karaciğer, beyin ya da kemik gibi) vaskülarizasyonuda içine alan büyümenin meydana gelmesi (Ray ve Jablons, 2009).

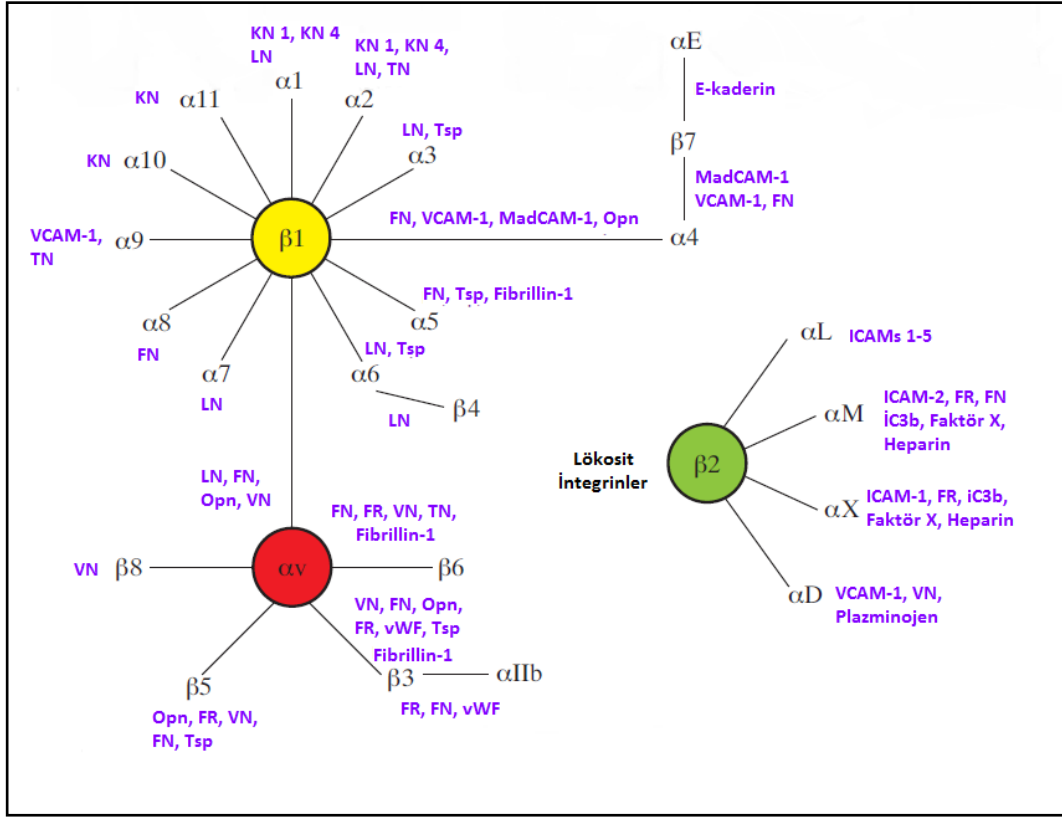
Metastatik hücrelerin hedef organları rastgele seçmediği ve hedef dokunun mikro içeriğinin tümör hücresinin çoğalması için uygun olduğu öne sürülen “tohum-toprak” hipotezi ile açıklanmıştır (Keller, 2002). B16 melanoma hücreleri ile yapılan deneysel çalışma sonrasında, bu hücrelerin fareye enjeksiyonu ile seçici organda metastaz geliştiği gözlenmiştir. Bu organlardan

salgılanan büyüme faktörleri B16 melanoma hücrelerinin çoğalması için gerekli ortam koşullarını sağlamaktadır. Bununla birlikte, kanser hücresinin hedef bölgeye ulaşmasının çok sayıda faktörün kontrolü altında olduğu da bir gerçektir.

Kanserli hücrelerin metastatik bölgede çoğalması, hem apoptotik sinyallere dirençli olmalarında hem de mitotik bölünmelerinin büyüme faktör uyarıcılarından bağımsız olarak gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak, bunların nedenleri ve etkili anahtar molekülleri henüz tam olarak açıklanamamıştır. Hücre-hücre ya da hücre-ECM bağlantılarının sürdürülmesi apoptotik ölüm sinyallerinin iletilmesi ve apoptotik sürecin devamlılığı için gerekli olduğundan, metastazın önlenmesinde özellikle, hücre bağlanmasının bozulması ile uyarılabilen hücre ölümü olan, anoikis ve sitoskelet yapısının kaybolması ile ortaya çıkan hücre ölüm şekli olan amorfozis'in mekanizmalarının son derece önemli olduğu belirtilmektedir (Mehlen ve Puisieux, 2006). Doku ya da hücre tipine göre, hücre-ECM sinyalinin farklılık gösterdiği de bilinmektedir.

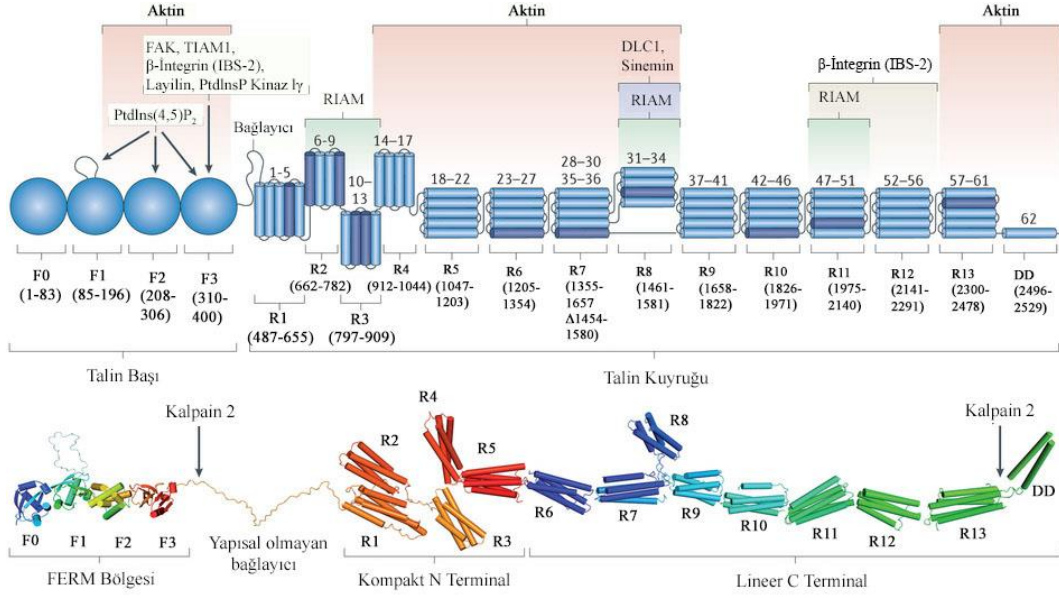
Tümör hücrelerinin ECM ile etkileşimi; bağlanma, matriks parçalanması ve migrasyon şeklinde gerçekleşmektedir. İlk basamak olan bağlanma, spesifik bağlanma reseptörleri olarak bilinen kadherinler, selektinler, immunoglobulin süperail üyeleri ve integrinler aracılığı ile olmaktadır. Matriks reseptörleri; basal membranda bulunan laminin, tip IV kolajen ve fibronektin gibi glikoproteinleri tanımaktadır. 2 ila 8 saat bağlanma sonrasında, tümör hücreleri doğrudan yıkımda görev alan enzimleri salgılamaya başlar. Matriks lizis işlemi tümör hücre yüzeyine yakın bir bölgede ve spesifik olarak gerçekleşir. Daha sonra ise, tümör hücresi matriksin parçalanması ile oluşturulan bölgeden basal membranını geçer. Hücre yüzey ligand bağlanması ve sitoskelet proteinlerinin koordineli hareketi sonrasında tümör hücrelerinin migrasyon yönü doku spesifik kemoatraktans molekülleri ile belirlenmiş olur (Liotta ve Stetler-Stevenson, 1991). Sonuç olarak, tümör hücreleri metastatik basamaklarını tamamlayıp proliferere olabilir ve ektopik dokuda koloni oluşturabilir.

1.1. İntegrinler (Hücre Yüzey Bağlanma Reseptörleri)



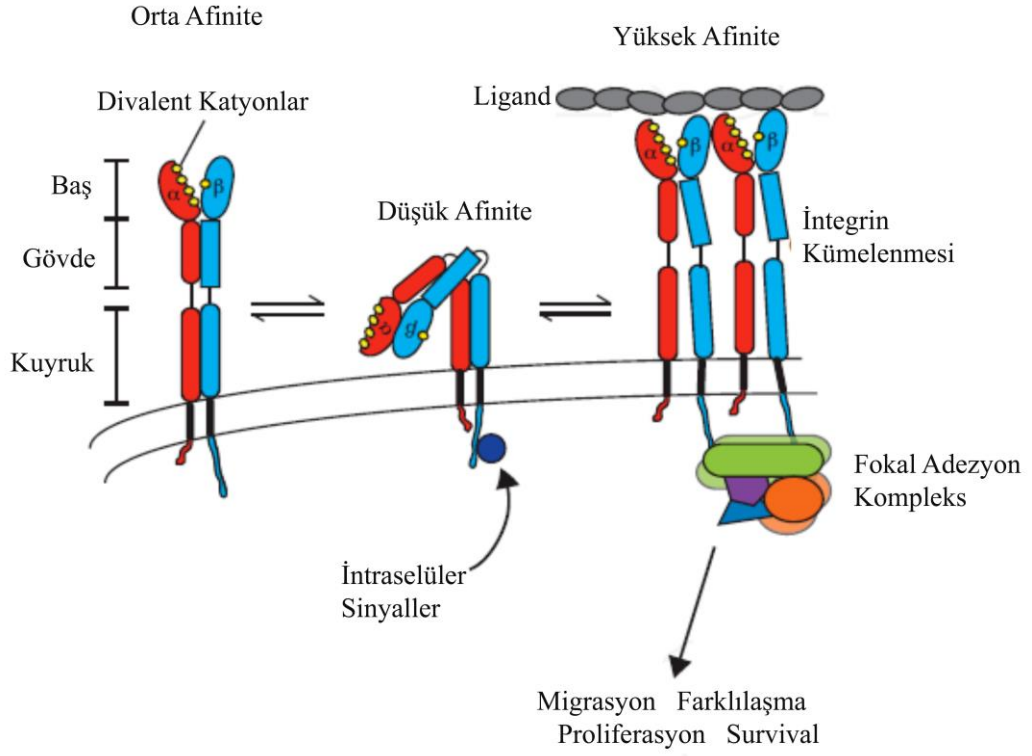
Şekil 1.2. İntegrin heterodimerleri ve ligantları. İntegrin heterodimerleri olan α ve β alt üniteleri siyah çizgi ile gösterilmektedir. Heterodimerlerin ligantları ise mor renkte ile yazmaktadır. FN, Fibronektin; FR, Fibrinojen; VN, Vitronektin; vWF, von Willebrand faktör; LN, Laminin; KN, Kollojen; Opn, Osteopontin; TN, Tenascin; Tsp, Trombospondin (Young ve ark., 2013)

Hücre yüzey bağlanma reseptörleri olan integrinler +2 değerlikli katyon bağımlı heterodimerik glikoprotein yapısına sahip olup, 18 α alt ünitesi (120-180 kDa) ile 8 β alt ünitesinin (90-110 kDa) kombinasyonu sonucunda 24 adet farklı integrin oluşmaktadır (Şekil 1.2) (van der Flier ve Sonnenberg, 2001). α and β alt üniteleri kovalent olmayan bir bağ ile bağlanırlar. Her bir alt ünite büyük bir ekstrasellüler bölge; tekli bir transmembrane bölgesi ve kısa ve katalitik olmayan bir sitoplazmik kuyruk bölgesi (yaklaşık 30 ila 40 aminoasit uzunluğunda) içermektedir (Şekil 1.3) (Colombatti ve ark., 1993).



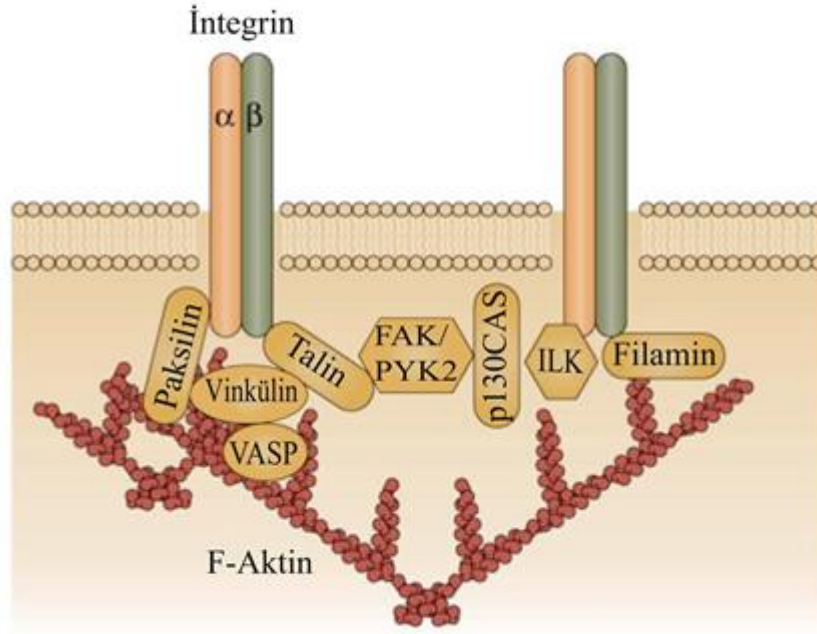
Şekil 1.3. İntegrin yapısı (Calderwood ve ark., 2013)

Epitel geçiş (ET) sırasında tümör hücreleri integrin afinitelerini ve ECM proteinlerine karşı ilgilerini (inside-out sinyal yolağı) ve/veya integrin ekspresyon seviyelerini değiştirerek mikro enviroental (ECM proteinleri, endotelial hücreler, bağışıklık sistem hücreleri ve fibroblastlardan oluşur) sistemden kaçarlar. Ayrıca, büyüme faktörleri ve kemokin reseptör sinyali integrin konformasyonunu değiştirir ve integrin aktivasyonunu düzenler. İntegrinlerin inaktif formunda, α ve β alt ünitelerinin sitoplazmik kuyruk kısımları birbiri ile sıkı bir şekilde etkileşim içindedir. α ve β zincirlerinin N-terminal küresel baş kısımları ise plazma membrana doğru eğilmiş bir şekilde bulunur (Şekil 1.4) (Arnaout ve ark., 2005).



Şekil 1.4. Aktif ve inaktif integrin (Young ve ark., 2013)

Büyüme faktörleri, β alt ünitesinin sitoplazmik ucu ile talin proteininin etkileşmesini uyarır, ve bu şekilde α ve β alt ünitelerinin sitoplazmik kuyruk kısmındaki tuz köprüleri kırılarak aktif form halinin alınması sağlanmış olur (Arnaout ve ark., 2005). Aktif duruma geçen integrinler, ligandına bağlanarak hücre yüzeyinde kümelenir ve hücre bağlanması, hücre canlılığı, proliferasyonu, migrasyonu, gen transkripsiyonu ve apoptotik sinyalleri uyarabilir (Aplin ve ark., 1999). Ligand bağlanması sonrasında, integrinler hücre yüzeyinde kümelenerek fokal kontak bölgelerini oluştururlar. Bu bölgelerin sitoplazmik kısmında çok sayıda farklı aktin-ilişgili proteinler (fokal adezyon kinaz, talin, paksillin, Src, vinkülin gibi) yer almaktadır (Şekil 1.5) ve bu proteinler integrinlerin sitoskelet yapısı ile bağlantısını sağlarlar (Sastry ve Burridge, 2000).



Şekil 1.5. İntegrin aktivasyonu sonrasında iskelet elemanlarını kümelenmesi (Billadeau ve ark., 2007)

İntegrinlerin hem ekstrasellüler ligandlarına hem de intrasellüler ligandlarına bağlanmaları, biyokimyasal sinyallerin plazma membranından geçiş için bir transmembrane bağlantı sağlanmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, integrinler kinazları aktive ederek, sitoskelet proteinlerinin fosforilasyonuna neden olurlar ki; bu durumda da stres fiber formasyonunun, hücre şeklinin ve migrasyonun düzenlenmesinde etkili olmaktadır. İntegrinlerin sitoplazmik kuyruk kısmı ile kümelenmesine neden olduğu sitoplazmik sinyal molekülleri, integrin türüne bağlı olarak tümör oluşumunu stimüle edebildiği gibi inhibe de edebilmektedir. Örneğin; $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\alpha 6$, $\beta 1$, $\alpha v \beta 4$, $\beta 4$, $\alpha 9 \beta 1$ ve $\alpha v \beta 3$ integrinleri, çeşitli tümör dokularında aşırı eksprese edildikleri ve tümör oluşumunu uyardıkları gösterilmiştir. Ancak, $\alpha 2 \beta 1$ gibi bazı integrinlerin de meme kanserinde baskılayıcı bir rol oynadığı bilinmektedir (Rathinam ve Alahari, 2010).

1.2. İntegrin Ekspresyonunun Kanserdeki Rolü

Metastatik potansiyeline sahip tümör hücrelerinin basal membrana doğru hareketi, integrinlerin aktive ettiği proteolitik enzimler vasıtasıyla basal membranın degradasyonu ile düzenlenmektedir (Aumailley ve ark., 2000). Bu durum, tümör hücrelerinin agresif ve metastatik potansiyelini arttırmaktadır. Laminin bağlanma reseptörü olan, $\alpha6\beta4$ integrinin meme kanserinde aşırı ekspresyonu metastatik yayılım ile doğrudan ilişkilidir (Kim ve ark., 2009). Aynı şekilde, $\alpha v\beta3$ integrin ekspresyonunda meme kanserli hücrelerinde normal hücrelere kıyasla artış gösterdiği bildirilmiştir. $\beta3$ integrin alt ünitesi patolojik anjiogenez oluşumunda kritik bir role sahiptir (Mahabeleshwar ve ark., 2008). Farmakolojik olarak $\beta3$ 'ün bloke edilmesi birçok kanser tipinde tümör anjiogenezini azaltması, klinik açıdan kullanılmak üzere birçok ilaç adayının geliştirilmesine neden olmuştur (Folkman, 2007).

$\beta1$ integrin ekspresyon seviyesinin artması birçok insan tümör oluşumu ile ilişkilidir (Yao ve ark., 2007). $\beta1$ integrinin aşırı ekspresyonunu akciğer, pankreas ve kutanöz melanoma kanserlerinin zayıf prognozu ile ilişkilidir. Küçük hücreli akciğer kanserlerinin ECM ile bağlantıları $\beta1$ integrin/FAK yolu ile düzenlediği hücre yaşamı ve kemotrepötik apoptozun baskılanmasına neden olmuştur (Marastoni ve ark., 2008). αv integrini $\beta1$, $\beta3$, $\beta5$, $\beta6$ ve $\beta8$ ile heterodimer yapar ve RGD-içeren vitronektin, fibronektin, fibrinojen ve osteopontin proteinlerine bağlanır. Servikal kanserinde, $\alpha v\beta3$ integrini hastalığın seyri ile yakından alakalıdır. Ayrıca, pankreatik adenokarsinoma hastalarının % 58'i $\alpha v\beta3$ ekspresyonuna sahiptir (Desgrosellier ve ark., 2009). $\alpha v\beta6$ integrin ekspresyonunun, akciğer, oral karsinoma, meme, pankreas, mide, kolon, ovaryum ve salgı bezi kanserlerinde arttığı gösterilmiştir (Peng ve ark., 2009). $\alpha v\beta4$ integrini bu kanser dokularında invazyonu ve metastazı ekstrasellüler sinyal-İlgili kinaza (ERK) ile doğrudan bağlanarak gerçekleştirir (Peng ve ark., 2009).

$\alpha8\beta1$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha v\beta5$, $\alpha v\beta3$ gibi integrin reseptörleri ECM protein olarak fibronektine bağlanma yeteneğine sahiptirler. Fibronektin proteini, 2. kromozom (insan) üzerinde tek bir gen ile kodlanmıştır (Ayad ve ark., 1994) ve

alternatif splay işlemleri ile farklı izoformları bulunmaktadır. Disülfid bağları ile birbirine bağlı iki alt üiteden oluşmaktadır. Arjinin-Glisin-Aspartik asit (RGD bölgesi) aminoasitlerinden oluşan motif bölgeye $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ integrinlerinin bağlandığı, Glutamik asit-İzolösin-Lösin-Aspartik Asit-Valin (EILDV) aminoasitlerinden oluşan bölgeye de $\alpha 4\beta 1$ integrini bağlanmaktadır. Ayrıca, tip III V (CS) bölgesi hücresel fibronektin proteininin her iki alt ünitesinde bulunurken, plazma fibronektinin yalnızca bir alt ünitesinde yer almaktadır. Bu alternatif splay bölgesi $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ ve $\alpha 9\beta 1$ için bağlanma kısmını oluşturmaktadır (Magnusson ve Mosher, 1998).

Özellikle $\alpha 5\beta 1$ integrini spesifik olarak fibronektin bağlanma reseptörü olarak tanımlanmıştır. $\alpha 5\beta 1$ integrini aktin sitoskeleton yapısı ile fokal bağlanma bölgesinde yer alan Tensin protein üzerinden bağlanır ve bu durum integrin-bağlı kinazın (ILK) ve sistein-histidin-zengin proteininin (PINCH) inhibisyonuna neden olarak fokal kontak bölgesinin oluşumunu engeller (Stanchi ve ark., 2009). $\alpha 5\beta 1$ integrininin *vitro* bu etkisi tümör tümör hücrelerinin invazif potansiyelini ve migrasyonunu arttırarak metastaz oluşumunu hızlandırır. Bu bağlamda $\alpha 5\beta 1$ integrini ile yapılan deneysel çalışmalar, $\alpha 5\beta 1$ integrininin Rab25 proteini ile etkileşerek bazı epitel kanser tiplerinde tümör yayılımını uyardığı gösterilmiştir (Tang ve Ng, 2009). $\alpha 5\beta 1$ heterodimerinin prostat kanser hücrelerinin sürekli olarak invazif bir özellik kazanmalarına neden olduğu da bulunmuştur (Jia ve ark., 2004). Bunun tersine; HT29 kolon karsinoma hücrelerinde (Varner ve ark., 1995) ve Chinese Hamster Ovary (CHO) (Giancotti ve Ruoslahti, 1990) $\alpha 5\beta 1$ integrininin in vitro ortamda cell proliferasyonunu durdurucu bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. $\alpha 5\beta 1$ integrininin hücre tipine spesifik olarak hem tumoriyenik etkisi hem de antitumoriyenik etkisine sahiptir.

Bu integrinlerin özellikle metastatik hücrelerde aşırı eksprese olmaları, metastaz için bir işaretleyici olarak görev alabilecekleri düşünüldüğü gibi antitumoriyenik etkileri ile tedavide hedef molekül olabilme özelliğine de sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Bu amaç için; F8, B7, D5 (Villa ve ark., 2008), L19 (Kaspar ve ark., 2006), Vitaxin/MEDI-522 (Mcneel ve ark., 2005) ve volociximab (M200) (Figlin ve ark., 2006) gibi monoklonal antikolar ve peptitler

sentezlenmiştir. Volociximab anti- $\alpha 5\beta 1$ antikoru olarak geliştirilmiş ve metastatik melanoma, renal hücre karsinoması ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserine karşı klinik Faz I ve Faz II çalışmalarında değerlendirilmiştir (Figlin ve ark., 2006).

