

**KOLAJEN PROTEİNİ ile H-*ras* AKTİF
HÜCRELERİNİN ETKİLEŞİMİ**

Şerife Aydoğdu

Yüksek Lisans Tezi

**KOLAJEN PROTEİNİ ile H-*ras* AKTİF
HÜCRELERİNİN
ETKİLEŞİMİ**

Şerife Aydoğdu

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Ocak 2008

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zerrin İNCESU

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şerife AYDOĞDU' nun 'Kolajen Proteini ile H-*ras* Aktif Hücrelerinin Etkileşimi' başlıklı, Biyokimya Ananbilim Dalı' ndaki Yüksek Lisans tezi, 13/Şubat/2008 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç.Dr Zerrin İNCESU Anadolu Üniversitesi	
Üye	Yrd.Doç.Dr Mediha CANBEK Osmangazi Üniversitesi	
Üye	Yrd.Doç.Dr Filiz ÖZDEMİR Anadolu Üniversitesi	

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

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve aynı zamanda büyük bir sabırla beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zerrin İncesu' ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Hücre kültürü çalışmalarımı yürüttüğüm, olanaklarından yararlandığım BİBAM Müdürü Sayın Prof. Dr. Rıdvan Say başta olmak üzere tüm merkez çalışanlarına,

Tezimin her aşamasında bilgi birikimiyle bana yardımcı olan arkadaşım Sayın Araş. Gör. Gülşen Akalın'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca moral desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Nagehan Dağdeviren'e, Arzu İşcan'a, Nihal Akkan' a, Burcu Fırat' a ve Çağlar Fırat' a,

Ayrıca eğitim hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme ve yaşam sevincim müstakbel eşim Erkan Uyar 'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

KOLAJEN PROTEİNİ ile H-*ras* AKTİF HÜCRELERİNİN ETKİLEŞİMİ

ÖZET

Düşük molekül ağırlıklı GTP-bağlı protein süper ailesinin üyesi olan *ras* proteinler, normal selüler proliferasyonunu düzenleyen kritik sinyal yollarının aktifliğini kontrolde rol almışlardır. Aktif *ras* proteinlerinin genellikle insan tümörlerinin gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Kolajen proteinleri memelilerde çok miktarda bulunurlar ve dokuların biyokimyasal yapıları için önemlidirler. Ayrıca hücre adezyonu, taşınması, büyümesi, morfogenez ve yara iyileşmesinde önemli role sahiptirler. Bunun aksine insan kanser tiplerinin birçoğunda kolajen protein geninde mutasyon olduğu saptanmıştır.

Yapılan bu çalışmada, 5RP7 H-*ras* aktif hücrelerinin kolajen tip IV proteinine bağlanma kapasitesi saptanarak kolajen tip IV' e bağlı hücrelerin apoptotik indeksinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sıçan 5RP7 hücrelerinin büyüme eğrisinin çıkarılması için tripan mavisi ile boyama yöntemi, hücrelerin kolajene bağlanma oranlarının belirlenmesi için MTT ve kristal mor boyama yöntemleri, kolajene bağlı hücrelerin apoptotik indeksinin belirlenmesi için ise agoroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır.

5RP7 hücrelerinin büyümesi zamana göre tripan mavisi ile belirlenmiştir. Bu sonuca göre, diğer çalışmalar için optimum hücre sayısı $12,5 \times 10^4$ ml/hücre olarak tespit edilmiştir. 5RP7 hücrelerinin kolajen tip IV' ün değişik konsantrasyonlarına bağlanma kapasitesi MTT deneyi ve kristal mor yöntemi ile araştırılmıştır. Her iki metotun sonucuna göre, hücrelerin düşük kolajen tip IV dilüsyonunda (2.5 µg/ml) bile kontrol hücrelerine göre oldukça yüksek bağlandığı tespit edilmiştir. DNA fragmentasyonu deneyine göre kolajen tip IV' e bağlı 5RP7 hücreleri apoptoza gitmeyerek DNA merdiven görüntüsü göstermemiştir. Hücreler kolajen tip IV' e kuvvetlice bağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, integrin, ekstraselüler protein, kolajen, kanser

INTERACTION OF COLLAGEN PROTEIN WITH H-*ras* ACTIVE CELLS

ABSTRACT

As members of a large superfamily of low-molecular-weight GTP-binding protein, *ras* proteins have played essential roles in controlling the activity of several crucial signaling pathways that regulate normal cellular proliferation. Activation mutations within the *ras* proteins frequently contribute to the development of human tumors.

Collagens are the most abundant proteins in mammals. Collagen-rich extracellular matrices are not only critically important for the biomechanical properties of tissues, but are also intimately involved in cell adhesion and migration during growth, differentiation, morphogenesis and wound healing.

The aim of this study was that determination of adhesion capacities of H-*ras* active cells, 5RP7 to collagen type IV protein and also to find out how apoptotic process effected by adhering the cells to collagen type IV.

The rate of 5RP7 cell growth was determined by trypan blue during the time points. The results showed that 12.5×10^4 cells/ml was optimum cell number for other experiments. The adhesive capacity of 5RP7 cells to various dilution of collagen type IV was investigated with either MTT assay or crystal violet method. The data obtained from both methods showed that the cells had a higher adhesive capacity to even at 2.5 $\mu\text{g/ml}$ collagen type IV compared to control cells. Apoptotic DNA ladder was not appeared in 5RP7 cells adhered to collagen type IV by DNA fragmentation assay. The cells were bind to collagen type IV firmly.

Key words: Cell culture, integrin, extracellular protein, collagen, cancer

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
GEREÇLER	12
Kullanılan Maddeler	
<i>Kimyasal maddeler</i>	12
<i>Sarf maddeler</i>	12
Kullanılan Cihazlar	12
YÖNTEMLER	12
Hücre Kültürü ve Bileşiklerin Hazırlanması	12
Tripan Mavisi ile Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	12
Kristal Mor Ölçümü	13
MTT Ölçümü	13
DNA Ekstraksiyonu ve Elektroforetik Analizi	13
<i>DNA ekstraksiyonu</i>	13
<i>Elektroforetik analiz</i>	14
BULGULAR VE TARTIŞMA	15
5RP7 H-ras Aktif Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	15
5RP7 Hücrelerin Kolajen Tip IV Proteinine Bağlanma Oranlarının MTT ile Belirlenmesi	16

5RP7 Hücrelerin Kolajen Proteinine Bağlanma Oranlarının	
Kristal Mor ile Belirlenmesi	18
Kolajen Tip IV' ün Apoptotik Özelliği	19
SONUÇ ve ÖNERİLER	21
KAYNAKLAR	22

ÇİZELGE DİZİN

ÇİZELGE NO ve ADI

Çizelge 1 Memeli Kolajen Reseptörleri

SAYFA

9

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Ras Sinyal Yolağı	4
Şekil 2 İntegrin Reseptörleri	6
Şekil 3 Kolajen Tip IV' ün Yapısı	8
Şekil 4 Kolajenin İntegrine Bağlanması	9
Şekil 5 5RP7 Hücre Büyüme Eğrisi	14
Şekil 6 MTT Yöntemi ile 5RP7 Hücrelerinin Kolajen Tip IV'e Bağlanma Oranının Tespiti	15
Şekil 7 Kristal Mor Yöntemi ile 5RP7 Hücrelerini Kolajen IV' e Bağlanma Oranının Tespiti	17
Şekil 8 Kolajen Tip IV' e Bağlı 5RP7 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi	18