1.3. İntegrin ve Apoptoz İlişkisi

Endotel hücrelerinin fibronektine ya da anti- $\beta 1$ -integrin antikoruyla bağlanması, hücrelerin bağlanma-İlgili apoptozdan (anoikis) kaçtığı göstermiştir. Epitel, endotel ve bazı tümör hücrelerinin matrikse integrinler aracılığıyla bağlanması apoptozu inhibe ederek hücre yaşamını uyardır (Montgomery ve ark., 1994; Boudreau ve ark., 1994). Spesifik integrinlerin farklı yetenekleri farklı sinyal yollarını kullanarak hücrelerin anoikisden kaçmasını düzenlemektedir. Ancak, bu çalışmalar az sayıdaki hücre tipi ile yapılmış olup, farklı hücre tiplerinde integrinlerin farklı sinyal yollarını tetiklediği ve bir hücre tipinde yaşam sinyallerini iletirken diğer hücre tipinde anoikis sinyallerinin iletimini sağlayabilmektedir. İntegrinlerin ligasyonu, apoptozun baskılanmasında anahtar düzenleyici göreve sahip olan Bcl-2 proteininin ekspresyonunu düzenler (Zhang ve ark., 1995). Endotel hücrelerinde $\alpha v\beta 3$ 'ün ligasyonu p53 aktivitesini baskılayarak, p21WAF1/CIP1 ekspresyonunu inhibe eder ve Bcl-2:Bax oranını arttırarak hücre canlılığını uyarır (Zhang ve ark., 1995). Diğer taraftan $\beta 4$ sitoplazmik bölgesinin ekspresyonu p21 aktive ederek, rektal karsinoma hücrelerinde büyümeyi durdurucu etki gösterir (Clarke ve ark., 1995). $\beta 1$ integrini PI3-kinaz/Akt yaşam sinyalini aktive eder ve bu aktivasyon durumu kemoterapötik ilaçların uyardığı hücre döngüsünün durdurulması ve kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe eder (Hodkinson ve ark., 2006). Prostat kanser hücrelerinde, DU145 seramid ya da doketaksiel tarafından uyarılan apoptoz fibronektin- $\beta 1$ ligasyonu ve insulin-benzer büyüme faktör tarafından inhibe edilir (Thomas ve ark., 2010). MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 meme kanser hücrelerinde paklitaksiel ve vinkristine ile uyarılan apoptoz, $\beta 1$ alt ünitesinin ligasyonu sonrasında baskılanır. Bu etki sitokrom c'nin mitokondriden salınımının durdurulması ile gerçekleşir (Aoudjit ve Vuori, 2001).

İleri aşamada bulunan glioma hücrelerinde $\alpha 5\beta 1$ integrin sinyal yolağının p53 sinyal yolağı ile karşılıklı olarak negatif etkileşimi glioblastomanın kemoterapiye karşı dirençli olmasına neden olmaktadır. $\alpha 5\beta 1$ integrinini spesifik antikör ya da küçük RGD-benzer antagonist ile bloke edilmesi kaspaz-8 ve kaspaz-3 bağımlı apoptozun güçlü bir şekilde uyarılmasına neden olur (Renner ve ark., 2015). Benzer şekilde, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışma, $\beta 1$ sitoplazmik bölgenin kaspaz-8 ile etkileşimi fukoidan inkübasyona sonrasında gerçekleşmiş ve apoptozu uyarmıştır (Yamasaki ve ark., 2012). αv integrin-ERK-düzenleyici yaşam sinyalleri ve hücre döngüsünde tutulma ovaryum hücrelerinin anoikis'e karşı dayanıklı olmasına neden olabilir (Carduner ve ark., 2014).

İntegrinler ekstrinsik (dış yolak) apoptozu protein kinaz C (PKC) aktivasyonu üzerinden de düzenlemeye yardımcı olurlar. PKC hem hücreyi apoptozdan korur hem de apoptozun uyarılmasını sağlar. PKCs izoenzim $\alpha v\beta 3$ integrini ile birlikte kümelenir ve adezyon-bağımlı ERK1/2 aktivasyonuna katkı sağlar. Bir çalışmada, SKOV-3 ve IGROV1 insan ovaryum hücreleri, tutunmaya-bağımlı yaşam sinyallerin iletilmesinde model olarak kullanılmıştır. $\alpha v\beta 3$ integrini IGROV1 hücrelerinde eksprese edilirken, SKOV-3 hücrelerinde hem $\alpha v\beta 3$ hem de $\alpha v\beta 5$ eksprese edilir. αv integrinini ekspresyonu ve PKCs aktivasyonu, ERK1/2 stimülasyonu ile birlikte IGROV1 hücrelerini anoikis'den kurtarıırken, tutunmadan-bağımsız durum SKOV-3 hücrelerinin büyümesinin durdurulmasını tetikler (Carduner ve ark., 2014).

1.4. Sitoplazmik Kalsiyum Artışı ile İntegrin Etkileşimi

İntegrinlerinin sitoplazmik kalsiyum hareketliliğinin düzenlenmesindeki rolü trombosit, lökosit, endotel, fibroblast ve osteoblast gibi birçok hücre tipinde gösterilmiştir (Sjaastad ve ark., 1996). $\beta 2$ lökosit integrini kalsiyum artışı ile birlikte değerlendirilmektedir. Ancak bununla birlikte, RGD bağlanma bölgesi içeren ligandlarla ilgili $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ ve $\alpha v\beta 3$ integrinlerinin de kalsiyum hareketliliği ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Schwartz, 1993; Sjaastad ve ark., 1996). İntegrin ve kalsiyum ilişkisi oldukça kompleks bir yapıya sahip olmakla

birlikte, birçok hücre tipinde tam olarak anlaşılammıştır. Trombosit hücrelerinde, α I**II** β 3 integrininin kalsiyum homeostazında önemli rol oynar ve trombosit aktivasyonunu takiben kalsiyum akışını uyarmaktadır (Sage ve ark., 1993). Bunun tersine, başka bir çalışma ise trombositlerin uyarıcılarına bağlı olarak, α I**II** β 3'e ligand bağlanması ile kalsiyum mobilizasyonu uyarılır ya da inhibe eder (Rosado ve ark., 2001).

Kalsiyum artışına bağlı integrin aktivasyonunda, kalsiyum-bağlanma proteinlerinin örneğin; kalretikulin, önemli görevleri bulunmaktadır. Coppolino ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; α I**II** integrin alt ünitesinin KVGFFKR dizisine kalretikulinin bağlandığı ve integrin aktivasyonu için gerekli olduğu rapor edilmiştir (Coppolino ve ark., 1995). Kalretikulinin hem integrin reseptörünün bağlanma işlevinde hem de integrinin başlattığı sinyal yolağında önemli olduğu, ancak kalsiyumun depolanmasında belirli bir rol oynamadığı bilinmektedir (Coppolino ve ark., 1997). E63 iskelet kası hücrelerinde, α 7 alt ünitesinin laminin ya da anti- α 7 antibody ile bağlanması intrasellüler serbest kalsiyum düzeyinde hem kalsiyum hücre içi depolarından hem de voltaj-düzenleyici L-tipi kalsiyum kanallarından bir artışa neden olmuştur. α 7 integrininin sitoplazmik kuyruk kısmı sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olarak kalretikulin ile etkileşir. Kalretikulin integrinin sitoplazmik aktivatörü olarak görev yapar ve aynı zamanda hücre yüzeyinde kalsiyum kanalları ve integrinler arasında bağlantıyı sağlar (Kwon ve ark., 2000).

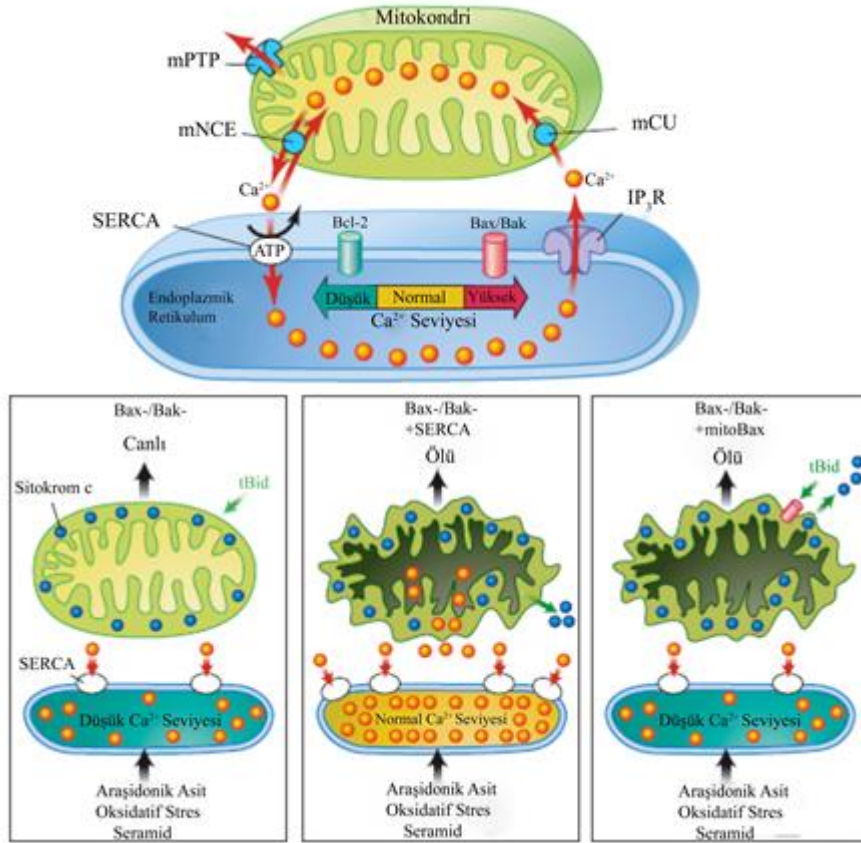
İntegrinlerin fibronektin ile stimülasyonu kalsiyum sinyali üretimine ve buna bağlı olarak da Ras/Raf-1/Mek/Erk yolağı üzerinden hücre proliferasyonunun uyarılmasına neden olmaktadır. Bu sistemdeki kalsiyum artışı kalsiyum bağlanma proteininin olan kalmodulin ve Ca^{+2} / kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (CaMKII) 'nin aktivasyonunu sağlar. İntegrin-fibronektin bağlanması, CaMKII'nin aktivasyonu ve fosforilasyonu ile ilişkili olarak sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır (Illario ve ark., 2003). T hücrelerinin kalsiyum akışını uyarıcı bir molekül (ionomaysin) ile inkübasyonu ya da fibronektine bağlanması, kalsiyum bağımlı proteazlar olarak bilinen kalpainlerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktif kalpainler daha sonra

protein tirozin fosfataz 1B'nin kırılmasına ve p130cas sinyal yolağının uyarılmasına neden olmaktadır (Rock ve ark., 1997). Endotelial hücrelerde 50 kDa'luk integrin-ilişkili proteinin (IAP) integrin-düzenlediği kalsiyum akışında spesifik olarak görev yaptığı ve IAP proteininin integrin-ilişkili kalsiyum kanalı olabileceği önerilmektedir (Schwartz ve ark., 1993).

1.5. Kalsiyum İyonunun Apoptozdaki Rolü

Kalsiyum iyonu, normal de birçok fizyolojik olayın başlatılmasında gerekli bir sinyal iletim molekülü olarak görev yapmaktadır. Normal ortamda, kalsiyum sürekli olarak endoplazmik retikulum (ER) ile mitokondri arasında yer değiştirir (Şekil 1.6). Kalsiyum ATPaz (SERCA) pompaları vasıtasıyla kalsiyum ER içine pompalanır ve IP₃-kapılı kanallar (IP₃R) vasıtasıyla da salınımı gerçekleşir (Demaurex ve Distelhorst, 2003). Kalsiyum mitokondriye ise Ca⁺² uniport (mCu) ile girer ve Na⁺/Ca⁺² değişim (mNCE) kanalları ile salınır. Ancak, iletimin yanlış zaman ve yanlış yerde gerçekleşmesi ölüm sinyal olarak dönüşmesine neden olabilir. Mitokondriyer kalsiyum sinyalinin ölüm ya da yaşam sinyali olduğunu belirleyen organellerdir (Szalai ve ark., 1999). Kalsiyumun ER'den mitokondriye taşınması apoptozun başlaması için gereklidir, fakat her apoptotik sinyal için bu gereklilik geçerli değildir (Scorrano ve ark., 2003).

Pro- ve anti-apoptotik Bcl-2/Bax aile üyelerinin dengesi ER kalsiyum içeriğini belirler. Anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinin aşırı ekspresyonu ER kalsiyum yüklemesini azaltarak, hücreyi apoptozdan korumaktadır (Foyouzi-Youssefi ve ark., 2000). Bax, Bak gibi pro-apoptotik proteinler ise, ER-mitokondri bağlantısını sağlarlar (Wang ve ark., 2001) ve bu durum apoptozu uyarır.



Şekil 1.6. ER ve mitokondri arasındaki Ca^{+2} ilişkisi (Demaurex ve Distelhorst .,2003)

ER ve mitokondri aracılı apoptozun uyarılması üç kategoriye ayrılır.

1. Araşidonik asit, seramid ve oksidatif stres durumlarında, uyarıcı ER Ca^{+2} kapısına bağlanır ve bu durum mitokondride Bax/Bak eşleşmesini gerektirmez.

2. Uyarıcı ER Ca^{+2} kapısına bağlanmaz, fakat mitokondride Bax/Bak eşleşmesine ihtiyaç duyar. Örneğin; BH3 proteini olan tBid.

3. Uyarıcı her iki yolda da etkiler. Örneğin; T hücre reseptör aktivasyonunda, etoposide ve brefeldin A (Demaurex ve Distelhorst, 2003). Bu durumda, mitokondride hem Ca^{+2} hem de Bax ve Bak varlığına ihtiyaç duyulur. ER Ca^{+2} ve Bax/Bak düzeyi ölüm potansiyelini değiştirir.

Ca^{+2} artışı ile Bax/Bak proteinleri arasındaki bu değişim öncelikle Ca^{+2} aktarımına izin veren IP_3 reseptörlerinin ve SERCA proteinlerinin aktivitelerinin

değişimi ile ilgilidir. Bir diğer etkili protein ise anti-apoptotik protein olan Bcl-2 dir. Bax/Bak ile anti-apoptotik protein olan Bcl-2 arasındaki denge ER Ca^{+2} yüklemesini belirler (Demaurex ve Distelhorst, 2003).

Hücrede ER stres sonucunda intrasellüler ortamda artan serbest Ca^{+2} iyonları sistein proteinaz ailesinden kalpainlerin aktivasyonuna sebep olmaktadır. İnsanlarda 14 izoformu bulunan kalpain genlerinden mikro (μ ,1)-kalpain ve mili (m, 2)- kalpain benzer proteaz domeini içermektedir (Sorimachi ve ark., 2010). Kalpain 1 aktivasyonu sonrasında mitokondri iç membranında bulunan AIF'ın parçalayarak sitozole salınmasına sebep olur. Böylece kaspaz bağımsız olarak DNA fragmentasyonu oluşturup apoptoza sebep olmaktadır (Sevrioukova, 2011).

Kalpain 1 aynı zamanda sitozolde inaktif halde bulunan pro-apoptotik protein Bid'in aktifleşmesini sağlayarak mitokondri membranında Bax/Bad lokalizasyonunu etkileyerek mitokondri membranında permabilizasyona sebep olur ve apoptoza yol açmaktadır (Smith ve Schnellmann, 2012).

Kalpain 2'nin direkt olarak pro-kaspaz-7-12'yi aktifleştirdiği ve kaspaz kaskadları ile ekstrinsik yolak aralığı ile apoptoza sebep olduğu bilinmektedir (Storr ve ark., 2011).

1.6. İntegrin Ekspresyonunun Ovaryum Kanseriindeki Rolü

Epitel ovaryum kanserleri ovaryum malignant neoplazmaların en genel bilinen tipidir. Epitel ovaryum kanserleri fallopian kanalının epitelium tabakasından ya da ovaryum yüzey epitelium tabakasından orijin almıştır (Koshiyama ve ark., 2014). Birçok epitel ovaryum kanser hastaları asemptomatik yollarla karakterize edilir, ancak teşhis ileri evrede mümkün olmaktadır. Bu durumda tümör peritoneal boşluğu dissemina olmuştur. İleri-düzeydeki hastaların ancak %20-30'sinde 5 yıl yaşam oranı rapor edilmiştir (Brun ve ark., 2000). Ovaryum kanseri sırasında karında biriken assit tümörün intraperitoneal ve retroperitoneal yayılımı ile ilişkili olmasından dolayı, metastazın oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Ayhan ve ark., 2007). Kanser hücreleri ovaryum yüzeyinden assite tek bir hücre formunda ya da küresel formda yayılım gösterirler. Bu yüzen malignant hücreler buldukları ortamda yani ECM

bağlantısı olmadan yaşamak ve proliferere olmak zorundadır. Assit ortamı dinamik bir ortam olup, yaşam faktörleri (sitokinler, büyüme faktörleri, anjiogenik faktörler, hormonlar, proteazlar ve ECM proteinleri gibi) içermektedir ve bu nedenden dolayı özel bir tümör mikro çevresi olarak görev yapar. Tüm bu moleküller kanser hücrelerinin migrasyonunu, invazyonunu, yaşamını ve küresel formasyonunu düzenler (Puiffe ve ark., 2007). Özellikle, ECM proteinlerinden fibronektin ve vitronektin ovaryum tümörünün mikro çevresinde bulunan anahtar moleküllerdendir. Fibronektin, ovaryum kanseri sferoid oluşumunu, tutunmayı ve disaggregasyonu tetiklemektedir. Metalloproteinaz-2 ile fibronektin ve vitronektinin kısa fragmanlara ayrılması ovaryum kanser hücrelerini peritoneal bölgeye bağlanmasını arttırmakta ve bu durum metastaz için başlatıcı basamağı oluşturmaktadır (Kenny ve ark., 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, klinik ve moleküler biyolojik işaretleyicilerin tek başına epitel ovaryum kanserlerinin teşhisi için yeterli olmadığını göstermiştir (Aust ve Pils, 2014). Bu nedenle, epitel ovaryum kanserinin moleküler temelini tam olarak anlaşılması, yeni spesifik biyolojik hedef moleküllerinin tanımlanabilmesi için son derece önemlidir.

Bu çalışma, SKOV-3 hücrelerinde metastatik olarak bilinen integrin aktivasyonu sonrasında ER stresine bağlı olarak sitoplazmik kalsiyum ve mitokondriyel kalsiyum mobilizasyonunun görüntülenmesi, sitoplazmik kalsiyum artışına bağlı olarak hücre-fibronektin bağlanma kapasitesindeki değişimlerin belirlenmesi ve oluşturulan ER stresi sonrasında apoptotik yolların mRNA ekspresyon düzeyinde incelenmesini amaçlamaktadır.

2. GEREÇLER

2.1. Hücre Hattı

SKOV-3 (İnsan ovaryum adenokarsinoma) hücre hattı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Volga Durmuş'un laboratuvarından temin edilmiştir.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fibronektin (Sigma, Aldrich-ABD), Tunikamisin (Sigma, Aldrich-ABD), EGTA (Sigma, Aldrich-ABD), DMEM (Gibco, ABD), dimetilsülfoksit (DMSO) (Appllichem-Almanya); Etil alkol (Sigma, Aldrich-ABD), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom-Germany), penisilin-streptomisin solüsyonu (Gibco-ABD), MEM non EAA(Gibco, ABD), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck- Almanya), tripsin (Biochrom- Almanya); Fluo-3 AM (Sigma, Aldrich-ABD), Rhod-2 AM (Santa Cruz,ABD), Ru360 (Santa Cruz,ABD) Bovine Serum Albümin, Pluronic (Sigma, Aldrich-ABD), RNA izolasyon kiti (Norgen, Norveç), cDNA sentez kiti (Thermo-ABD), PCR Prob Master (Roche-Almanya), Agaroz (Sigma, Aldrich-ABD), etidyum bromür (Sigma, Aldrich-ABD), DNA marker (Sigma, Aldrich-ABD)

2.3. Kullanılan Cihazlar

Azot Tankı (Taylor Wharton-Almanya); buzdolabı (Arçelik- Türkiye); karbondioksitli (CO₂'li) etüv (Hera Cell 240 Thermo Scientific-Almanya); derin dondurucu (-20°C) (Arçelik No Frost-Türkiye); distile su cihazı (Nüve- Türkiye); filtre (Sartorius-Almanya); floresan mikroskop (Leica DMI 4000B-Almanya) hassas terazi (Ohaus-İsviçre); inverted mikroskop (Leica-Almanya); laminar kabin (Steril Kabin) (Heal Force-Çin); otoklav (ALP-Japonya); santrifüj (Hettich-Almanya); Microfuge 20R Santrifüj (Beckman Coulter-A.B.D) sterilizatör (Nüve FN 500-Türkiye); su banyosu (Nüve BM 302-Türkiye); vorteks (Yellowline-Belçika) DNA/RNA UV kabini UVT-B-AR (Biosan-Türkiye); RT-PCR cihazı LightCycler Nano System (Roche- Almanya), Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Roche- Almanya), Jel görüntüleme sistemi BioSpectrum 510

(UVP-İngiltere); akım kaynağı E844 (Consdet-A.B.D); yatay jel elektroforezi ünitesi (Consdet-A.B.D); Nanodrop, BioSpec-Nano, Shimadzu, USA

3. YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

SKOV-3 hücreleri % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde, % 5 CO₂'li etüvde 37°C'de kültür ortamında tutulmuştur. Hücreler 1× tripsin-EDTA solüsyonu ile her 3 günde bir 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürlerle ayrılarak pasajlanmışlardır.

3.2. Kalsiyum Dağılımının Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi

24 kuyucuklu plakalar kaplamasız olarak ya da 50 µg/ml fibronektin eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. 1×PBS ile 2 kez yıkamanın ardından %1 BSA ile 1 saat 37°C' de inkübe edilerek her kuyucuğa 1 × 10⁵ SKOV-3 hücresi serumsuz medium içerisinde eklenmiştir. Hücre bağlanması için 2 saat 37°C'de inkübasyon sonrasında 2 kez 1×PBS ile yıkama yapılmıştır.

İntrasellüler Ca⁺² artışını belirlemek için Fluo-3 AM boya karışımı (HEPES buffer içerisinde Fluo-3 AM 16 µM, %0,1 BSA, %1 pluronic f127), her kuyucuğa 100µl eklenmiştir. Hücreler boya ile 37°C' de 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile 2 kez yıkamanın ardından 200µl HEPES buffer (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 10 mM Glukoz, %1 BSA) içerisinde Tunikamisin (12-18-24 µM) konsantrasyonları eklenmiştir ve belirli zaman aralıklarında floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

Mitokondriyal Ca⁺² artışını belirlemek için ise, Rhod-2 AM boya karışımı (PBS içerisinde Rhod-2 AM 5 µM, %2 pluronic f127) her kuyucuğa 100µl eklenmiştir. Hücreler boya ile 37°C' de 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile 2 kez yıkamanın ardından 1mM Ca⁺² içeren HEPES buffer içerisinde TN (12-18-24µM) konsantrasyonları eklenerek hem hücre dışından hücre içine Ca⁺² girişi ile hem de hücre içi depolardan Ca⁺² salınması ile mitokondriyal Ca⁺² artışını dolaylı olarak floresan yoğunluğu ile ilişkilendirilerek belirli zaman aralıklarında floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

Kalsiyum içermeyen HEPES buffer içerisinde TN konsantrasyonları uygulanması sonucunda ekstrasellüler ortamda kalsiyum bulunan sadece hücre içi depolardaki kalsiyumun salınması sonucunda mitokondriyal Ca^{+2} artışını dolaylı olarak floresan yoğunluğu ile ilişkilendirilerek belirli zaman aralıklarında floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

Rhod-2 AM işaretli SKOV-3 hücrelerine ekstrasellüler Ca^{+2} şelatörü olan EGTA (5mM) uygulanarak floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

Mitokondriye kalsiyum geçişini sağlayan kanalların inhibisyonu için SKOV-3 hücreleri Rhod-2 AM ile boyanmadan önce 37 °C’de 1 saat Ru360 (10 μ M) ile ön muamele yapılmıştır.