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf- 1	: Apoptotik proteaz-aktive edici faktör-1
Arg	: Arginin
Asp	: Aspartat asit
COL4	: Kolajen Tip IV
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DISC	: Ölüm-uyarıcı sinyal kompleksi
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ESM	: Ekstrasellüler matriks
FAK	: Fokal adezyon kinaz
GDP	: Guanozin difosfat
GPR2	: Büyüme faktörü bağlayıcı protein-2
GTP	: Guanozin trifosfat
Gly	: Glisin
IAP	: Apoptoz inhibitör ailesi
kDa	: Kilodalton
MAPK	: Mitojen aktifleştirici protein kinaz
MAPKK	: Mitojen aktifleştirici protein kinaz kinaz
MIDAS	: Metal iyonunun bağlanma bölgesi
NC1	: Non-kolajen-I
PDGF	: Trombositten türeyen büyüme faktörü
PKC	: Protein kinaz C
PI-3K	: Fosfoinositol-3 kinaz
PTEN	: Tümör baskılayıcı gen
RNA	: Ribonükleik asit
TNF- α	: Tümör nekroz faktör- α

GİRİŞ ve AMAÇ

Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçlarının bir fonksiyonudur. Azalmış hücre çoğalması veya artmış ölüm hızı herhangi bir aşırı artışı önleyen homeostatik denge 'feedback' mekanizmalarla kurulur. Kanser bu mekanizmaların kontrolden çıkıp kontrolsüz ve spontan olarak büyüeyebilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmeleridir.

Bunun yanı sıra programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz mekanizmasında oluşan kusurlar en başta kanser, viral infeksiyonlar, AIDS ve nörodejeneratif hastalıklara da neden olmaktadır (http-1).

Kanser oluşumunda özellikle reseptörlerin veya sinyal iletim proteinlerin (örneğin, ras proteini) mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kendi başına giden hücre bölünmesine yol açmaktadır.

Ras proteinleri düşük molekül ağırlıklı GTPaz'lardır. Ras proteinlerinin proto-onkogen prekürsörleri sinyalleri hücre yüzeyinden çekirdeğe aktarmaktadırlar. Bu proteinler GDP ve GTP ile kompleks oluştururlar. Protein-GTP kompleksi kimyasal olarak aktif formdur ve bu form çekirdekteki çeşitli promotör proteinleri aktifleştirir. Bu proteinler GTPaz aktivitesine sahiptirler ve bu aktivite, sitoplazmik bir protein olan GAP tarafından arttırılmaktadır. GTPaz GTP'yi GDP'ye dönüştürür ve böylece protein-GTP kompleksi inaktifleşir. Ras proteini ayrıca diaçilgliserol düzeyini de arttırarak protein kinaz C (PKC)'yi aktifleştirir. PKC önemli bir DNA transkripsiyon başlatıcısıdır.

Ras mutasyonları sonucu, hasara uğramış GTPaz ile proto-onkogen GTP formu devamlı aktif kalır ve çekirdek proteinleri ve DNA transkripsiyonu sürekli uyarılmış olmaktadır.

İntegrin reseptörleri ise ligandına bağlı olarak biyokimyasal sinyal iletimini ve buna bağlı olarak hücre göçünü, büyümesini ve hücre canlılığını düzenlerler. İntegrinlerin önemli fonksiyonu, dinamik intraselüler hücre iskeleti ile ekstraselüler matriks arasında yapısal bağlantının düzenlenmesidir. Ekstraselüler matriks proteinlerinden biri olan kolajen, memelilerde oldukça fazla bulunmaktadır. Kolajen tip IV çok kısa peptid sıralamaları aracılığıyla tümör anjiyojenezi, migrasyonu, proliferasyonu ve adezyon düzenlenmesinde rol oynar ve bazal membrana epitel hücrelerin temel yüzeyine bağlanmasıyla ilişkilidir. Kolajence zengin hücre dışı matriksler dokuların biyokimyasal yapıları için önemlidir. Bazal membran yapısında bulunan kolajen tip IV migratif hücreler için kritik bariyer oluşturur (Kjoller ve ark., 2004). Ayrıca hücre bağlanması, taşınması, büyümesi, değişmesi ve yara iyileşmesinde önemlidir. $\alpha_1\beta_1$ integrin bazal membran kolajen tip IV'ün seçici reseptörüdür.