3.3. Hücre Adezyonu

Fibronektin ile kaplanan 16 kuyucuklu E-plakalarda ovaryum hücrelerinin bağlanma kapasiteleri tunikamisin varlığında / yokluğunda Xcelligence Real Time Cell Analyzer (RTCA) ile belirlenmiştir. Fibronektin eklenen E-plakalar 1 saat 37 °C’de inkübe edilmesinin ardından her bir kuyucuk 1×PBS ile 2 kere yıkama işlemi yapılmıştır. Spesifik olmayan bağlanmanın önlenmesi için kuyucuklar % 1’lik BSA (w/v) solüsyonu ile 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 1×PBS ile yıkamanın ardından 100 μ l serumsuz medium eklenerek Xcelligence sistemi için background ölçümü yapılmıştır. Ardından 100 ml 1×10^4 hücre her kuyucuğa eklenerek 2 saat boyunca her 15 dakikada bir kez ölçüm alınmıştır. Hücrelerin kuyucuklara bağlanmasının ardından TN konsantrasyonları eklenmiştir. Madde uygulaması sonrasında, ilk 2 saat boyunca her 2 dakikada bir kez ölçüm alınmıştır. Sonrasında ise, her 15 dakikada bir kez ölçüm alınarak 24 saat boyunca fibronektin kaplı kuyucuklarda TN uygulamasının hücre bağlanmasına etkileri Real time cell analyzer (RTCA) software kullanılarak belirlenmiştir. TN uygulaması sonrasında E-plakalar 2-24-48 saat sonrasında ışık mikroskobu ile görüntülenerek hücre morfolojindeki değişiklikler fotoğraflanmıştır.

3.4. mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi (Gerçek-zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR) Analizleri

3.4.1. Total RNA izolasyonu

Fibronektin kaplı / kaplamasız besi kaplarında 1×10^6 SKOV-3 hücresi eklenerek iki saat hücre bağlanmasının ardından 30 dakika TN ile 37°C ' de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından RNA izolasyonu için Total RNA Purification Plus Kit (Norgen, Kat No:48300) prosedürü izlenmiştir. Hücreler bir kez PBS ile yıkamanın ardından 350 µl Buffer RL olarak besi kaplarına eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kazıyıcı yardımı ile hücre lizatları genomik DNA (gDNA) uzaklaştırma kolonuna alınır. 1 dakika $14.000 \times g$ 'de santrifüj sonrasında gDNA kolona bağlanmaktadır. Santrifüj sonrasında tüpte biriken sıvıya her 100 µl için 60 µl %96 etanol eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Tüm karışım RNA saflaştırma kolonundan geçirilerek RNA'nın kolona tutunması sağlanmıştır. RNA bağlı kolonlar yıkama solüsyonu ile santrifüj edilmiştir ve kolonlarda etanol kalıntılarının uzaklaştırılması için ekstra santrifüj yapılarak kolon kurutulmuştur. Her kolona 50 µl elüsyon solüsyonu eklenerek elde edilen total RNA kolondan tüplere alınmıştır ve cDNA sentez aşamasına geçilmiştir.

3.4.2. RNA'nın kalitesi, saflığı ve miktarının belirlenmesi

Elde edilen total RNA'nın miktarı ve saflığı nanodrop cihazı ile belirlenmiştir. Tüm örneklerden 1,5 µl alınarak 260/280 ve 260/230 dalga boyunda oranları belirlenmiştir. RNA'nın kalitesi ise %1 agaroz jelde yatay elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir.

3.4.3. Total RNA örneklerinden cDNA sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, (Thermo Scientific, ABD) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. 500 ng total RNA örneklerine 1 µl random hexamer primer eklenerek toplam hacim 12 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Tüm örnekler 65°C 'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun

ardından revers transkripsiyon amacıyla aşağıdaki karışım hazırlanarak 12 µl RNA karışımına eklenmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı

Komponent	Miktar
5× Reaksiyon Buffer	4 µl
RiboLock RNaz inhibitörü (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl

Hazırlanan 20 µl karışım 5 dakika 25°C ‘de inkübasyonun ardından 60 dakika 42°C ‘de inkübe edilmiştir. Sentezlenen cDNA örnekleri RT-PCR’ da kullanılmak üzere -20°C ‘de saklanmıştır.

3.4.4. Primer dizilerinin seçilmesi

Hedef genler ve referans gen primer dizileri Roche, Almanya tarafından dizayn edilen FAM işaretli single assay primer problar kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan single assay primer problar Universal Prob Library veritabanından belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonları için kullanılan primer dizileri assay ID'leri

Primer	Assay ID	Primer	Assay ID
Gapdh	101128	Kaspaz-8	145516
Kalpain-1	108838	Ire-1	145212
Bax	142318	FAK	105750
Sitokrom C	131076	Bcl-2	100083
AIF	100015	Bcl-XL	100088
Endo G	102632	Kaspaz-3	100213
Kalpain-2	109470		

3.4.5. Gerçek-zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR) Analizleri

Polimeraz zincir reaksiyonu Fast Start Essential DNA Probes Master Kiti (Roche Kat No: 06402682001) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 8'li PCR tüplerine aşağıdaki karışım hazırlanarak eklenmiştir.

Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu için hazırlanan karışım

Komponent	Miktar
Master miks	10 µl
Primer prob miks	1 µl
Nükleaz içermeyen su	7,5 µl
cDNA	1,5 µl

Total hacim 20 µl'ye tamamlanarak 1.500 × g' de santrifüj yapılmıştır ve 8'li PCR tüpleri Lightcycler Nano cihazına alınmıştır. Döngü sayıları ve sıcaklıkları Çizelge 3.4.5.1' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR döngüleri sıcaklık ve süreleri. Pre-inkübasyon: Enzim aktivasyonu ve kalıp cDNA'nın denatürasyonu, Amplifikasyon: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması ve özgün probler yardımı ile ürünün belirlenmesi, Soğutma: Sistemde yer alan rotorun soğutulması basamaklardır.

Program		Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
Pre-inkübasyon		1	95°C	10 dk
Amplifikasyon	Denaturasyon	45	95°C	10 sn
	Annealing		60°C	30 sn
	Ekstensiyon		72°C	10 sn
Soğutma		1	40°C	10 sn

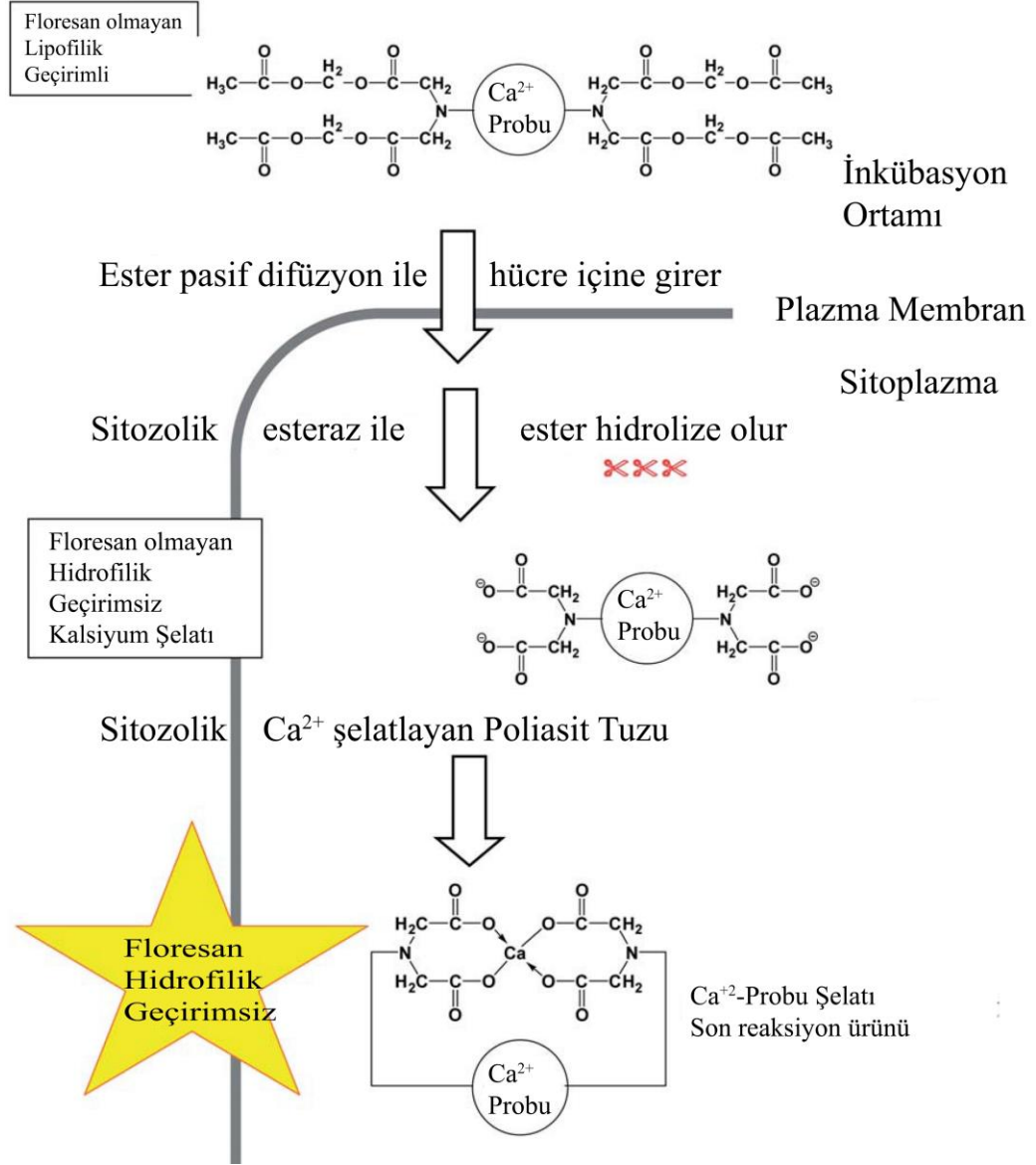
Örnekler gerçek-zamanlı PCR aşamaları tamamlanmasının ardından her bir hedef genin ekspresyon düzeyi referans gen olarak kullanılan Gapdh'a göre relatif olarak oranları belirlenmiştir. Hedef gene ait mRNA ekspresyon düzeyi, aynı örneğin Gapdh'a (aynı zamanda, relatif kantitasyonda eksternal standart) ekspresyon düzeyine göre gerçek-zamanlı PCR sisteminde varolan yazılım programı (LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılım Programı) kullanılarak hesaplanmıştır ve relatif olarak kantite edilmiştir. Eksternal standart, gerçek-zamanlı PCR ile kantitasyon sırasında hedef ve referans cDNA miktarları arasındaki farklılığı, örnek yüklemedeki varyasyonları ve PCR inhibitörlerinin etkisini dengelemede yardımcı olması amacı ile seçilmiştir.

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. İntrasellüler Kalsiyum Dağılımının Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi

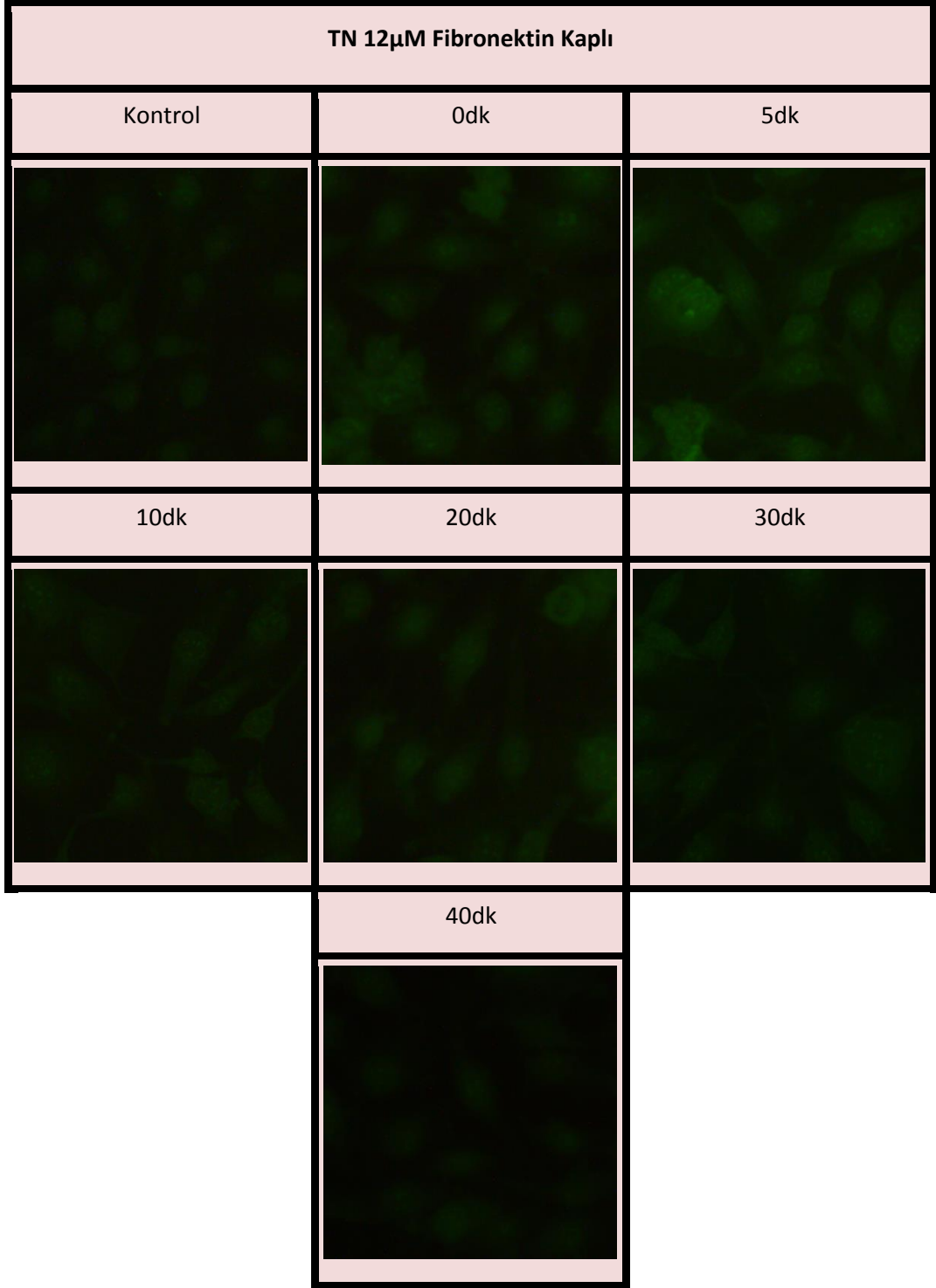
Fibronektin kaplanmış 24 kuyucuklu plakalarda SKOV-3 hücrelerinin Ca^{+2} indikatörü olan Fluo-3 AM boyası ile inkübasyonun ardından 12-18-24 μM TN ile uyarılarak Ca^{+2} artışı görüntülenmiştir. Fluo-3 AM ester grupları sayesinde pasif difüzyon yoluyla hücre membranından geçmektedir. Hücre içerisine alınan AM ester grupları endojen esterazlar tarafından parçalanır ve böylece intrasellüler ortamda bulunan serbest kalsiyuma duyarlı hale gelmektedirler. Sitozolda bulunan serbest kalsiyuma bağlanan Fluo-3 floresan ışımaya yapar ve hücre membranından geçemeyen hidrofilik özellik kazanmaktadır (Thompson ve ark. 2012).

AM Esteri dört veya daha fazla Asetoksimetil Grupları içerir



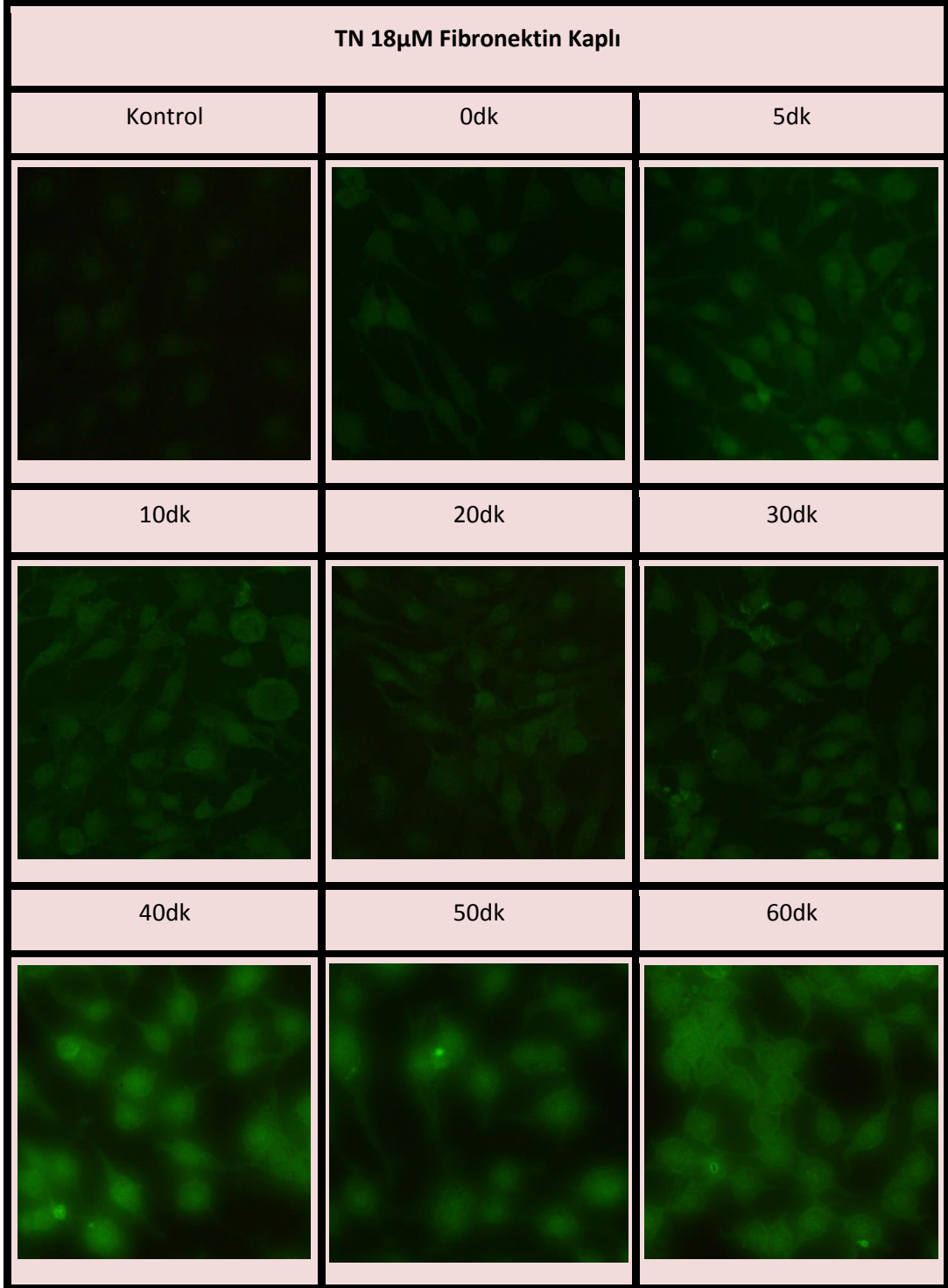
Şekil 4.1. Ca⁺² probleminin (Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM) hücre içerisine geçişi ve Ca⁺² ile bağlanması (Thompson ve ark., 2012)

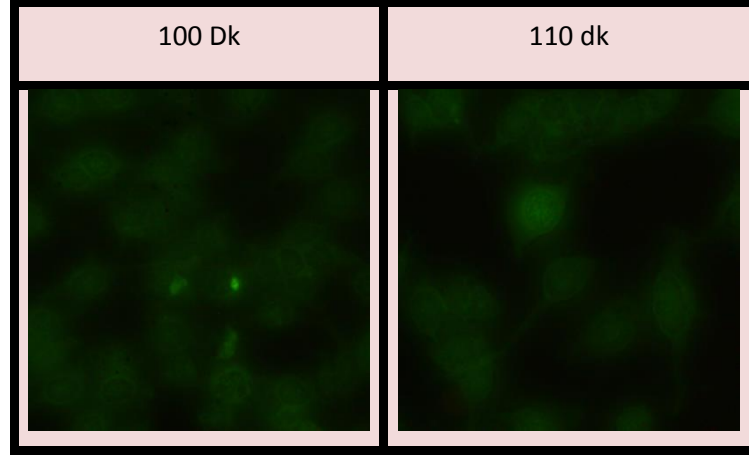
Sitozolda bulunan esterlenmiş Ca⁺² indikatörleri bulunduğu bölgedeki esteraz aktiviteleri sonucunda yeniden esterleşerek intrasellüler organellere geçebilmektedirler. Böylece Fluo-3 çekirdek, mitokondri ve ER'de floresan ışımaya yapmaktadır. Ancak, yeniden esterleşen Fluo-3 difüzyon, anyon transportları yolu ile hücre dışına çıkışı sağlanarak kayıplara yol açabileceğinden sıcaklığa duyarlıdır (Thomas ve ark. 2000).