Epitel hücrelerin ekstraselüler matriks ile arasındaki bu bağlantı kurulamazsa apoptoz hızlı bir şekilde stimüle edilir. Bu özgü hücre ölümüne anoikis denmektedir. Normal epitel hücreleri belli onkogenlerin ekspresyonu ile anoikise karşı direnç sağlamaktadır (Chen ve ark., 2006). Böylelikle kanserde integrinler büyüme faktör sinyali ile sinerji oluşturmakta ve hücre çoğalmasını uyarmaktadır.

Adezyon moleküllerinin sinyal iletiminde rol aldığı gösterilmesi son 10 yılın temel gelişimlerinde biri sayılmaktadır. Sinyal iletimi en iyi integrinler ile tanımlanmıştır.

Bu nedenden dolayı tez kapsamında planlanan çalışmanın genel amacı, 5RP7 sıçan embriyo *H-ras* aktif hücrelerin kolajen proteinine bağlanma oranlarının MTT ve kristal mor boyama yöntemleri ile belirlenmesi ve kolajene bağlı hücrelerde apoptotik DNA kırılımlarını tespit eden bir yöntem ile apoptotik indeksin belirlenmesidir.

KAYNAK BİLGİSİ

Apoptoz Mekanizmasının Kansere Oluşumundaki Rolü

Hücre çoğalması, hücre dışı sinyallerin, hücre içi mesajlarla koordine edildiği kompleks bir hücrel sinyal iletim mekanizması ile düzenlenmekte olan (Basu ve Sivaprasad, 2007) kanser hastalığı, hücre yaşamı ve ölümü arasındaki dengesizlik sonucu meydana gelmektedir.

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, embriyonik gelişimin ve doku homeostazının dengede tutulmasını sağlayan genel bir mekanizmadır (Flierman ve Daha, 2007; Hu ve ark., 2001; Wyllie, 1980). Nekrozdan farklı olarak, apoptoz; hormona bağımlı doku atrofisi, timusta lenfosit olgunlaşması, morfogenez gelişiminin düzenlenmesi ve kanser gibi pek çok biyolojik süreçte rol oynamaktadır (Dual ve Wyllie, 1986; Arends ve Wyllie, 1991; Meyn ve ark., 1994). Buna ek olarak, apoptotik hücreler; kromatin yoğunlaşması (Wyllie, 1980), genetik materyalin parçalanması (Walker ve Sikorska, 1994), fosfotidil serin molekülünün translokasyonu, sitoplazmik hacmin kaybolmasından dolayı hücrenin küçülmesi ve hücre zarına bitişik hücrelerarası ortama uzanan "apoptotik cisim"lerin oluşması (Kauffmann ve ark., 1997) gibi morfolojik değişimler bakımından nekrotik hücrelerden farklılık göstermektedirler.

Hücre ölümünde iki önemli yol yer almaktadır. Dış yolak, substratın Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) reseptör aile üyelerine bağlanması sonucu aktive olmakta ve reseptör oligomerizasyonu meydana gelmektedir. Bunun sonucu olarak da, prokaspaz olan 8 ya da 10' nun adaptör proteinler aracılığı ile kümelenmesi ve ölüm-uyarıcı sinyal kompleksinin (DISC) oluşumu gözlenmektedir (Basu ve Sivaprasad, 2007; Kischkel ve ark., 1995). İç ya da mitokondrial yolak DNA hasarı gibi hücrel stres ile uyarılır ve bunun sonucunda mitokondrial sitokrom c salınımı gerçekleşmektedir. Apoptoz uyarıcı aktive faktör-1 (Apaf-1), başlangıç prokaspaz-9 ile etkileşime girerek aktif apoptozom kompleksini oluştururlar (Nunez ve ark., 1998) . Reseptör düzenleyici yolak ile mitokondrial yolak arasındaki iletişim, aktif kaspaz-8'in Bid proteinini parçalaması ve Bid'in Bax/Bak kompleksini aktive etmesi için mitokondriye transloke olması ile başlatılır. Bunun sonucunda, sitokrom c salınır ve kaspaz-9 ve diğer kaspazların aktivasyonu gerçekleştirilir (Basu ve Sivaprasad, 2007).

Her iki yolda da, kaspaz denilen sistein proteazlar tarafından bir seri nükleer ve sitoplazmik substratlar parçalanmaktadır ve apoptoz sırasında Bel-2 ailesine ait proteinler tarafından düzenlenen bir mekanizma ile mitokondrial zar permabilize edilir (Zhu ve ark., 2007).

Kaspazlar, sistein proteaz ailesine ait olup, aspartat kalıntısından sonraki protein kısmının kesiminden sorumludurlar (Salvesen ve Dixit, 1999). Bu enzimler, hücre içinde aktif olmayan proenzim formunda sentezlenirler ve apoptoz mekanizmasının uyarılması ile düşük lokal konsantrasyonda bulunan başlangıç kaspazlarının konsantrasyonları, hücre içi protein-protein etkileşimi ile artmaktadır (Bao ve Shi, 2007). Bu miktar artışı ile birlikte, aktif hale geçen başlangıç kaspazları, efektör prokaspazların parçalanmasına ve buna bağlı olarak da aktif kaspazların oluşumu ve kaspaz yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır (Bao ve Shi, 2007). Kaspaz 8, 9 ve 10 apoptoz mekanizmasının erken fazında görev yaparken, kaspaz 3, 6 ve 7 ise sonuç

aşamasında etkili olan enzimlerdir. Kaspaz 2' nin ise, hem erken hem de sonuç evresinde efektör kaspaz olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Kumar, 2006). Kaspazların aktivasyonu çeşitli pro- ve anti-apoptotik sinyal iletim yolağı ile düzenlenmektedir. Bunun içinde, Bcl-2 aile üyeleri (Adams ve Cory, 1998), katalitik olarak inaktif kaspazlar (e.g. FLIP) (Irmeler ve ark., 1997) ve apoptoz inhibitörleri (IAP) (Deveraux ve ark., 1997) yer almaktadır. Protein kinazlar, örneğin; Akt/protein kinaz B (PKB), protein kinaz C (PKC) ve mitojen-aktive protein kinazlar (MAPKs) sinyal iletiminde merkezi bir role sahiptirler ve kaspaz aktivasyonunu düzenlemektedirler. Bu kinazların düzenlenmesinde meydana gelen bir hata hastalık oluşumuna yardımcı olmaktadır.

Ras Protein Ailesi

Kanser bazı normal genlerin mutasyona uğrayarak fonksiyonlarının bozulması ya da kaybolması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Onkogen adı verilen kanser etmeni gen ürünlerinin hücre çoğalması ya da bunun karşıtı olan hücre farklılaşması ve hücre ölümündeki rollerin ayrıntılı olarak incelenmesi kanser tedavi metotlarının geliştirilmesi için çok önemlidir.

Onkogenler, hücre genler olarak bilinen hücre sinyalizasyonu, hücre büyümesinin regülasyonunda önemli rol oynayan proto-onkogenlerin mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel disregülasyon ile fonksiyon değişikliğine uğramış ve bunun sonucu olarak da anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olan genlerdir (Köktürk ve ark., 2003).