Şekil 4.2. Fibronektin kaplı plakalarda HEPES buffer (1mM CaCl₂) içerisinde SKOV-3 hücrelerinin 12 μ M TN uygulaması sonrasında kalsiyum dağılımının floresan mikroskop ile görüntülenmesi

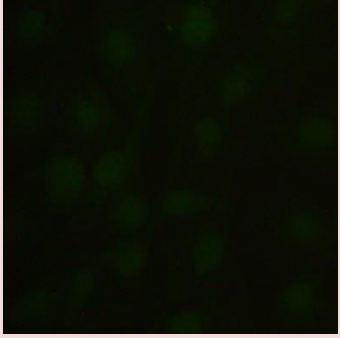
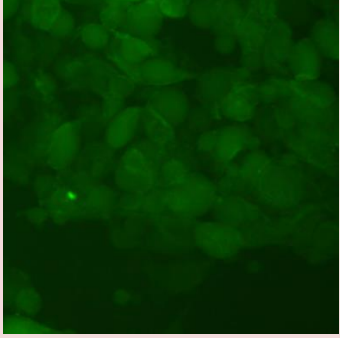
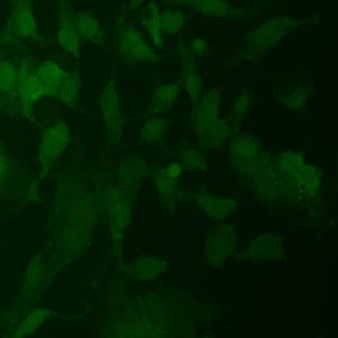
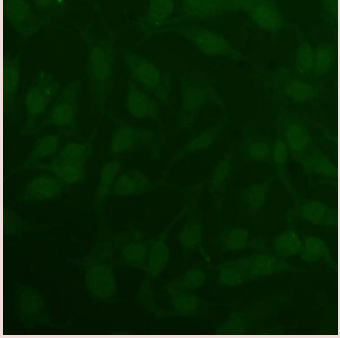
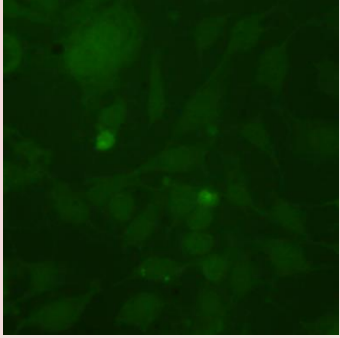
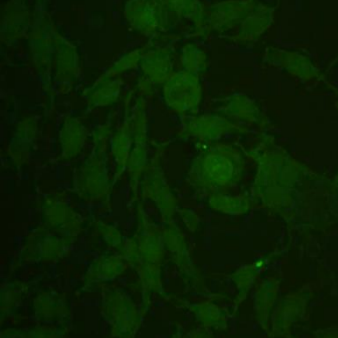
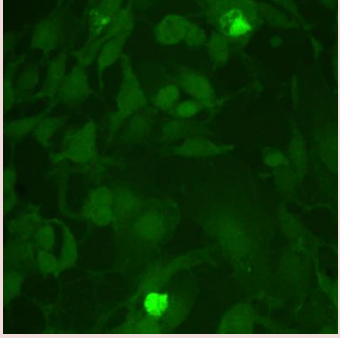
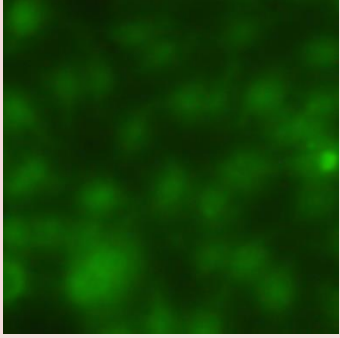
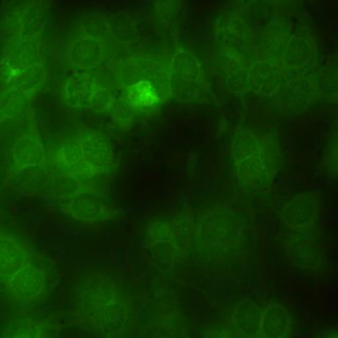
Fluo-3 AM ile işaretlenen fibronektin kaplı 24 kuyucuklu plakalarda SKOV-3 hücreleri 1mM CaCl₂ içeren HEPES buffer içerisinde kontrol grubu fotoğraflanmıştır. Daha sonra TN dozları uygulanarak 0'inci dakikadan itibaren belirli aralıklar ile fotoğraflandığında 12 µM TN uygulaması sonrasında sitozolik Ca⁺² artışının 40 dakika sonrasında ışımının kaybolduğu belirlenmiştir.

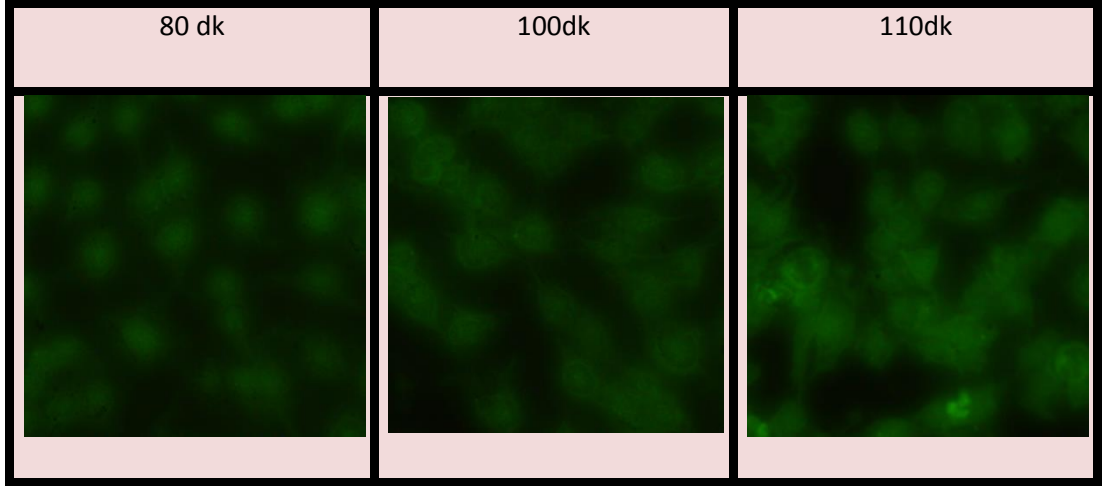




Şekil 4.3. Fibronektin kaplı plakalarda HEPES buffer (1mM CaCl₂) içerisinde SKOV-3 hücrelerinin 18 µM TN uygulaması sonrasında kalsiyum dağılımının floresan mikroskop ile görüntülenmesi (40× büyütme)

18 µM TN uygulandıktan 40.-50. ve 60'ıncı dakikalarda Ca⁺² miktarı artışının en fazla olduğu görülürken 60 dakika sonrasında azaldığı görülmektedir. 12 µM TN uygulamasına göre 18 µM TN uygulamasında tüm zaman dilimlerinde ışımının daha fazla oluşu görülmektedir. Ayrıca 18 µM TN ışıma floresan ışıma yoğunluğu 110 dakikada hala kontrole göre farklılık gösterirken 12 µM TN uygulamasında ışıma süresi 40 dakika sonrasında kontrol ile aynı seviyeye geldiği görülmüştür.

TN 24μM Fibronektin Kaplı		
Kontrol	0dk	5dk
		
10dk	20dk	30dk
		
40dk	50dk	60dk
		



Şekil 4.4. Fibronektin kaplı plakalarda HEPES buffer (1mM CaCl₂) içerisinde SKOV-3 hücrelerinin 24 µM TN uygulaması sonrasında kalsiyum dağılımının floresan mikroskop ile görüntülenmesi (40× büyütme)

24 µM TN uygulaması sonrasında Ca⁺² miktarı artışına bağlı ışımaya yoğunluğu 40.-50. ve 60. dakikalarda olduğu görülürken ışımaya yoğunluğu sonraki zaman dilimlerinde 18 µM TN uygulamasına göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Yapılan literatür taraması sonrasında, ER stresine bağlı kalsiyum değişimlerinin incelenmesi daha çok Fluo-4 AM boyası kullanılarak gerçekleştirildiği görülmüştür (Ziomec ve ark., 2014; Torres ve ark.,2010). Ancak, buna rağmen Fluo-3 AM boyasının da SKOV-3 hücreleri üzerinde güçlü bir kalsiyum indikatörü olduğunu gösteren birçok yayın bulunmaktadır (Chen ve ark., 2012; Carlberg ve ark. 1996; Gao ve ark., 2011). Bizim çalışmalarımızı destekler nitelikte bir çalışma Lei ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada, Fluo-3 ile yüklenen ovaryum hücreleri (PEO14, OAW42 ve COLO316) 48 saat boyunca 2µM TN ile muamele edilerek, kalsiyum değişimi akım sitometrisi ile belirlenmiş ve OAW42 hücrelerinde en yüksek kalsiyum artışın olduğu belirlenmiştir. Bu artışın apoptozun göstergesi olduğu belirtilmiştir (Lei ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında, literatürden farklı olarak yüksek TN konsantrasyonu kullanılmış olmasına rağmen kısa süreli apoptotik etkiye bakılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, integrin aktivasyonu sonrasında

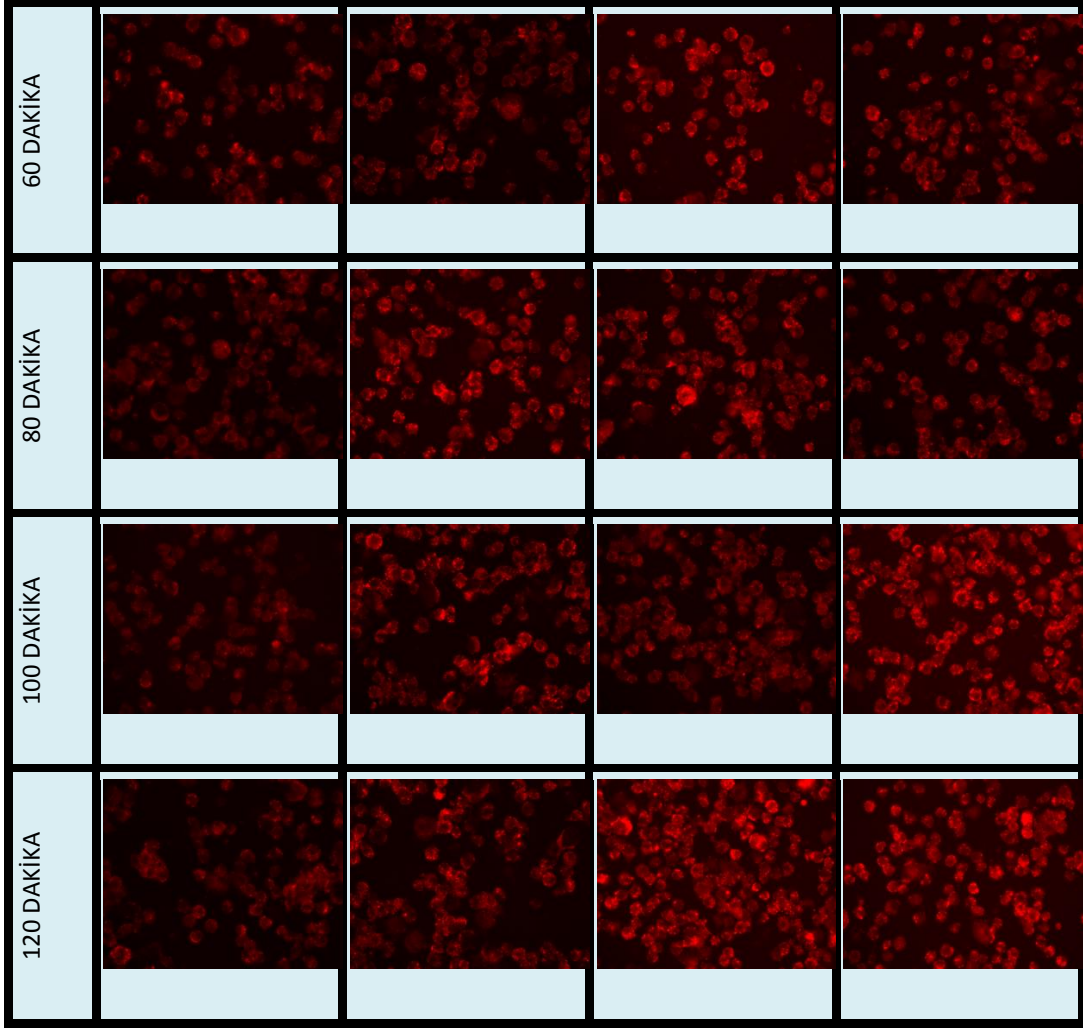
(FN-bağlı hücrelerde) Fluo-3 yüklü SKOV-3 hücrelerinde maksimum kalsiyum artışını, 60 dakika 24 µM TN uygulaması sonrasında tespit edilmiştir. Bu süre içerisinde, integrin aktivasyonu ile metastatik potansiyeli güçlendirilmiş Fluo-3 yüklü SKOV-3 ovaryum hücrelerinin ER stresine bağlı apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, pro-apoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki artışın tespiti ile de desteklenmektedir (Bölüm 4.4).

4.2. Mitokondriyal Kalsiyum Artışının Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi

Mitokondriyal serbest kalsiyumun görüntülenmesi için Fluo-3 AM sistemine benzer şekilde hücre membranından geçebilen AM ester molekülü içeren Rhod-2 AM kullanılmıştır. Hücre içine giren Rhod-2 AM esterinin parçalanmasından sonra pozitif yüklenir ve negatif yüklü mitokondri matriksinde birikmektedir. Mitokondride biriken Rhod-2 serbest kalsiyuma bağlanarak Ca⁺² miktarındaki değişimlerin belirlemesini sağlamaktadır (Muriel ve ark., 2000).

Kaplama yapılmadan kontrol grubu olarak ya da fibronektin ile kaplanan 24'luk plakalarda SKOV-3 hücreleri Rhod-2 AM ile işaretlenmiştir. Rhod-2 işaretli hücreler 12-18-24 µM TN ile uyarılarak iki saat süresince belirli aralıklarla floresan mikroskop ile fotoğraflandırılmıştır.

KAPLAMASIZ PLAKALARDA 1mM CaCl ₂ İÇEREN HEPES BUFFERDA 5µM RHOD-2 AM İLE BOYANMIŞ SKOV-3 HÜCRELERİ				
	KONTROL	TN 12 µM	TN 18 µM	TN 24 µM
0 DAKİKA				
5 DAKİKA				
10 DAKİKA				
20 DAKİKA				
30 DAKİKA				
40 DAKİKA				

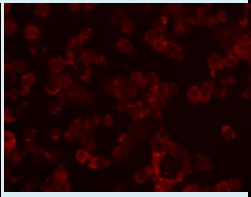
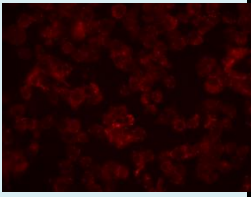
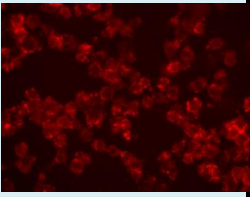
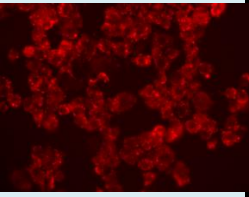
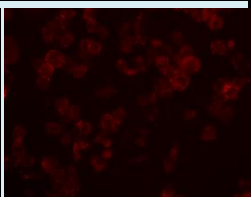
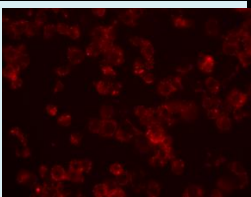
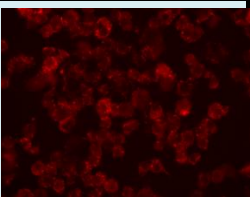
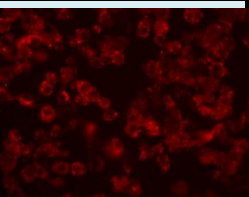
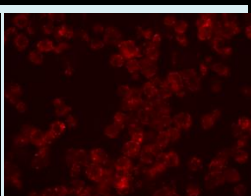
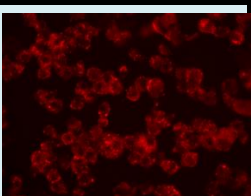
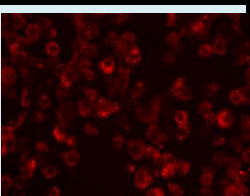
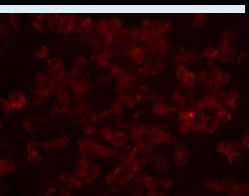
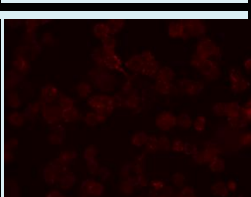
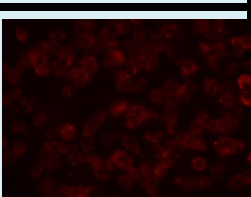
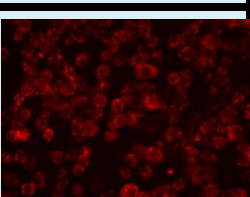
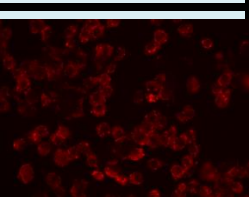
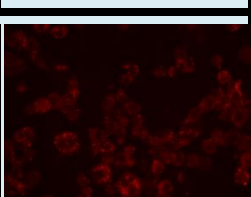
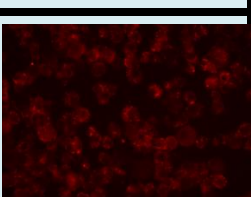
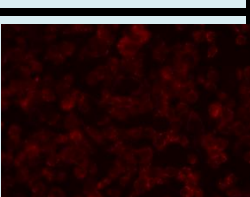
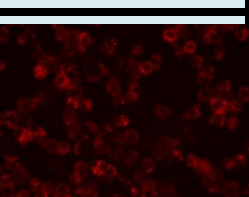
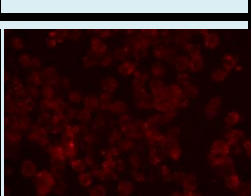
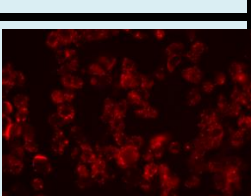
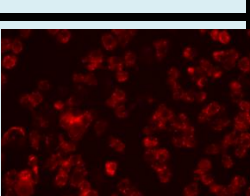
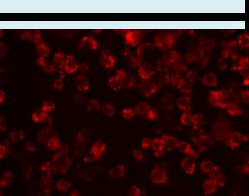


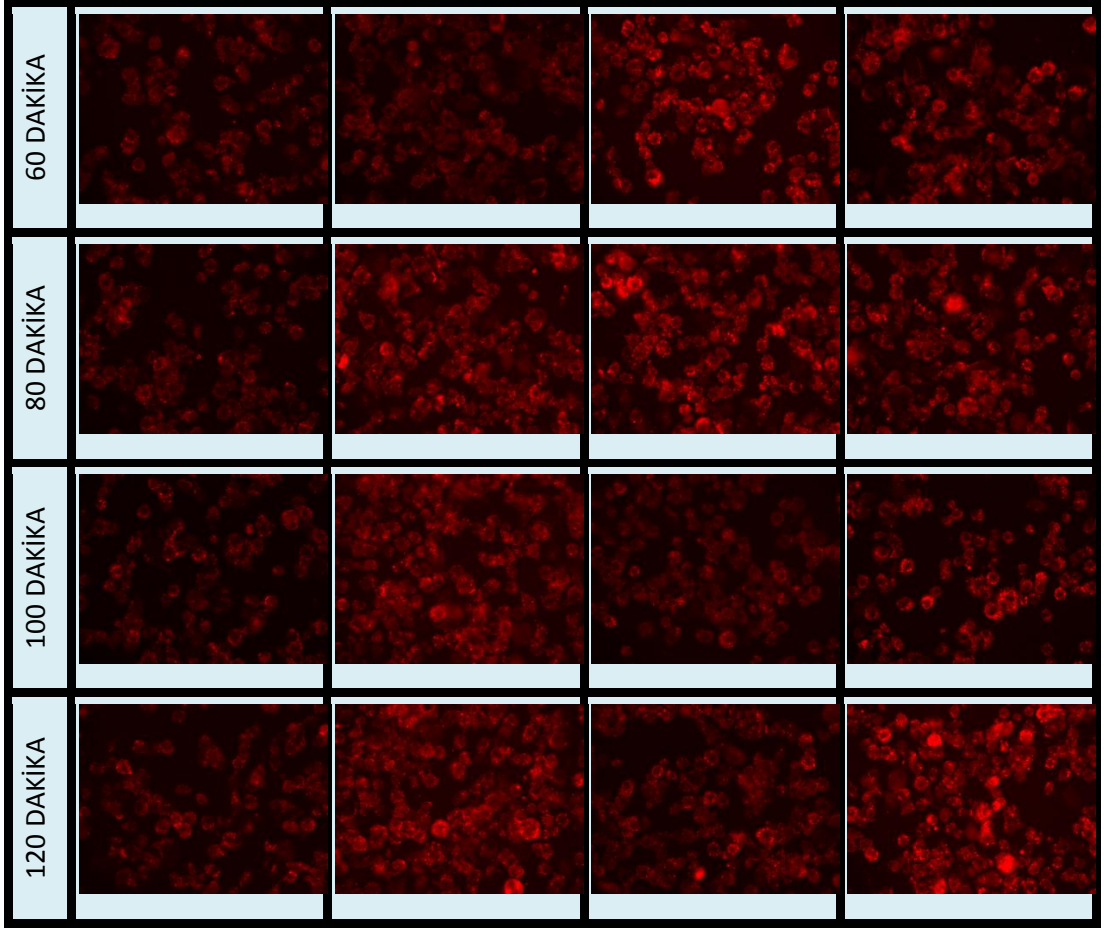
Şekil 4.5. Kaplama yapılmadan Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunun floresan mikroskopda $40 \times$ büyütmede görüntüleri

Kaplama yapılmadan TN uygulanmamış kontrol grubuna göre, $12 \mu M$ TN uygulaması sonrasında mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış ilk madde eklendiği andan itibaren artış göstermektedir. 40. ve 60. dakikalarda ışımının kontrole yakın iken 80 ve 100. dakikalarda yeniden ışımada artış gözlenmektedir. 100 ve 120. dakikalarda floresan ışımaya tekrar azalmaya başlamadığı görülmektedir.

$18 \mu M$ TN uygulamasında floresan yoğunluk 20. dakikaya kadar artış gösterip 40. dakikada azalırken 80. dakikadan itibaren 120. dakikaya kadar yeniden floresan yoğunluğunun arttığı görülmektedir.

24 μM TN uygulaması sonrasında ise Rhod-2 AM floresan yoğunluğu 120. dakikaya kadar stabil bir şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir.

FİBRONEKTİN KAPLI PLAKALARDA 1mM CaCl ₂ İÇEREN HEPES BUFFERDA 5 μM RHOD-2 AM İLE BOYANMIŞ SKOV-3 HÜCRELERİ				
	KONTROL	TN 12 μM	TN 18 μM	TN 24 μM
0 DAKİKA				
5 DAKİKA				
10 DAKİKA				
20 DAKİKA				
30 DAKİKA				
40 DAKİKA				



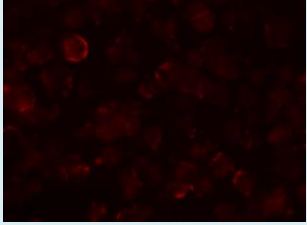
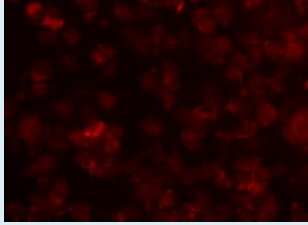
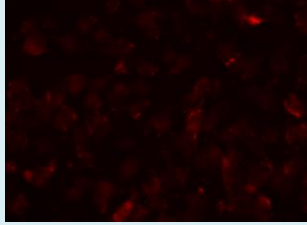
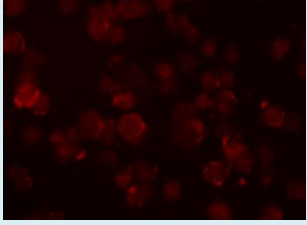
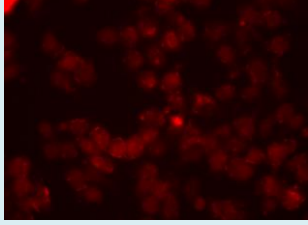
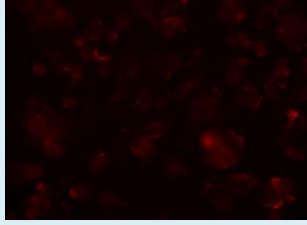
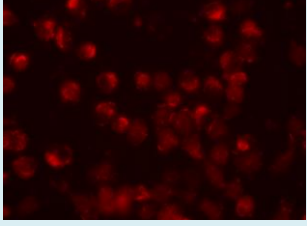
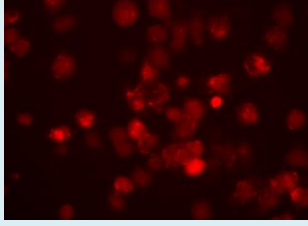
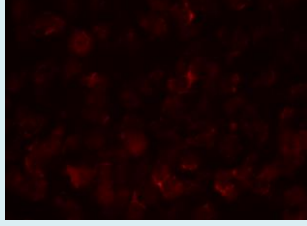
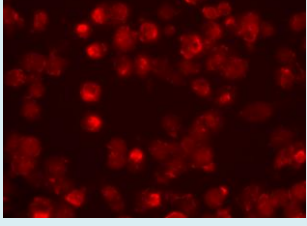
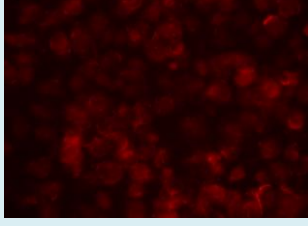
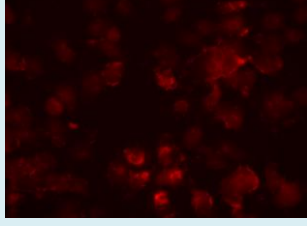
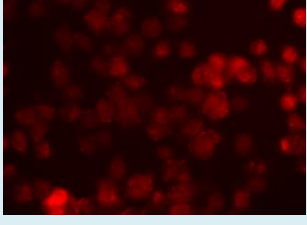
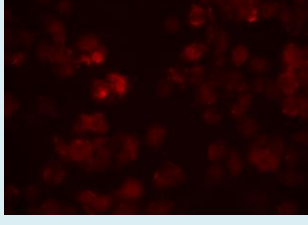
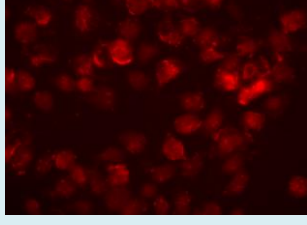
Şekil 4.6. Fibronektin kaplı kuyucuklarda Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonun floresan mikroskopda $40 \times$ büyütmede görüntüleri

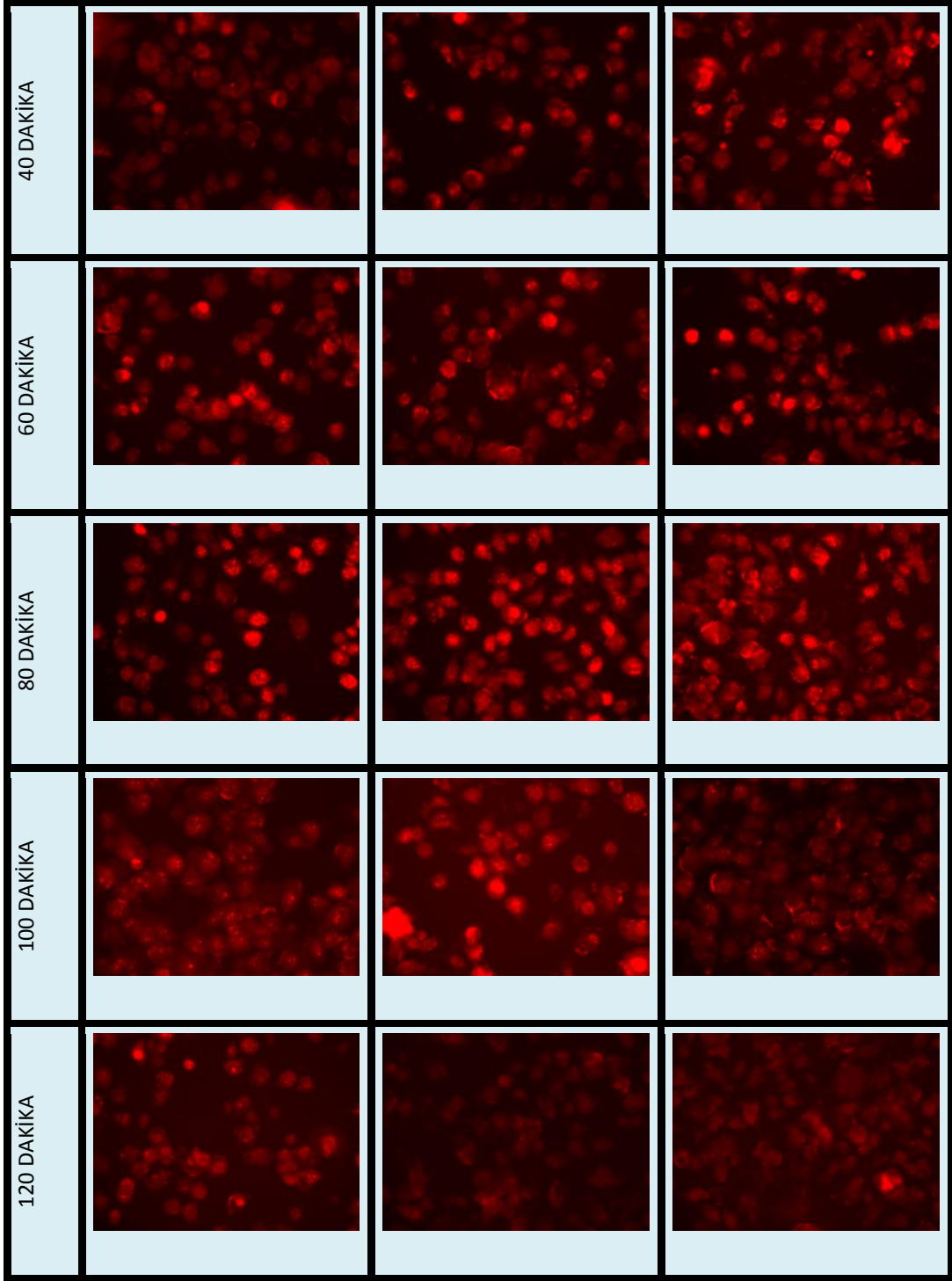
Fibronektin kaplı plakalarda SKOV-3 hücrelerinde mitokondriyal Ca^{+2} Rhod-2 AM ile işaretlenmesi sonrasında 12-18-24 μ M TN uygulaması sonucunda 12 μ M TN uygulandığında floresan ışımının yavaş yavaş fakat uzun süre boyunca artış gösterdiği görülmektedir. 120. dakikada floresan ışımına TN uygulanmayan hücelere oranlara belirgin şekilde fazla olduğu görülmektedir.

18 μ M TN uygulamasında ise TN uygulandığı andan itibaren hızlı bir şekilde floresan ışımının arttığı görülmektedir. Bu artış 80. dakikadan sonra azalarak kontrol ile yakın değerlerde olduğu gözlemlenmektedir.

24 μM TN uygulamasında madde eklendiği andan itibaren hızlı bir şekilde floresan yoğunluğuda artış görülürken 120. dakikada hala kontrole göre ve diğer TN dozlarına göre floresan yoğunluğunun daha fazla olduğu görölmektedir.

KAPLAMASIZ PLAKALARDA KALSIYUMSUZ HEPES BUFFERDA 5 μ M RHOD-2 AM İLE
BOYANMIŞ SKOV-3 HÜCRELERİ

	TN 12 μ M	TN 18 μ M	TN 24 μ M
0 DAKİKA			
5 DAKİKA			
10 DAKİKA			
20 DAKİKA			
30 DAKİKA			



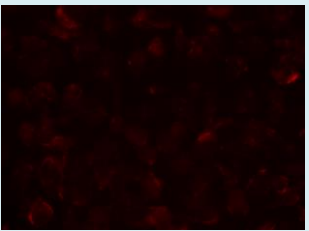
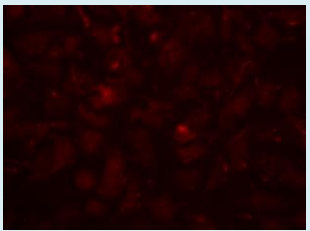
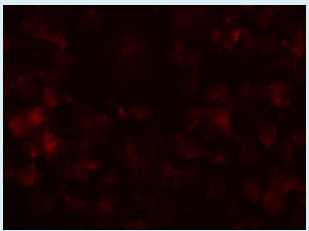
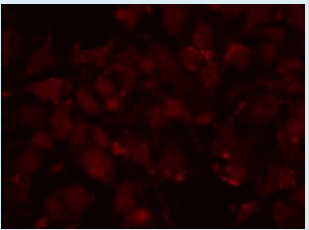
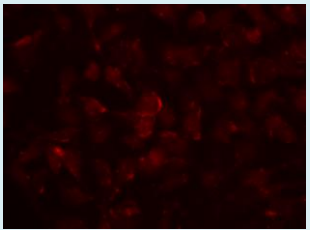
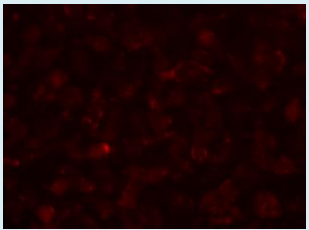
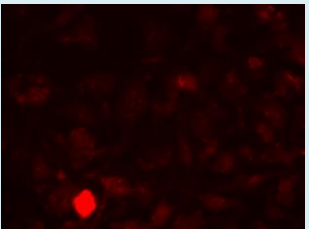
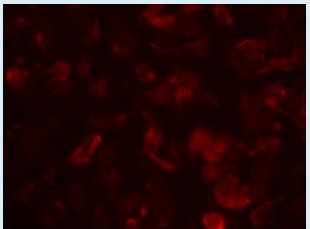
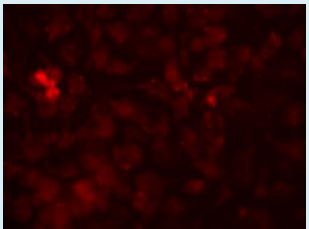
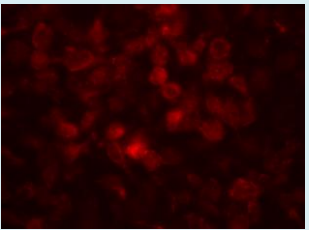
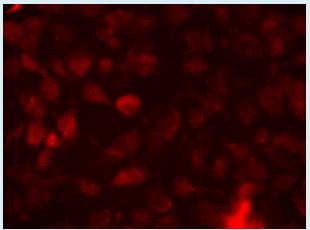
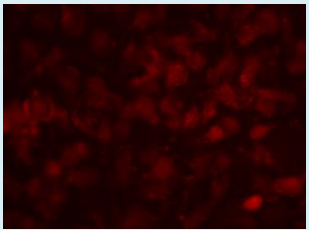
Şekil 4.7. Kaplamasız kuyucuklarda Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin kalsiyumsuz HEPES buffer içerisinde TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunun floresan mikroskop görüntüleri

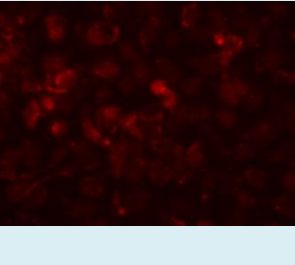
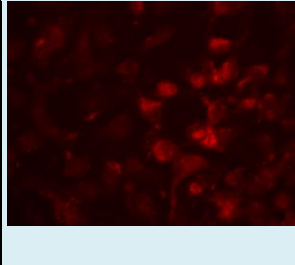
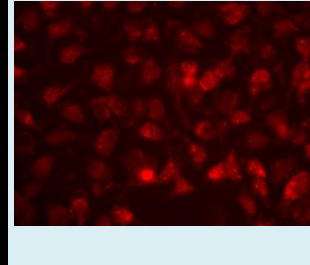
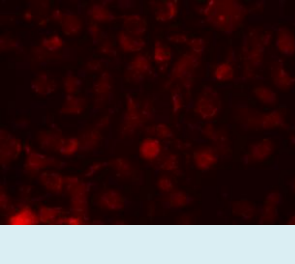
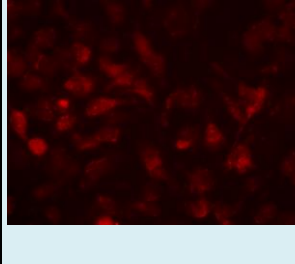
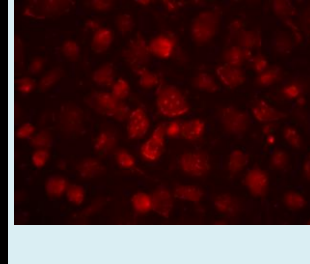
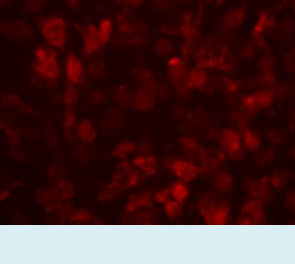
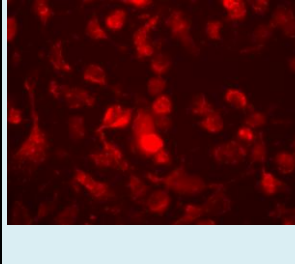
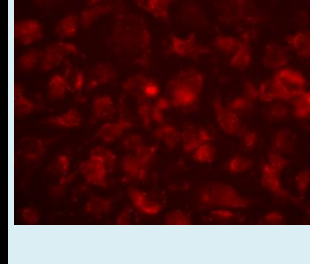
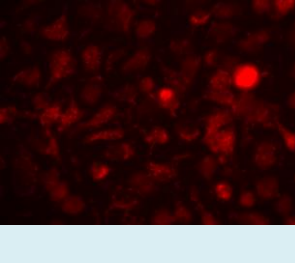
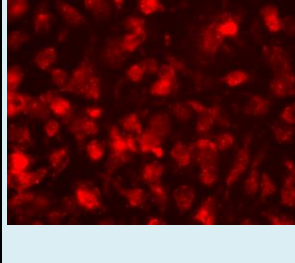
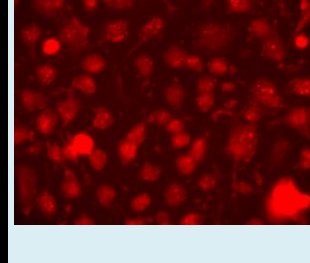
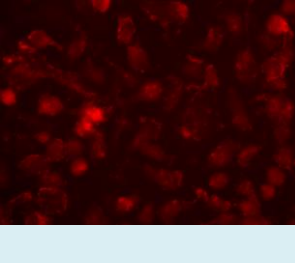
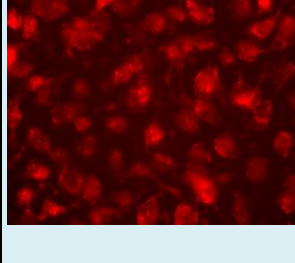
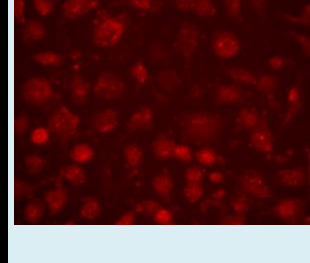
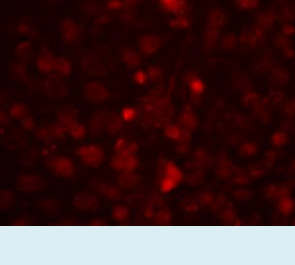
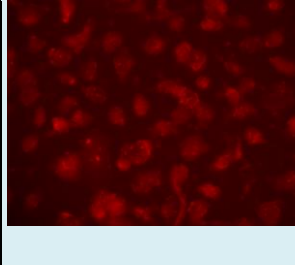
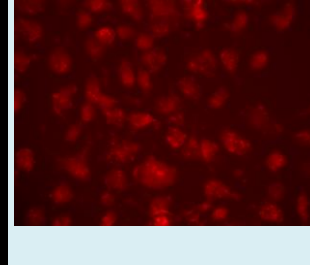
Tunikamisin ekstrasellüler matriksten hücre içine NCX ve TRP aracılığı ile kalsiyum girişini sağlarken aynı zamanda ER'de depo halde bulunan

kalsiyumun RyR, SERCA ve IP₃R aracılığı ile sitoplazmaya salınmasını sağlamaktadır (Ziomek ve ark., 2014). 1 mM kalsiyum içeren HEPES buffer içerisinde TN konsantrasyonları uygulandığında floresan ışımının arttığı ve dolaylı olarak kalsiyuma artışı gösterdiği belirlenmiştir. Kaplama yapılmadan Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücreleri kalsiyum içermeyen HEPES buffer içerisinde TN konsantrasyonları uygulandığında 12 µM TN uygulamasında 10. dakikadan itibaren floresan ışımaya yoğunluğunun arttığı görülmektedir. 100. dakikada floresan yoğunluğun belirgin şekilde mitokondride biriktiği gözlemlenmemiştir.

18 µM TN uygulamasının ardından 120. dakikaya kadar floresan ışımının artışı devam ederken 120. dakikada ışımının azaldığı görülmektedir. 80 ve 100. dakikalarda floresan ışımının mitokondrilerde yoğunlaştığı görülmektedir.

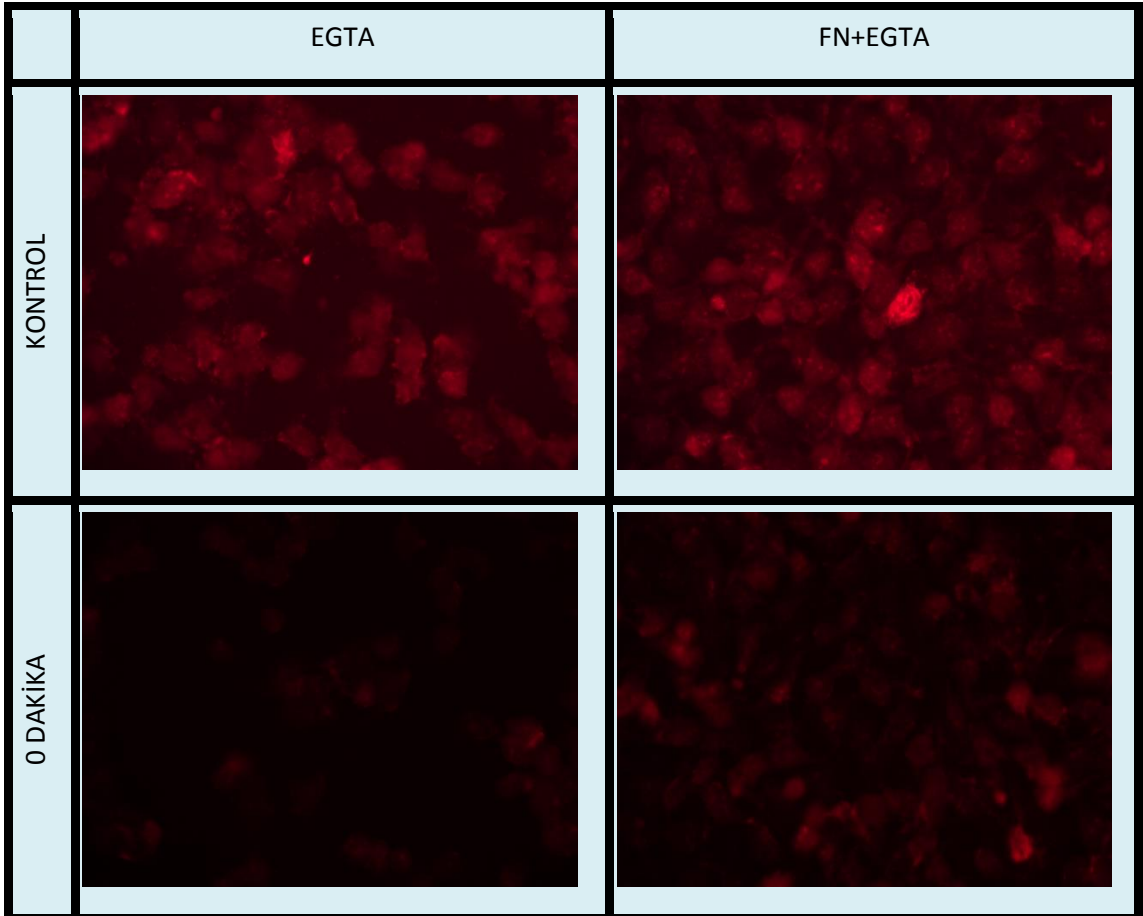
TN uygulamasının 24 µM konsantrasyonunda floresan ışımaya yoğunluğunun 20. dakikadan itibaren artış gösterdiği görülürken 100. dakikada mitokondrilerde floresan ışımalar ayırt edici şekilde görülmektedir.

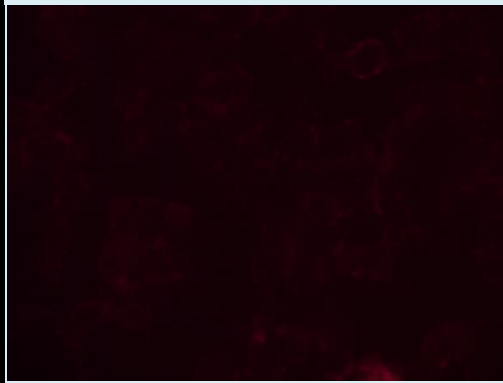
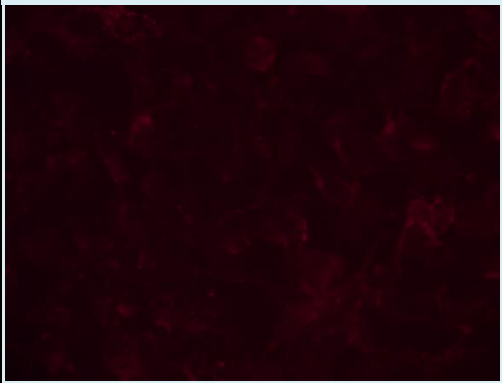
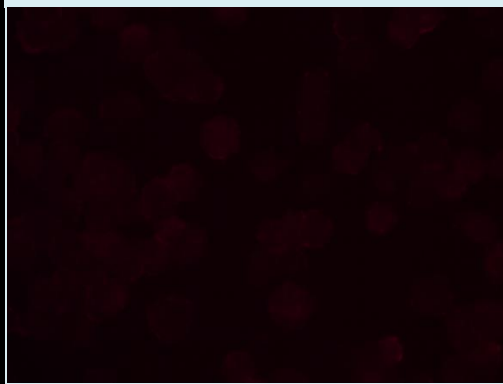
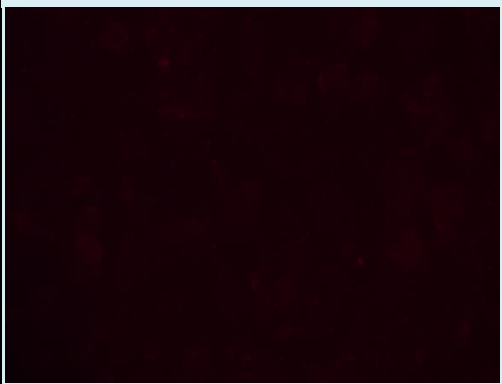

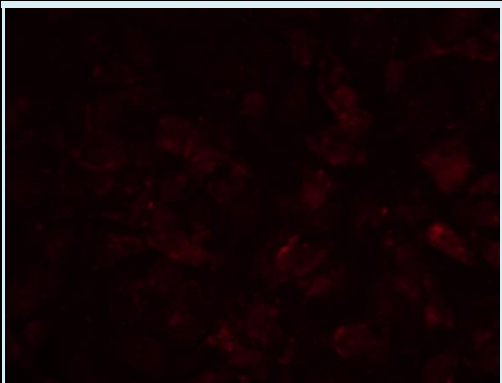

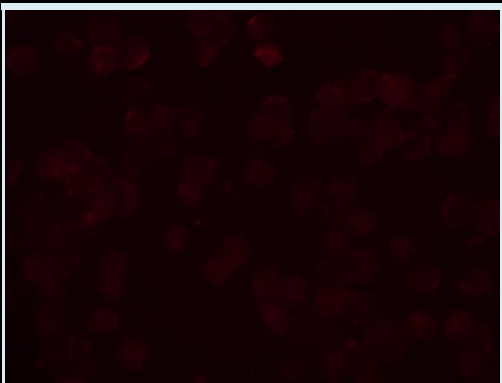
FİBRONEKTİN KAPLI PLAKALARDA KALSİYUMSUZ HEPES BUFFERDA 5 μ M RHOD-2 AM İLE BOYANMIŞ SKOV-3 HÜCRELERİ			
	TUNİKAMİSİN 12 μ M	TUNİKAMİSİN 18 μ M	TUNİKAMİSİN 24 μ M
0 DAKİKA			
5 DAKİKA			
10 DAKİKA			
20 DAKİKA			

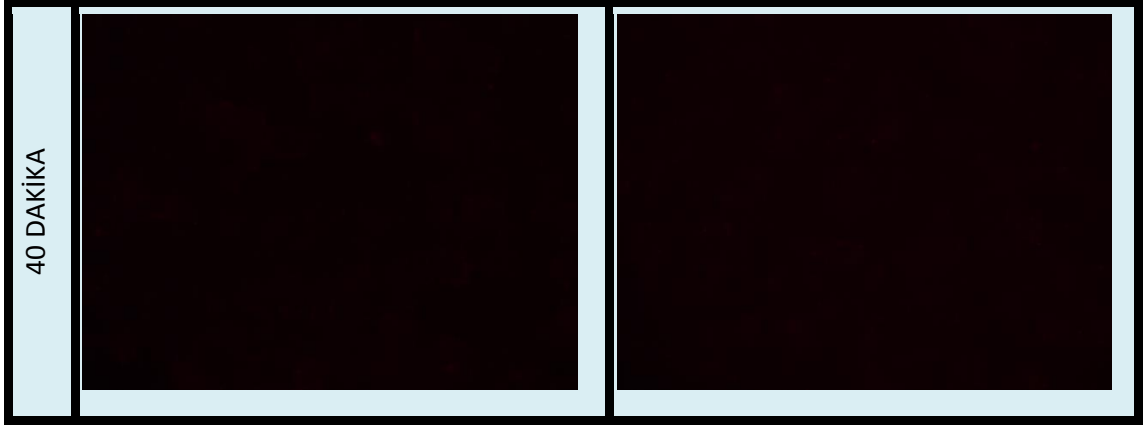
30 DAKIKA			
40 DAKIKA			
60 DAKIKA			
80 DAKIKA			
100 DAKIKA			
120 DAKIKA			

Şekil 4.8. Fibronektin kaplı kuyucuklarda Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinin kalsiyum içermeyen HEPES buffer içerisinde TN konsantrasyonları ile uyarılmasının ardından artan mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunun floresan mikroskopta $40 \times$ büyütmede görüntüleri

Fibronektin kaplı kuyucuklarda Rhod-2 ile işaretlenmiş SKOV-3 hücrelerine kalsiyumsuz ortamda TN dozları uygulandığında $12 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda 20. dakikadan itibaren floresan yoğunluğunda artış görülmektedir. $18 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda 10. dakikadan itibaren ışımının arttığı görülürken, $12 \mu\text{M}$ TN uygulamasına oranla ışımının daha fazla olduğu belirlenmiştir. $24 \mu\text{M}$ TN uygulamasında ise $18 \mu\text{M}$ TN uygulamasına benzer derece ışımaya yoğunluğunun artışı gözlemlenmiştir.



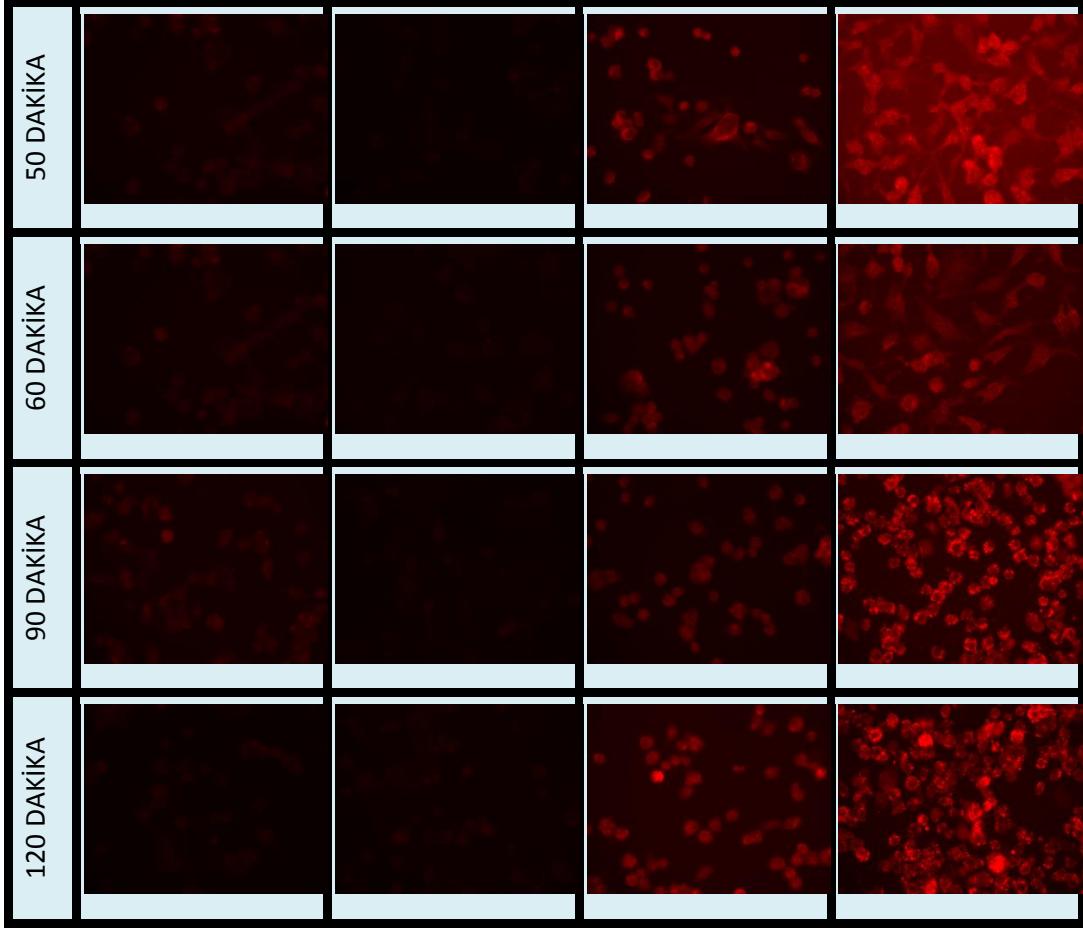
5 DAKIKA		
10 DAKIKA		
20 DAKIKA		
30 DAKIKA		



Şekil 4.9. Fibronektin kaplanmış ya da kaplanmamış plakalarda SKOV-3 hücreleri Rhod- 2 AM ile işaretlenmesi sonrasında 5 mM EGTA uygulaması sonucunda floresan mikroskop görüntüleri

Bir kalsiyum şelatörü olan EGTA serbest halde bulunan kalsiyuma bağlanmaktadır. Rhod-2 AM ile boyanan hücreler EGTA uygulandığında ortamdaki ve hücre içerisindeki Ca^{+2} konsantrasyonunun zamanla azaldığı ve böylece floresan yoğunluğun yaklaşık 40 dakika içerisinde azaldığı görülmüştür.

5μM RHOD-2-AM (1mM KALSİYUM)				
	KONTROL	RU360 10μM	RU360 10μM +TN 24μM	Tn 24μM
0 DAKİKA				
5 DAKİKA				
10 DAKİKA				
20 DAKİKA				
30 DAKİKA				
40 DAKİKA				

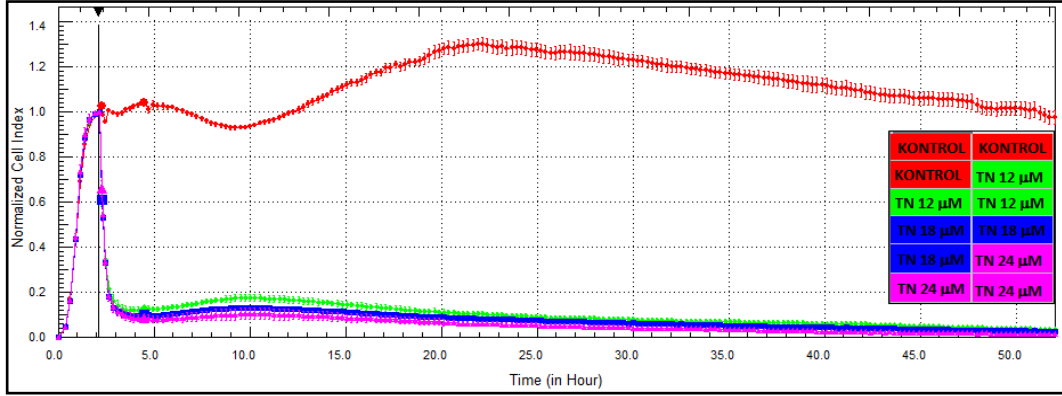


Şekil 4.10. SKOV-3 hücrelerinin Ru360 ile ön muamele edilerek ya da edilmeden Rhod- 2 AM ile işaretlenmesi sonrasında TN uygulamasının floresan mikroskop görüntüleri

Sitozolda artan Ca^{+2} konsantrasyonu mitokondriye voltaj bağımlı anyon kanalları aracılığıyla geçerek mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonunda artışa sebep olmaktadır (Hajnoczky ve ark., 2006). Bu kanallar Ru360 ile inhibe edilerek mitokondriyal Ca^{+2} artışı baskılanmıştır. Ru360 ile ön muamele sonrasında Rhod-2 AM ile işaretlenen SKOV-3 hücrelerinde floresan ışımının olmadığı böylece mitokondriyal artış görülmüştür. Ru360 ile mitokondriyal kalsiyum kanallarının inhibisyonu sonrasında TN konsantrasyonları uygulandığında Ru360 uygulanmayan hücelere göre belirgin şekilde floresan yoğunluğunun azaldığı görülmektedir.

4.3. Tunikamisinin Hücre Adezyonu Üzerine Etkisi

SKOV-3 hücrelerinin fibronektin ile kaplanmış E-plakalara eklendikten sonra iki saat hücrelerin tutunması için gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde inkübasyonun ardından TN konsantrasyonları uygulanmıştır. Hücre bağlanmasını gösteren analizler RTCA software programında TN eklenen süreye normalize edilerek normalize hücre indeksi belirlenmiştir.



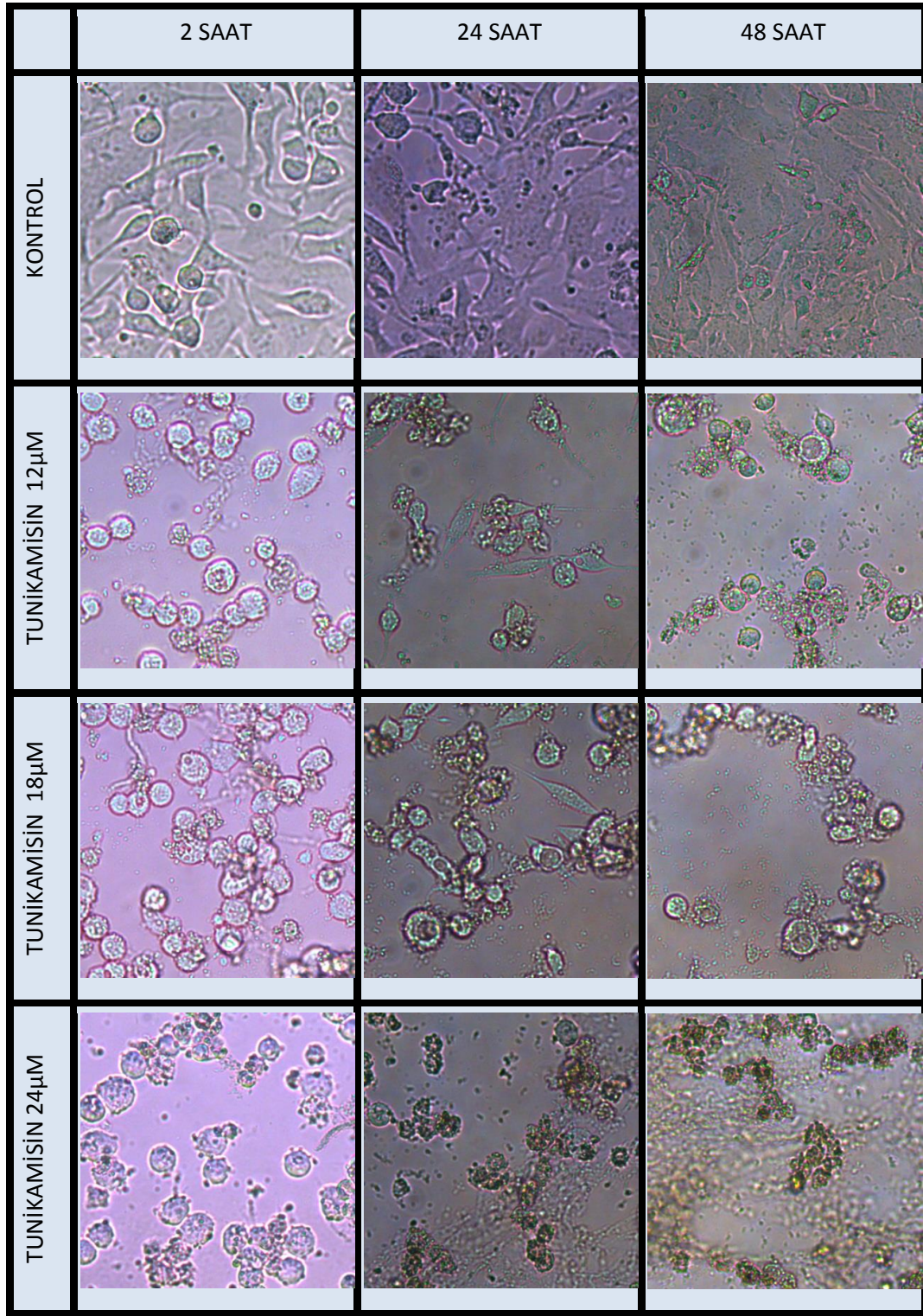
Şekil 4.11. SKOV-3 hücreleri fibronektin kaplı E-platelerde tunikamisin (TN) uygulamasının hücre bağlanmasına etkisi

Fibronektin kaplanan E-plakalarda SKOV-3 hücreleri TN ile 2 saat inkübasyonun sonucunda kontrol grubunun ortalama normalize hücre indeksi (NCI) değeri 1,03 iken 12 µM TN uygulanması sonucunda 0,12; 18 µM TN uygulanması sonucunda 0,10; 24 µM TN uygulanması sonucunda ise NCI 0,09'e düştüğü belirlenmiştir.

24 saat inkübasyonun sonucunda kontrol grubunun ortalama NCI 1,26 iken 12 µM TN uygulanması sonucunda 0,09; 18 µM TN uygulanması sonucunda 0,07; 24 µM TN uygulaması sonucunda ise NCI 0,05'e düştüğü görülmektedir.

48 saat inkübasyonun sonucunda kontrol grubunun ortalama NCI 1,01 iken 12 µM TN uygulanması sonucunda 0,04; 18 µM TN uygulanması sonucunda 0,03; 24 µM TN uygulanması sonucunda ise NCI 0,02'e düşmektedir.

SKOV-3 hücreleri E-plakalarda TN uygulaması sonrasında 2-24-48 saat sonrasında ışık mikroskobu ile hücre morfolojileri görüntülenmiştir.



Şekil 4.12. Fibronektin ile kaplanmış ya da kaplanmamış e-plakalarda SKOV-3 hücrelerinin TN uygulaması ile 2 saat inkübasyon sonucunda ışık mikroskobu görüntüleri

Bağlanma deneylerinden elde edilen sonuçlar, ER stresi oluşturulan SKOV-3 hücrelerinin iki saat içerisinde fibronektine olan bağlanma yeteneklerini yitirdiğini göstermiştir (Şekil 4.11). Benzer bir çalışma; tümör suppressor 3 (TUSC3) geninin yokluğunda ve daha düşük TN konsantrasyonunda fibronektine bağlı hem sferoid hem de monolayer SKOV-3 hücrelerinden hazırlanan hücre süspansiyonunun bağlanma yeteneklerinin zamana bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Bu çalışmada de bizim çalışmamıza benzer şekilde hücre bağlanmasının altı saat sonrasında inhibe olduğu bildirilmiştir (Karatochvilova ve ark., 2015).

4.4. Tunikamisin Uygulaması Sonrasında mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu yöntem için dört çalışma grubu oluşturulmuştur.

1. Kontrol grubu: Skov-3 hücrelerinin kaplamasız besi kaplarında çoğaltılması

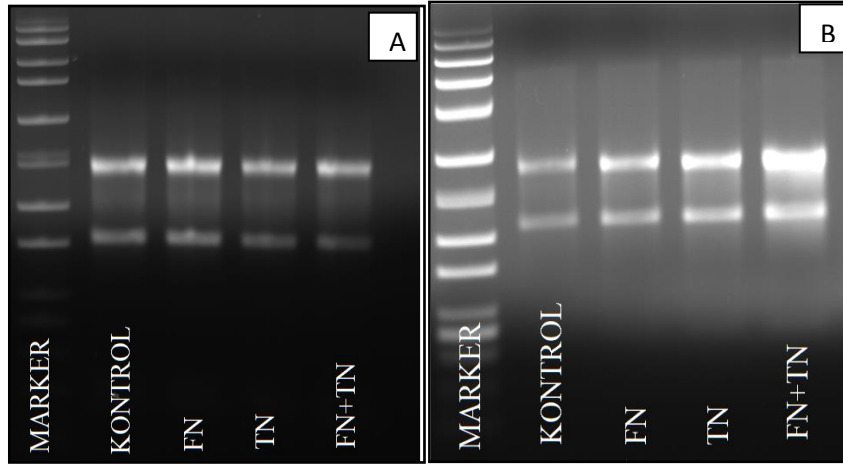
2. FN grubu: Skov-3 hücrelerinin 50 µg/ml fibronektin ile kaplı besi kaplarında çoğaltılması

3. TN grubu: Skov-3 hücrelerinin kaplamasız besi kaplarında ve 24 µM TN varlığında çoğaltılması

4. FN + TN grubu: Skov-3 hücrelerinin 50 µg/ml fibronektin ile kaplı besi kaplarında ve 24 µM TN varlığında çoğaltılması.

SKOV-3 hücrelerinin 30 dakika ve 60 dakika inkübasyonu sonrasında elde edilen total RNA yatay elektroforez yöntemi ile agaroz jelde görüntülenmiştir. Jel görüntülerinde total RNA bantlarında 28S bant kalınlığı 18S bant kalınlığının yaklaşık olarak iki katı kalınlığında olması RNA'nın intakt bir yapıda olduğunu göstermektedir. 28S bandının 18S bantlarından daha az belirgin olması, eşit olması ya da smear şeklinde görüldüğü durumunda RNA'nın degrade olduğu anlamına gelmektedir.

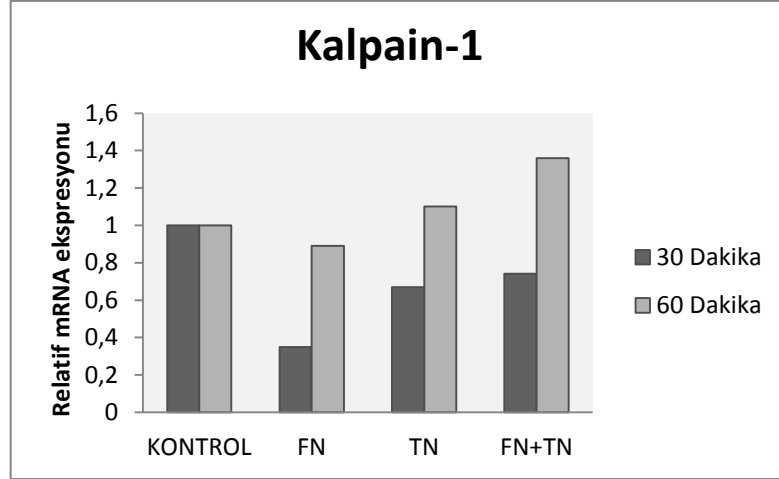
Şekil 4.13.'de görüldüğü gibi, uygulama gruplarının tamamında 28S bandı 18S bandına göre yaklaşık iki katı olarak görülmektedir.



Şekil 4.13.Total RNA agaroz jel görüntüleri A) SKOV-3 hücrelerinin 30 dakika inkübasyon sonrasında total RNA izolasyonu sonuçlarının agaroz jel görüntüleri. B) SKOV-3 hücrelerinin 60 dakika inkübasyon sonrasında total RNA izolasyonu sonuçlarının agaroz jel görüntüleri. (sırasıyla kontrol, FN: 50µg/ml fibronektin, TN: 24µM tunikamisin FN+TN: 50µg/ml fibronektin + 24µM tunikamisin)

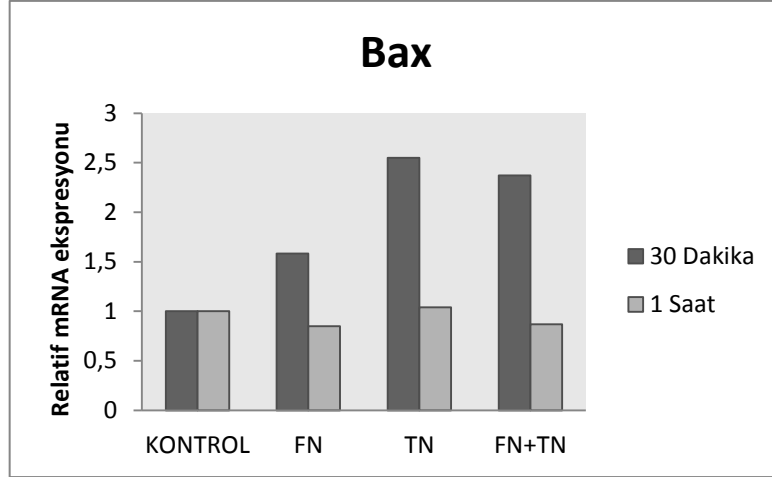
Her gruptan izole edilen RNA örneklerinden cDNA oluşturularak, yöntemler 3.4.5 kısmında belirtildiği üzere RT-PCR ürünleri sentezlenmiştir.

Çalışma sonunda mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ekspresyon düzeyi her hedef gen için bir kabul edilip diğer gruplar kontrol grubuna göre oranlanarak kat artışı olarak sayısal değerler verilmiştir.



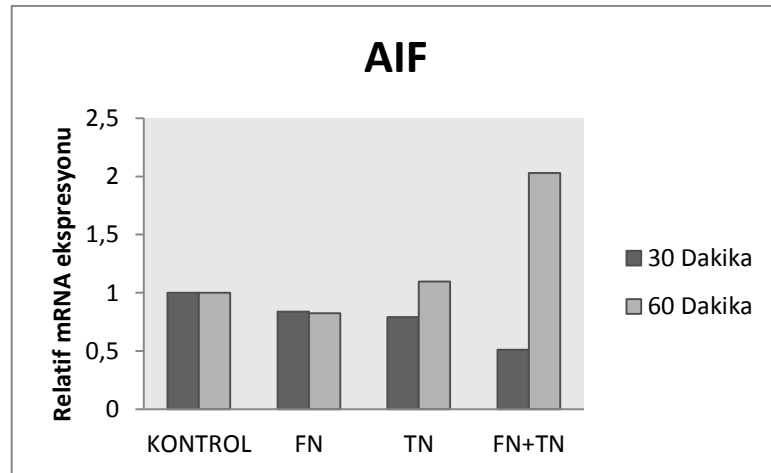
Şekil 4.14. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kalpain-1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Kalpain-1 geni mRNA ekspresyon düzeyi 30 dakika 24 μ M TN uygulaması sonrasında kontrol grubuna mRNA ekspresyon düzeyi 1,0 iken FN grubunda 0,349; TN grubunda 0,669 ve FN+TN grubunda 0,741 olduğu görülmektedir. 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kalpain-1 geni mRNA ekspresyonu kontrol birimde 1,0 iken FN grubunda 0,89; TN grubunda 1,101 ve FN+TN grubunda 1,359 oranında arttığı belirlenmiştir. Kalpain-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi 60 dakika TN uygulaması sonrasında FN+TN grubunda kontrol grubunun 1,359 katı kadar arttığı belirlenmiştir.



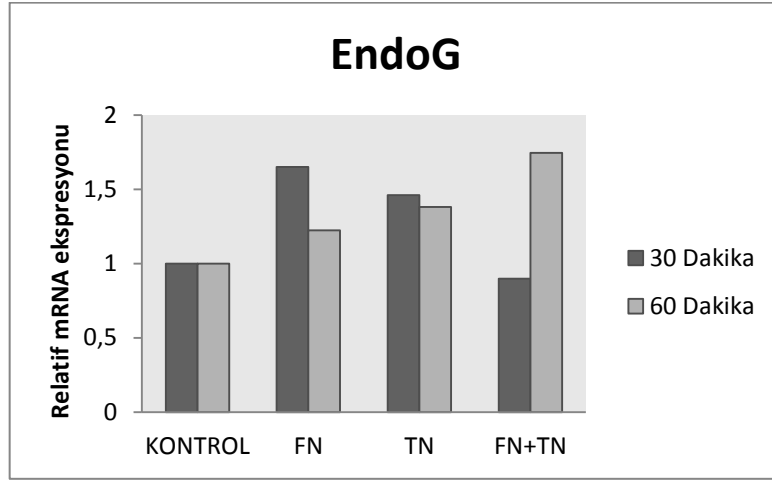
Şekil 4.15. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Bax geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Mitokondriyal apoptotik yolağın en önemli pro-apoptotik proteinlerinden biri olan Bax geninin mRNA ekspresyon düzeyi TN uygulamasından 30 dakika sonrasında FN grubunda 1,583; TN grubunda 2,55 ve FN+TN grubunda 2,371 katı kadar artış göstermektedir. TN uygulamasının ardından 60 dakika sonrasında ise bu artık yaklaşık olarak normal değerlerine döndüğü görülmektedir (Şekil 4.15).



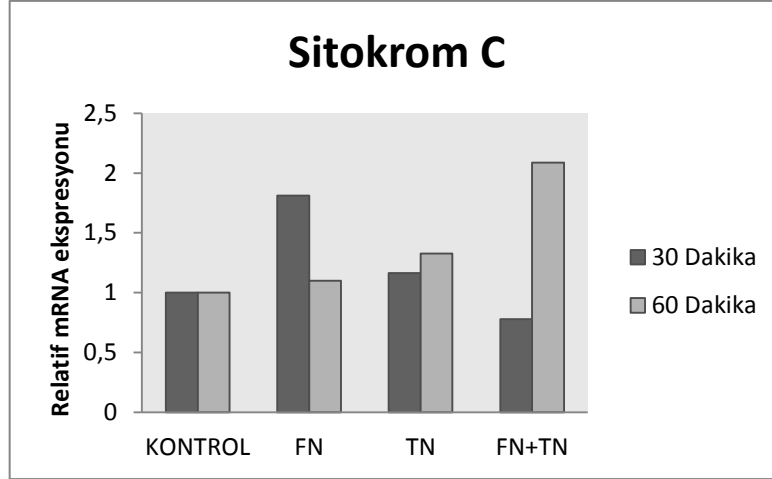
Şekil 4.16. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında AIF geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Kaspaz-bağımsız apoptotik yollaklarda görev alan AIF mRNA ekspresyon düzeyi TN uygulamasından 30 dakika sonrasında tüm çalışma gruplarında kontrole göre FN grubunda 0,838; TN grubunda 0,792 ve FN+TN grubunda 0,512 katı kadar azalış göstermektedir. Fakat TN uygulamasının 60 dakika sonrasında FN grubunda kontrole göre 0,826 katı azalış gösterirken, TN grubunda 1,098 katı ile yaklaşık olarak kontrol ile aynı seviyede dengelenmiştir. FN+TN grubunda ise AIF gen ekspresyona kontrol grubunun 2,03 katı kadar artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.16).



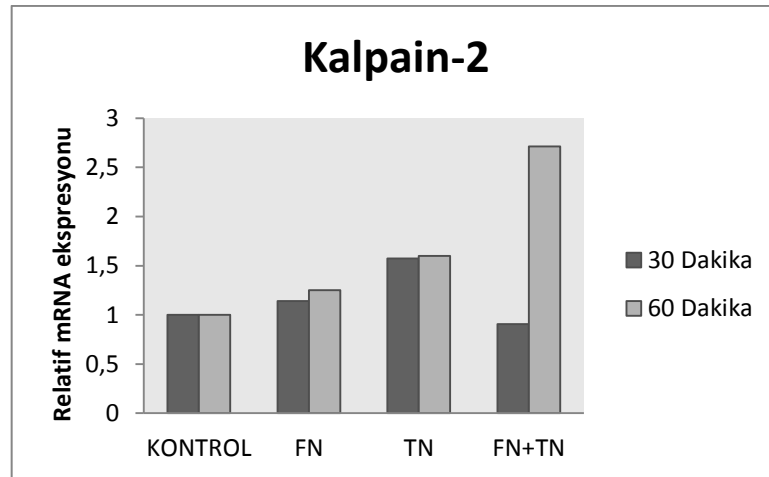
Şekil 4.17. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında AIF geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Apoptotik hücrelerde genomik DNA'nın degradasyonuna sebep olan EndoG proteininin mRNA ekspresyon seviyesi TN uygulandıktan ilk 30 dakika sonrasında FN grubunda 1,65 katı ve TN grubunda 1,46 katı kadar artış gösterirken, FN+TN grubunda 0,897 katı kadar azaldığı görülmüştür (Şekil 4.17). TN ile 60 dakika inkübasyonun sonrasında ise kontrol grubuna göre EndoG mRNA ekspresyon düzeyi FN grubunda 1,224; TN grubunda 1,381, FN+TN grubunda ise 1,745 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir.



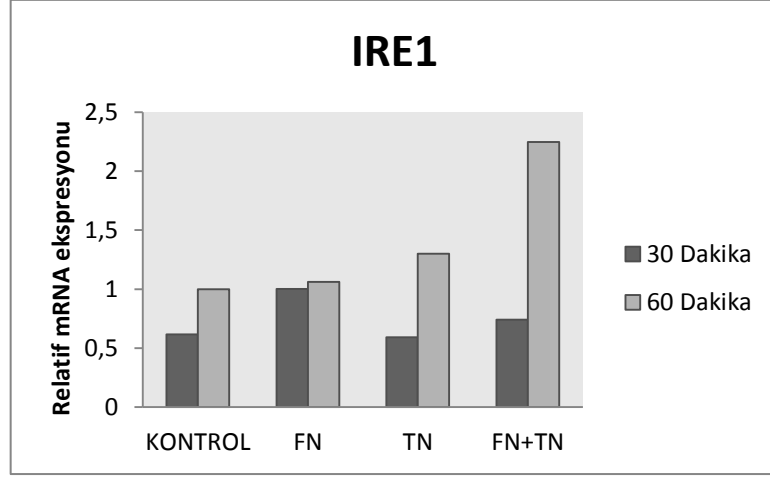
Şekil 4.18. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında sitokrom c geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Mitokondri membranının depolarizasyonu sonucunda sitoplazmaya salınan Sitokrom c mRNA ekspresyon düzeyleri TN ile 30 dakika inkübasyon sonrasında kontrol grubuna göre FN grubunda 1,811; TN grubunda 1,165 katı kadar artarken FN+TN grubunda 0,779 katına düştüğü görülmektedir. TN ile 60 dakika inkübasyonun ardından ise kontrol grubuna göre FN grubunda 1,101; TN grubunda 1,328; FN+TN grubunda ise 2,088 katı kadar artış göstermektedir (Şekil 4.18).



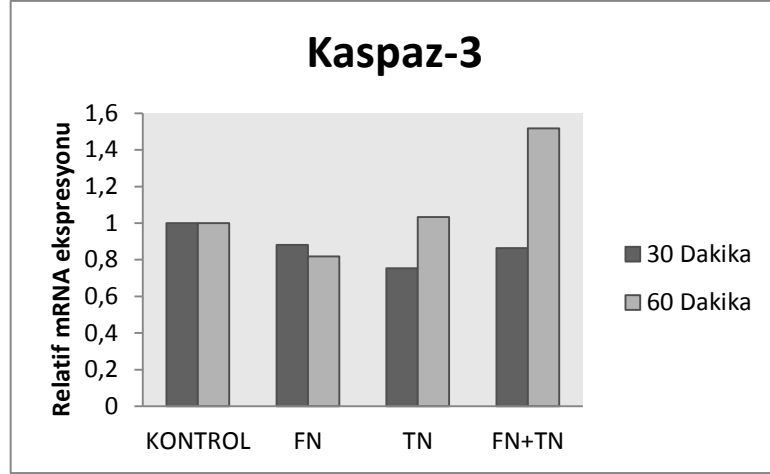
Şekil 4.19. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kalpain-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Kalpain 2 geninin mRNA ekspresyon seviyesi TN uygulamasının ardından 30 dakika sonrasında FN grubunda kontrol grubunun 1,14 katı; TN grubunda 1,575 katı kadar artış gösterirken FN+TN grubunda 0,906 katı olduğu belirlenmiştir. TN ile 60 dakika inkübasyon sonrasında ise kontrol grubu FN grubunda 1,252; TN grubunda 1,601 ve FN+TN grubunda 2,711 katı kadar artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.19).



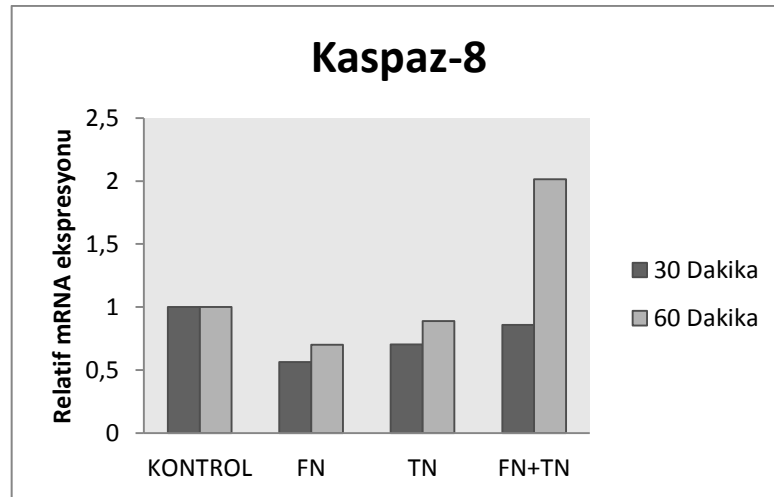
Şekil 4.20. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında IRE1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

ER’de yanlış katlanan proteinlerin birikmesi sonucunda uyarılan IRE1 proteinin mRNA ekspresyon seviyesi TN uygulamasının 30 dakika sonrasında FN grubunda kontrol grubunun 0,616 katı kadar azalırken, TN uygulaması sonrasında kontrol grubu ile aynı seviyededir (Şekil 4.20). FN+TN grubunda ise 0,593 oranında azaldığı görülmektedir. TN ile 60 dakika inkübasyon sonrasında FN grubunda kontrol grubu ile aynı düzeyde iken TN grubunda 1,3; FN+TN grubunda ise 2,246 oranında artış göstermektedir.



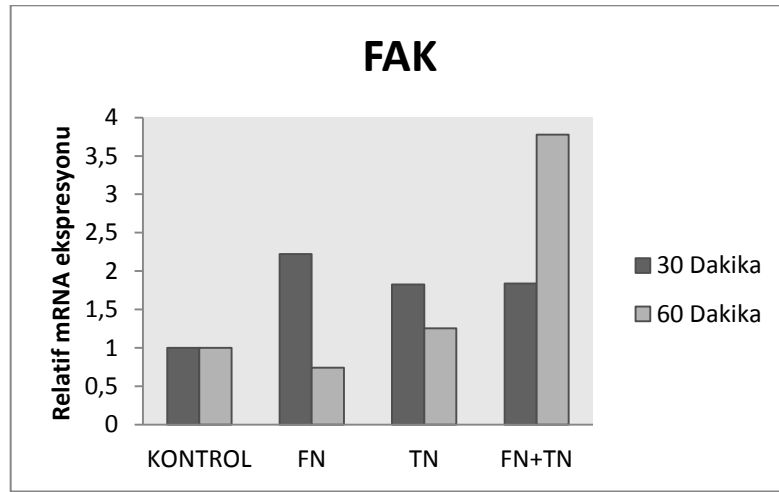
Şekil 4.21. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kaspaz-3 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Kaspaz 3 geni mRNA seviyesi 30 dakika TN inkübasyonu sonrasında kontrole göre FN grubunda 0,881; TN grubunda 0,754 ve FN+TN grubunda 0,864 oranında azaldığı belirlenmiştir. 60 dakika TN inkübasyonu sonrasında kontrol grubuna oranla FN grubunda 0,818 katı azalırken, TN grubunda yaklaşık kontrol grubu ile aynı seviyede FN+TN grubunda ise 1,517 katı kadar artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.21).



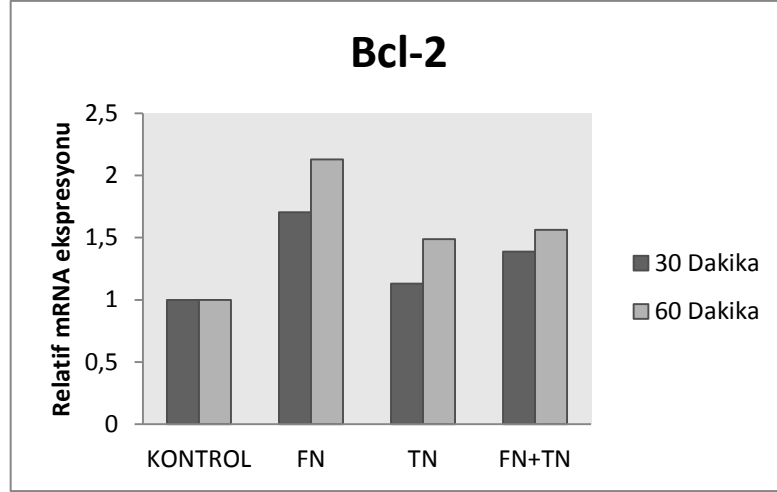
Şekil 4.22. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Kaspaz-8 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Ekstrinsik yolda erken apoptotik süreçte aktifleşen Kaspaz 8'in mRNA düzeyi 30 dakika TN uygulaması sonrasında kontrol grubuna göre FN grubunda 0,563; TN grubunda 0,704 ve FN+TN grubunda 0,858 oranında azaldığı görülmektedir (Şekil 4.22). TN uygulamasından 60 dakika sonrasında FN grubunda kontrol grubuna göre 0,702; TN grubunda 0,89 oranında azalma görülürken, FN+TN grubunda kaspaz 8 mRNA seviyesi 2,015 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir.



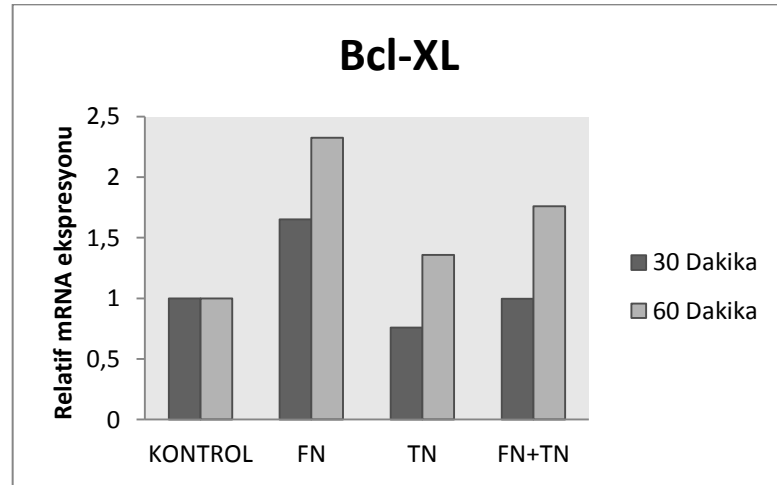
Şekil 4.23. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında FAK gنینin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

FAK mRNA ekspresyonu 30 dakika TN uygulaması sonrasında kontrol grubuna göre FN grubunda 2,224; TN grubunda 1,827 ve FN+TN grubunda 1,84 katı artış görülmektedir. TN ile 60 dakika inkübasyon sonrasında FN grubunda 0,742 oranında azalma görülürken, TN grubunda 1,253 ve FN+TN grubunda 3,777 katı kadar artış görülmektedir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Bcl-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Anti-apoptotik genlerden olan Bcl-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyi TN ile 30 dakika inkübasyon sonrasında kontrol grubuna göre FN grubunda 1,703; TN grubunda 1,131 ve FN+TN grubunda ise 1,388 oranında arttığı görülmektedir. 60 dakika TN uygulaması sonrasında ise kontrol grubuna göre FN grubunda 2,129; TN grubunda 1,489 ve FN+TN grubunda ise 1,563 katı kadar arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. Çalışma gruplarının 30 dakika ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında Bcl-XL geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi

Bcl-XL geninin mRNA ekspresyon seviyesi TN uygulamasından 30 dakika sonrasında kontrol grubuna göre FN grubunda 1,651 katı artış gösterirken; TN grubunda 0,76 ve FN+TN grubunda ise 0,997 oranında azalma görülmektedir. TN uygulaması 60 dakika sonrasında ise kontrol grubuna göre FN grubunda 2,325; TN grubunda 1,359 ve FN+TN grubunda ise 1,76 katı kadar arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.25).

Özet olarak; integrin aktivasyonu sonrasında TN inkübasyonu ile ER stresi oluşturulmuş SKOV-3 hücrelerinin apoptotik potansiyeli pro-apoptotik (Bax, sitokrom c, Endo G, AIF) ve anti-apoptotik (Bcl-2 ve Bcl-XL) proteinlerin yanı sıra kaspaz enzimlerinin (Kaspaz 3 ve kaspaz 8) mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ile ölçülmüştür. Bununla birlikte, ER stres göstergesi olan IRE-1 mRNA ekspresyon düzeyi de belirlenmiştir. Hücre içi kalsiyum artışına bağlı olarak ER stresi sonrasında aktive olan ve apoptoz başlatıcı enzim olarak bilinen kalpain 2 ve mitokondriyel apoptotik yolağa bağlanan kalpain 1 mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Son olarak; integrin aktivasyonuna bağlı olarak sitoplazmik iskelet proteinlerinin kümelenmesinde görev alan FAK'ın mRNA ekspresyon düzeyi gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar; 30 dakika TN uygulaması sonrasında Bax'ın mRNA ekspresyon düzeyi en yüksek bulunmuştur (Şekil 4.15). İntegrin aktivasyonu ve TN muamelesi sonrasında da, Bax mRNA ekspresyon seviyesi sadece TN muamelesi sonrasındaki Bax mRNA ekspresyon seviyesine eşit düzeyde olduğu görülmüştür. Kaspaz 3 mRNA aktivasyon seviyesinin ise, TN ve integrin aktivasyonu gerçekleştirilen SKOV-3 hücrelerinde 60 dakika sonunda en yüksek düzeyde olduğu görülmüştür (Şekil 4.21). TN ve integrin aktivasyonu gerçekleştirilen SKOV-3 hücrelerindeki Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyi, integrin aktivasyonu yapılmış SKOV-3 hücrelerine kıyasla azalmıştır (Şekil 4.24). Yapılan literatür taramasında SKOV-3 ovaryum hücrelerinde TN ile ER stresinin oluşturulması sonrasında Bax, kaspaz 3'ün ve Bcl-2 ekspresyon düzeyini belirleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, TN 'nin özelliklerine sahip olan intarsellüler kalsiyum artırıcı TUBEIMOSIDE-1 maddesi ile yapılan bir çalışmada, Bax mRNA ekspresyonu SKOV-3 hücrelerinde madde dozuna bağımlı olarak artarken, Bcl-2 mRNA seviyesi azalmıştır. Aynı çalışmanın devamında kaspaz-3

protein seviyesi western blot yöntemi ile incelendiğinde yine doza bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. (Chen ve ark., 2012).

Bu çalışma sonucunda IRE1 mRNA ekspresyon düzeyinin, integrinlerin aktif durumunda ve 24 μ M TN uygulamasının sonrasında arttığı gözlenmiştir. SKOV-3 hücreleri ile yapılan bir çalışmada 20 μ g/ml TN uygulaması ile 24 saat inkübasyon sonucunda western blot yöntemi ile IRE1 molekülünün protein düzeyinde artış gösterdiği belirlenmiştir (Watanabe ve ark., 2008).

Murin myoblast hücreleri TN ile düşük konsantrasyonda 24 saat inkübe edildiğinde immunoblot analizleri sonucunda kaspaz 3, kaspaz 9 ve kaspaz 12 proteinlerinde yüksek oranda artış görülmesine rağmen, Bcl-XL protein seviyesinde artış görülmemiştir (Morishima ve ark., 2002). Bizim sistemimizde integrinlerin aktif durumunda ve 60 dakika TN uygulaması sonrasında kaspaz-3 mRNA ekspresyon düzeyinde artış görülmektedir (Şekil 4.21).

Anti apoptotik genler olarak bilinen Bcl-2 ve Bcl-XL'in mRNA düzeyleri de SKOV-3 hücrelerinde tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar diğer kanser hücreleri kullanılarak yapılan Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ile paralellik göstermiştir. İntegrinler aktif durumda iken SKOV-3 hücrelerinde TN uygulaması 60 dakika sonrasında Bcl-2 ve Bcl-XL genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde yaklaşık 1,5 kat artış görülmektedir.

Küçük olmayan akciğer kanseri hücreleri (H1650) ile yapılan düşük konsantrasyondaki TN uygulaması immunoblot yöntemi ile incelendiğinde 24 saat sonrasında Bax proteini artış gösterirken, 48 saatte protein seviyesinde azalma görülmektedir. Aynı çalışmada Bcl-2 ve Bcl-XL 24 saat TN uygulaması sonrasında protein düzeyi düşük oranda artış gösterirken 48 saat sonrasında kontrole göre azalma göstermektedir (Ling ve ark., 2009).

Yapılan başka bir çalışmada, insan tiroid kanser hücrelerinde düşük dozda TN uygulamasının 24 saat ardından immunoblot yöntemi ile Bcl-2 ve Bcl-XL protein düzeylerinde artış görülürken, siklin D1 proteininde azalma görülmüştür (Zhang ve ark., 2009).

ER stresine ve intrasellüler kalsiyum artışına bağlı olarak kalsiyum-bağımlı sistein kinaz enzimleri olan kalpainler aktif hale geçmektedir (Huang ve ark., 2010) Kalpainlerin aktivasyonu sitoplazmada bulunan birçok proteinin substrat olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Bu proteinlerden (enzim) biri kaspaz 8'dir. Kaspaz 8 hem ER üzerinden hem de mitokondriyel yolak üzerinden apoptozun devamı için gerekli bir enzimdir. Yaptığımız çalışma sonrasında ER stresi oluşturulmuş SKOV-3 hücrelerinde integrinlerin aktif olma durumunda kalpain 2 mRNA ekspresyon düzeyi 60 dakika içinde yaklaşık 2,5 kat artış göstermiştir. Buna benzer şekilde, kaspaz 8 mRNA ekspresyon düzeyinde aynı inkübasyon süresinde iki kat artmıştır. Bu da uygulanan düzenekte ER stresine bağlı olarak, integrin aktivasyonu olmasına rağmen apoptotik yolağın kalpain-aracılığıyla tetiklendiğini göstermektedir. Hepatik stellite hücreleri (HSCs) ile yapılan düşük dozda TN ile 24 saat inkübe edilerek yapılan western blot çalışmalarında Bax, kaspaz 3, kalpain ve kaspaz 8 proteininde artış görülmüştür (Minicis ve ark., 2011).

Mikro düzeyde intrasellüler kalsiyum artışı sonrasındaki apoptotik süreçte kalsiyum-bağımlı kalpain ailesinden kalpain 1'in aktif hale geçtiği bilinmektedir (Kar ve ark., 2010). Kalpain 1 aktive olduktan sonra mitokondri intermembran boşluğunda bulunan bir flavoprotein olan AIF'in parçalanarak mitokondriden sitoplazmaya doğru salınır ve kaspaz 9 bağımsız olarak çekirdeğe geçer (Sanges ve Marigo, 2006). Bundan sonra AIF siklofilin A ile kompleks oluşturarak DNA ve nüklear komponentlere bağlanarak kromatinolizizi sağlayarak geç apoptozu başlatır (Sevrioukova, 2011). Sitokrom c ve EndoG proteinleri ise yine mitokondriyel yolak üzerinden ama kaspaz 9 bağımlı bir mekanizma ile geç apoptoza neden olmaktadır. Bu çalışma, ER stresi oluşturulmuş SKOV-3 hücrelerinde integrin aktivasyonu sırasında mRNA düzeyinde Kalpain 1'in 60 dakika sonunda 1,3 kat arttığı bununla birlikte AIF mRNA düzeyinin 2 katı, Endo G'nin 1,7 katı ve Sitokrom c'nin 2 katı arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar; uygulanan sistemin mitokondriyel yolak üzerinden devam ettiğini vurgulamaktadır.

NIH3T3 fibroblast hücreleri ile yapılan bir çalışmada, düşük konsantrasyonda TN ile 48 saat inkübasyon sonrasında kalsiyum artışı kalpain 1 tarafından aktifleşerek mitokondriden salınması sağlanan AIF protein seviyesi western blot yöntemi ile artış gösterdiği belirlenmiştir ve mitokondriden nükleusa translokasyonu konfokal mikroskop ile belirlenmiştir (Sanges ve Marigo, 2006).

4.5. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma ile SKOV-3 hücrelerinin aktif integrin durumunda ve ER stresinin oluşturulması (TN varlığında) sonrasında, intrasellüler ve mitokondriyal kalsiyum artışı ve dağılımı, Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM boyaları ile flüoresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Bununla birlikte, fibronektine-bağlı SKOV-3 hücrelerinin bağlanma kapasiteleri ER stresi sonrasında kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiş ve bağlamanın TN uygulama dozuna ve zamanına bağımlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Oluşturulan ER stres modelinin doğrulanması için katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) üyelerinden olan ER membran ilişkili IRE1 ekspresyon düzeyine bakılmıştır ve iki kat artış tespit edilmiştir. Ancak, diğer UPR göstergesi PERK ve ATF genlerinin ekspresyon düzeylerinin farklı zaman aralıklarında belirlenmesine de gerekmektedir.

Oluşturulan ER stres modelinin, integrin aktivasyon düzeyi artırılmış, SKOV-3 hücrelerinin apoptotik mekanizması üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanarak pro- ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri mRNA seviyesinde RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, ER stresi sonrasında kalpain 2 ve kaspaz-8'in mRNA düzeyinde aktive olduğunu göstermektedir. Ancak, sistemin bu yolak üzerinden aktive olduğunun kanıtlanabilmesi için bu genlere ek olarak kaspaz 7, kaspaz 12 ve tBid mRNA seviyeleri incelenmeli ve bununla birlikte yukarıda belirtilen genlerin protein ekspresyon seviyeleri de araştırılmalıdır. Ayrıca, kalpain ve kaspaz enzim aktivitelerinin akım sitometrisi ya da ELISA yöntemi ile de belirlenmesi gerekmektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar oluşturulan ER stresi sonrasında SKOV-3 hücrelerinin mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu indüklediğini işaret etmektedir. Ancak, bu sonuçların kesinleşebilmesi için mitokondriyal yolak üzerinden aktive olan diğer sinyal moleküllerinin ekspresyon düzeylerinin de hem mRNA hem de protein düzeyinde gösterilmesi gerekmektedir. Kaspaz 9, Apaf gibi moleküllerin aktivasyonun yanı sıra ATP düzeyi ve mitokondriyal membran polarizasyonunun araştırılması önerilmektedir.

Sonuç olarak; oluşturulan ER stresi modelinde ve metastatik potansiyeli artırılmış SKOV-3 hücrelerinde apoptozun uyarılıp uyarılmadığı ve bununla birlikte

apoptotik mekanizmanın aydınlatılması amaçlanan bu tez çalışmasında; ER stresinin apoptozu uyardığı gösterilmiş olup, kısmen apoptotik mekanizması aydınlatılmıştır. Yukarıda önerilen deneysel aşamaların tamamlanması halinde ER stresine-bağımlı apoptotik yolların tam olarak belirleneceğini düşünüyoruz. Elde edilecek sonuçlar, ovaryum kanserinde baskılanmış apoptoz mekanizmasının detaylarını ortaya koymakla beraber mortalite oranı yüksek olan bu kanser türünün tedavisine yönelik ilaç geliştirme açısından fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aoudjit, F., Vuori, K., (2001), “Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells”, *Oncogene*, 20: 4995-5004.
- Aplin, A. E., Howe, A.K., Juliano, R. L. (1999), “Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth”, *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 737–744.
- Arnaout, M.A., Mahalingam, B., Xiong, J.P., (2005), “Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling”, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21:381–410.
- Aumailley, M., Pesch, M., Tunggal, L., Gaill, F., Fassler, R. (2000), “Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies” *Journal of Cell Science*, 113 2:259-68.
- Aust, S., Pils, D., (2014), “Epithelial ovarian cancer—more data, more questions?”, *Wien Med Wochenschr*, 164(21–22):479–486.
- Ayad, S., Boot-Handford, R.P., Humphries, M.J., Kadler, K.E., Shuttleworth, C.A., (1994), “The extracellular matrix”, Facts book, *Academic press*, San Diego, ABD.
- Ayhan, A., Gultekin, M., Taskiran, C., Dursun, P., Firat, P., Bozdog, G., Celik N.Y., Yuce K., (2007) “Ascites and epithelial ovarian cancers: a reappraisal with respect to different aspects”, *Int. J. Gynecol. Cancer*, 17 68–75.
- Billadeau D.D., Nolz J.C., Gomez T.S., (2007), “Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton”, *Nature Reviews Immunology*, 7, 131-143.
- Bishoy F., (2012), “Cornering metastases: therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells”, *Mini Review Article*, doi: 10.3389/fonc.2012.00068.
- Braun, S., Pantel, K., Mueller, P., Janni, W., Hepp, F., Kantenich, C.R.M., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmueller,

- G., Schlimok, G., (2000) "Cytokeratin-positive bone marrow micrometastases and survival of breast cancer patients with stage I-III disease" *N Engl J Med*, 342: 525–533.
- Brewer, J.W., Hendershot, L.M., Sherr, C.J., Diehl, J.A., (1999) "Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression", *Cell Biology*, Vol. 96, pp. 8505–8510.
- Brun, J.L., Feyler, A., Chene, G., Saurel, Brun G., Hocke C., (2000), "Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer" *Gynecol. Oncol.*, 78 pp. 21–27.
- Boudreau, N., Sympson, C.J., Werb, Z., Bissell, M., (1995) "Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix" *Science*, 267:891-893.
- Cairns, J. (1975), "Mutation selection and the natural history of cancer" *Nature*, 255: 187–200.
- Calderwood D.A., Campbell I.D., Critchley D.R. (2013) "Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 503–517.
- Carduner L., Picot CR, Leroy-Dudal J, Blay L, Kellouche S, Carreiras F., (2014), "Cell cycle arrest or survival signaling through αv integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids" *Experimental Cell Research*, 320: 329-342.
- Carlberg M., Dricu A., Blegen H., Kass G E.N, Orrenius S., Larsson O, (1996) "Short exposures to tunicamycin induce apoptosis in SV40-transformed but not in normal human fibroblasts", *Cardnogenesis*, vol.17 no.12 pp.2589-25.
- Chen W.J., Yu C., Yang Z., He J.L., Yin J., Liu H.Z., Liu H.T., Wang Y.X., (2011), "Tubimoside-1 induces G2/M phase arrest and apoptosis in SKOV-3 cells through increase of intracellular Ca^{2+} and caspase-

dependent signaling pathways”, *International Journal of Oncology*, Pages: 535-543.

Clarke AS, Lotz MM, Chao C., Mercurio A.M (1995) “Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the beta (4) integrin cytoplasmic domain” *J Biol Chem*, 270:2263-22676.

Colombatti, A., Bonaldo, P., & Doliana, R. (1993). “Type A modules: Interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins”, *Matrix*, 13, 297–306.

Coppolino MG, Leung-Hagesteijn C, Dedhar S, Wilkins J. (1995), “Inducible interaction of integrin $\alpha 2\beta 1$ with calreticulin”, *J. Biol. Chem.*, 270: 23132-23138.

Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S. (1997), “Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion”, *Letters to Nature*, 386-843-847.

Demaurex N ve Distelhorst C. (2003) “Apoptosis-the calcium connection” *Science*, 300:65-67.

Desgrosellier JS, Barnes LA, Shields DJ, Huang M, Lau SK, Prevost N, Tarin D, Shattil SJ, Cheresch DA (2009) “An integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -c-*Src* oncogenic unit promotes anchorageindependence and tumor progression” *Nature Medicine*, 15, 1163 – 1169 doi:10.1038/nm.2009.

Figlin RA, Kondagunta GV, Yazji S, Motzer RJ, Bukowski RM (2006) Phase II study of volociximab (M200), “an $[\alpha]5[\beta]1$ anti-integrin antibody in refractory metastatic clear cell renal cell cancer (RCC)” *J Clin Oncol ASCO Annu Meeting Proc*, 24:4535.

Folkman J (2007) “Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery” *Nat Rev Drug Discov*, 6: 273–286.

Foyouzi-Youseffi, R., Arnaudeau S., Borner C., Kelley W.L., Tschopp J., Lew D.P., Demaurex N., Krause K.-H., (2000) “Bcl-2 decreases the free

- Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:5723–5728.
- Gao, L.L., Li, F.R., Jiao, P., Yao, S.T., Sang, H., Si, Y.H., (2011) “Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells Induced by Paris Chinensis Dioscin via a Ca²⁺-Mediated Mitochondrion Pathway” *Asian Pacific J Cancer Prev*, 12, 1361-1366.
- Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1990) “Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells”, *Cell*, 60, 849–859.
- Hajnoczky G., Csordas G., Das S., Perez C.G., Saotome M., Roy S.S., Yi M., (2006) “Mitochondrial calcium signalling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis”, *Cell Calcium*, 40 553–560.
- Heike L.P., Patrick A.B., (1995) “A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF- κ B”, *The EMBO Journal*, vol.14 no.11, 2580-2588.
- Hodkinson P.S., Elliott T., Wong W. S., (2006) “ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through β 1 integrin-dependent activation of PI3-kinase,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, no. 10, 1776–1788.
- Huang C.J., Gurlo T., Haataja L., Costes S., Daval M., Ryazantsev S., Wu X., Butler A.E., Butler P.C., (2010) “Calcium-activated Calpain-2 Is a Mediator of Beta Cell Dysfunction and Apoptosis in Type 2 Diabetes” *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 285, NO. 1, 339–348.
- Illario M., Cavallo AL., Bayer KU., Matola TD., Fenzi G., Rossi G., Vitale M. (2003) “Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation”, *J of Biol. Chem.*, 278: 45101-45108.

- Jia, Y., Zeng, Z. Z., Markwart, S. M., Rockwood, K. F., Ignatoski, K. M., Ethier, S. P., et al. (2004). "Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells" *Cancer Research*, 64, 8674–8681.
- Kar P., Samanta K., Shaikh S., Chowdhury A., Chakraborti T., Chakraborti S., (2010) "Mitochondrial calpain system: An overview", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495 1–7.
- Kaspar, M., Zardi L., Neri, D., (2006) "Fibronectin as target for tumor therapy" *Int J Cancer*, 118:1331–1339.
- Keller, E.T. (2002) "Overview of metastasis and metastases", *J Musculoskel Neuron Interact*, 2: 567-569.
- Kenny, H.A., Kaur, S., Coussens, L.M., Lengyel, E., "The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin", *J. Clin. Invest.*, 118 (2008) 1367–1379.
- Kim, T. H., Kim, H. I., Soung, Y. H., Shaw, L. A., ve Chung, J. (2009) "Integrin (alpha6beta4) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion", *Molecular Cancer Res*, 7, 1605– 1612.
- Koshiyama, M., Matsumura, N., Konishi, I., (2014) "Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II", *Biomed Res Int*, 93: 4261.
- Kratochvilova, K., Horak, P., Esner, M., Soucek, K., Pils, D., Anees, M., Tomasich, E., Drafi, F., Jurtikova, V., Hamp, A., Krainer, M., Vanhara, P., (2015) "Tumor suppressor candidate 3 (TUSC3) prevents the epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits tumor growth by modulating the endoplasmic reticulum stress response in ovarian cancer cells", *Int. J. Cancer*, 137, 1330–1340.
- Kwon, M.S., Park, C.S., Choi, K., Park, C.S., Ahnn, J., Kim, J.I., Eom, S.H., Kaufman, S.J., Song, W.K., (2000), "Calreticulin couples calcium

release and calcium influx in integrin-mediated calcium signalling”, *Mol Biol of the Cell*, 11: 1433-1443.

Ling, Y.H., Li, T., Perez-Soler, R., Haigentz, J. M., (2009) “Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib”, *Cancer Chemother Pharmacol*, 64:539–548.

Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, G.W., (1991) “Tumor invasion and Metastasis: An imbalance of positive and negative regulation” *Ancer Research*, 51: 5054-5059.

Mahabeleshwar, G.H, Chen, J., Feng, W., Somanath P.R., Razorenova, O.V., (2008) “Integrin affinity modulation in angiogenesis” *Cell Cycle*, 7: 335–347.

Magnusson, M.K., Mosher, D.F. (1998) “Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:1363–1370.

Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A., Mongiat, M. (2008) “Extracellular matrix: a matter of life and death” *Connect Tissue Res*, 49:203–206.

McNeel, D.G., Eickhoff, J., Lee, F.T., King, D.M., Alberti, D., Thomas, J.P., Friedl, A., Kolesar, J., Marnocha, R., Volkman, J., Zhang, J., Hammershaimb, L., Zwiebel, J.A., Wilding, G. (2005) “Phase I trial of a monoclonal antibody specific for $[\alpha]v[\beta]3$ integrin (MEDI-522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion”, *Clin Cancer Res*, 11:7851–7860.

Mehlen, P., Puisieux, A., (2006) “Metastasis: a question of life or death” *Nature Rev Cancer*, 6: 449–458.

- Montgomery, A.M.P., Reisfeld, R.A., Cheresch, D.A., (1994), “Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma from apoptosis in a three-dimensional dermal collagen” *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 91, pp. 8856-8860.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., Yasuhiko, Y., (2002) “An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis”, *JBC Papers in Press*, 13;277(37):34287-94.
- Nowell, P.C.(1976) “The clonal evolution of tumor cell populations” *Science*, 194:23-28.
- Peng, C., Liu, X., Liu, E., Xu, K., Niu, W., Chen, R., Wang, J., Zhang, Z., Lin, P., Wang, J., Agrez, M., Niu, J., (2009) “Norcantharidin induces HT-29 colon cancer cell apoptosis through the alpha5beta1- extracellular signal-related kinase signaling pathway. *Cancer Sci* 100(12):2302–2308.
- Puiffe, M.L., Le Page, C., Filali-Mouhim, A., Zietarska, M., Ouellet, V., Tonin, P.N., Chevrette, M., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M., (2007) “Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer”, *Neoplasia* 9 820–829.
- Rathinam, R., Alahari, S.K., (2010). “Important role of integrins in the cancer biology” *Cancer Metastasis Rev.*, 29: 223-237.
- Ray, M.R., Jablons, D.M., (2009), “Hallmarks of Metastasis.” *Lung Cancer Metastasis*, DOI 10.1007/978-1-4419-0772-1_2, San Francisco, CA, USA 29-46.
- Renner, G., Janouskova, H., Noulet, F., Koenig, V., Guerin, E., Bär, S., Nuesch, J., Rechenmacher, F., Neubauer, S., Kessler, H., Blandin, A.F., Choulier L., Etienne-Selloum, N., Lehmann, M., Lelong-Rebel, I., Martin, S., Dontenwill, M., (2015), “Integrin $\alpha 5\beta 1$ and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin

in high-grade glioma”, *Cell Death & Differentiation*, doi:10.1038/cdd.2015.131.

Rock, MT., Brooks, WH., Roszman, TL., (1997), “Calcium-dependent signalling pathways in T cells” *J of Biolo Chem.*, 272: 33377-33383.

Rosado, J. A., Meijer, E. M. Y., Hamulyak, K., Novakova, I., Heemskerk, J. W. M., and Sage, S. O. (2001), “Fibrinogen binding to the integrin alpha(IIb)beta(3) modulates store-mediated calcium entry in human platelets”, *Blood*, 97, 2648–2656.

Sage, S. O., Sargeant, P., Heemskerk, J. W., “Mahaut-Smith, M. P (1993) Calcium influx mechanisms and signal organisation in human platelets” *Adv. Exp. Med. Biol.*, 344, 69–82.

Sanges, D., Marigo, V., (2006) “Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF”, *Apoptosis*, 11:1629–1641.

Sastry, S. K., & Burridge, K. (2000) “Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics” *Experimental Cell Research*, 261, 25–36.

Schirmacher, V., (1985), “Experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies”, *Adv. Cancer Res.*, 43: 1-32.

Schwartz, M. A. (1993), Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. *J. Cell Biol.* 120, 1003–1012.

Schwartz, M., Brown, E.J., Fazeli, B., (1993) “A 50-kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells”, *J of Biolog Chem.*, 268: 19931-19934.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., (2003) “BAX and BAK Regulation of Endoplasmic

Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis”, *Science*, Vol. 300, Issue 5616, p:135-139.

Sevrioukova, I.F., (2011) “Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation”, *Antioxidants & Redox Signaling*, V14, N12.

Sjaastad, M. D., Lewis, R. S., and Nelson, W. J. (1996) “Mechanisms of integrin-mediated calcium signaling in MDCK cells: regulation of adhesion by IP3- and store-independent calcium influx” *Mol. Biol. Cell* 7, 1025–1041.

Smith, M.A., Schnellmann, R.G., (2012) “Calpains, mitochondria, and apoptosis”, *Cardiovascular Research*, 96, 32–37.

Sorimachi, H., Hata S., Ono, Y., (2010) “Expanding Members and Roles of the Calpain Superfamily and Their Genetically Modified Animals”, *Experimental Animals*, Vol. 59 No. 5 P 549-566.

Stanchi, F., Grashoff, C., Nguemeni Yonga, C. F., Grall, D., Fassler, R., & Van Obberghen-Schilling, E. (2009) “Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focaladhesion maturation” *Journal of Cell Science*, 122, 1800–1811.

Storr, S.J., Carragher N.O., Frame, M.C., Parr, T., Martin, S.G., (2011) “The calpain system and cancer”, *Nature*, V:11 P:364-374.

Szalai, G., Krishnamurthy, R., Hajnoczky, G., (1999) “Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals” *EMBO J.*, 18, 6349.

Tang, B. L., ve Ng, E. L. (2009), “Rabs and cancer cell motility” *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66, 365–370. 43
Thomas F., Holly J. M. P., Persad R., Bahl A, Perks C. M, (2010) “Fibronectin confers survival against chemotherapeutic agents but not against radiotherapy in DU145 prostate cancer cells: involvement of the insulin like growth factor-1 receptor,” *Prostate*, vol. 70, no. 8, 856–865.

- Van der Flier, A., ve Sonnenberg, A., (2001), “Function and interactions of integrins”, *Cell and Tissue Research*, 305, 285– 298.
- Varner, J. A., Emerson, D. A., & Juliano, R. L. (1995) “Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin” *Molecular Biology of the Cell*, 6, 725–740.
- Villa, A., Trachsel, E, Kaspar, M., Schliemann, C., Somnavilla, R., Rybak, J.N., Rosli, C., Borsi, L., Neri, D., (2008) “A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo”, *Int J Cancer*, 122:2405–2413.
- Wang, N.S., Unkila, M.T., Reineks, E.Z., Distelhorst, C.W., (2001) “Transient Expression of Wild-type or Mitochondrially Targeted Bcl-2 Induces Apoptosis, whereas Transient Expression of Endoplasmic Reticulum-targeted Bcl-2 Is Protective against Bax-induced Cell Death” *The Journal Of Biological Chemistr*, Vol. 276, No. 47, pp. 44117–44128.
- Watanabe, Y., Tsuchiya, H., Sakabe, T., Matsuoka, S., Akechi, Y., Fujimoto, Y., Yamane, K., Ikeda, R., Nishio, R., Terabayashi, K., Ishii, K., Gonda, K., Matsumi, Y., Ashla, A., Okamoto, H., Takubo, K., Tomita, A., Hoshikawa, Y., Kurimasa, A., Itamochi, H., Harada, T., Terakawa, N., Shiota, G., (2008) “CD437 induces apoptosis in ovarian adenocarcinoma cells via ER stress signaling”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366 840–847.
- Weigelt, B., Peterse, J.L., ve van ‘t Veer, L.J. (2005) “Breast cancer metastasis: markers and models” *Nature Rev Cancer*, 5: 591–602.
- Yamasaki, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H., Yamada, K.,(2012) “Important Role of β 1-Integrin in Fucoidan-Induced Apoptosis via Caspase-8 Activation”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76: 1163-1168.

- Yao, E.S., Zhang, H., Chen, Y.Y., Lee, B., Chew, K., Moore, D., Park, C., (2007) “Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer” *Cancer Res*, 67:659–664.
- Young, S.A., Graf, R., Stupack, D.G., (2013) “Neuroblastoma Integrins, Neuroblastoma”, *InTech*, Prof. Hiroyuki Shimada (Ed.), ISBN: 978-953-51-1128-3, , DOI: 10.5772/55991.
- Ziomek, G., Zanjani, P.C., Arman, D., Breemen, C.V., Esfandiarei, M., (2014) “Calcium regulation in aortic smooth muscle cells during the initial phase of tunicamycin-induced endo/sarcoplasmic reticulum stress”, *European Journal of Pharmacology*, 735, 86–96.
- Zhang, H.Y., Du, Z.X., Liu, B. Q., Gao, Y.Y., Meng, X., Yifu, Guan Y., Deng, W.W., Wang, H.Q., (2009) “Tunicamycin enhances TRAIL-induced apoptosis by inhibition of cyclin D1 and the subsequent downregulation of survivin”, *Experimental and Molecular Medicine*, Vol. 41, No. 5, 362-369.
- Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J.C., Ruoslahti, E., (1995) “The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and upregulates bcl-2 expression” *Mol Bio/Cell*, 8:841-850.