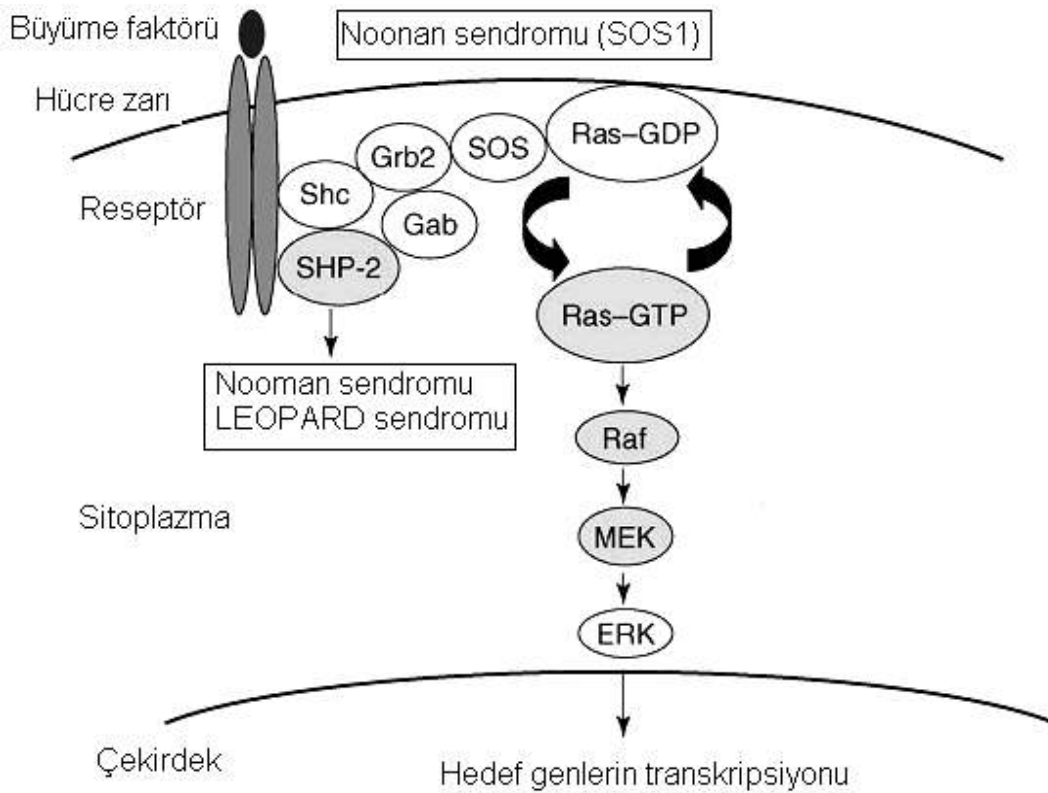
Bu onkogenlerin bir kısmı düşük moleküler ağırlıklı G-protein ailesinin birer üyesidir. Özellikle, Ras onkogeni tarafından kodlanan ve guanozin tri fosfat (GTP) aktivitesine sahip olan hücre zar proteini ras (ras p21), hücre canlılığı, çoğalması ve farklılaşması için gerekli olan ekstraselüler sinyallerin çekirdeğe iletimini sağlar. Ras p21, GTP' ye ya da bunların hidroliz olmayan analoglarına bağlandığında aktif formda, guanozin di fosfat (GDP)' a bağlandığında ise inaktif forma bulunmaktadır. GTPaz enzimi, ras p21 proteine bağlı GTP'nin γ -fosfatını hidrolize uğratarak bu proteinin GDP' ye bağlı inaktif formunu oluşturup istirahat fazına geçmesini sağlar (Kim ve ark., 2006). Hücre çoğalmasının olmadığı durumlarda, birçok hücre p21 proteini GDP kompleksine bağlı formda bulunur, fakat ortama mitojenin eklenmesi ile baskın bir şekilde p21 proteini GTP-bağlı forma geçmektedir (Kim ve ark., 2006).

Nokta ya da farklı tip mutasyonlar ile aktive olmuş mutant ras p21 proteini ise, GTPaz aktivitesinden yoksun olduğu için aktif GTP formunda tutulmaktadır ve bu durum özellikle kanser gelişimi için önemli olan, artan hücre proliferasyonu ile ilişkilidir (Kriaris ve Spandios, 1995).

Hücre dışı uyarıcıların salgılanması sonucu ras sinyal yolağının ilk basamağı olan monomer tirozin kinaz reseptörlerinin dimer yapı kazanarak otoaktivasyon sonucu fosforile edilmeleridir (Vojtek ve Der, 1998). Bunun sonucunda fosforile olan substitüe, büyüme faktör reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) adaptör protein için bağlanma bölgesi oluşturarak diğer bir adaptör protein olan SOS' in aktif forma geçmesine neden olmaktadır. Guanin nükleotit değişim faktörü olan SOS, GDP'nin salınımını ve GTP' nin onun yerine bağlanmasını uyarmaktadır. Böylece aktif hale geçen ras proteini birçok hücre içi efektör proteini uyarmaktadır (Feig ve Buchsbaum, 2002).

Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir (Doğan ve Güç, 2004). Ras sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimi ve aktivasyonunu sağlarlar (Kolch, 2000; Lee ve McCubrey, 2002) (Şekil 1).

İnsan tümörlerinin %30' unda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur (Kolch, 2000). Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır. Diğer yandan, farnezil transferaz inhibitörleri Ras aktivasyonunu engellerler. Klinik çalışmalar, bu ajanların antitümöral etkilerinden tedavide yararlanılabilme olasılığını güçlendirmektedir (Karp ve ark., 2001).



Şekil 1. Ras Sinyal Yolağı (Schubert ve ark. , 2007)

Ras iletim yolu ile tetiklenen transformasyon sürecinde sinerjik etkileşim de önem taşır. Normal koşullarda, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinositol-3 kinaz (PI-3K) yolunu uyarmalarında Ras'ın etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık onkojenik Ras, PI-3K yolunun güçlü bir aktivatörüdür (Doğan ve Güç, 2004). Onkojenik Ras bu yolu aktive ederek apoptozu baskılar (McCormick, 1999; Blalock ve ark.,2003). İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü epitel hücrelerinden köken alır. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozun baskılanması karsinogenez sürecinde kritik

etkenlerden birini oluşturur. Ayrıca, onkogenik Ras uyarısı, transforme hücrelerde normal hücrelerden farklı genlerin ekspresyonunu da uyarabilir (McCormick, 1999).

Ras sinyal yolağı birkaç akışaşağı arabulucuları içerir. Ras'ın büyük substratlarından biri, serin/treonin protein kinaz Raf-1 dir (Leever ve ark., 1994; Marais ve ark., 1995; Shields ve ark., 2000). Ardışık olarak harekete geçiren ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz (ERK) ve mitojen-aktifleştiren kinaz kinaz (MAPKK veya MEK) dahil birkaç proteinin fosforilasyonunu içeren bir akışaşağı kaskat Raf-1' in aktivasyonu ile sonuçlanır (Daum ve ark., 1994; Kerkhoff ve Ropp, 1998; Downword, 2003).

Harvey (*H-ras*), Kirsten (*K-ras*) ve Neuroblastoma (*N-ras*) genleri ras gen ailesinin birer üyesi olup, her biri onkogenik aktiviteye sahiptirler. Bu onkogenik aktivite, her bir ras gen aile üyesinin kodladığı ras proteinlerinin farklı aminoasitlerinde meydana gelen nokta mutasyonlar sonucu kazanılmıştır (Park ve ark., 2004). Mutasyonlar sonucunda normal ras geninin 12. kodonunda bulunan glisin aminoasiti, *K-ras* onkogeninde arjinine dönüştüğü bildirilmiştir. Benzer şekilde, normal genin 61. kodonundaki glutamin, *H-ras* geninde lösine, *N-ras* geninde ise arjinine dönüştüğü tespit edilmiştir (Klug ve Cummings, 2000). Mutasyonların hem GTPaz aktivitesindeki azalmaya neden olduğu hem de hücresel transformasyonun başlamasında etkili olduğu bilinmektedir.

H-ras proto-onkogeni sıklıkla birkaç insan ve hayvan tümörlerinde aktif halde bulunmuştur ve bu malignanların ortaya çıkmasında önemli rol aldığı düşünülmüştür (Bos, 1989). Birkaç spesifik *H-ras* alel meme kanserinde daha sık görülmektedir (Kang ve ark., 2006). Gerçekte, en çok insan meme karsinomasında *H-ras* RNA ve proteinin gelişmiş düzeyinde ortaya çıkmıştır (Hand ve ark., 1987). Ayrıca aktifleşmiş *H-ras* ekspresyonu deneysel melanoma tümör büyümesinin korunması için gerekli olduğu da gösterilmiştir (Chin ve ark., 1999).

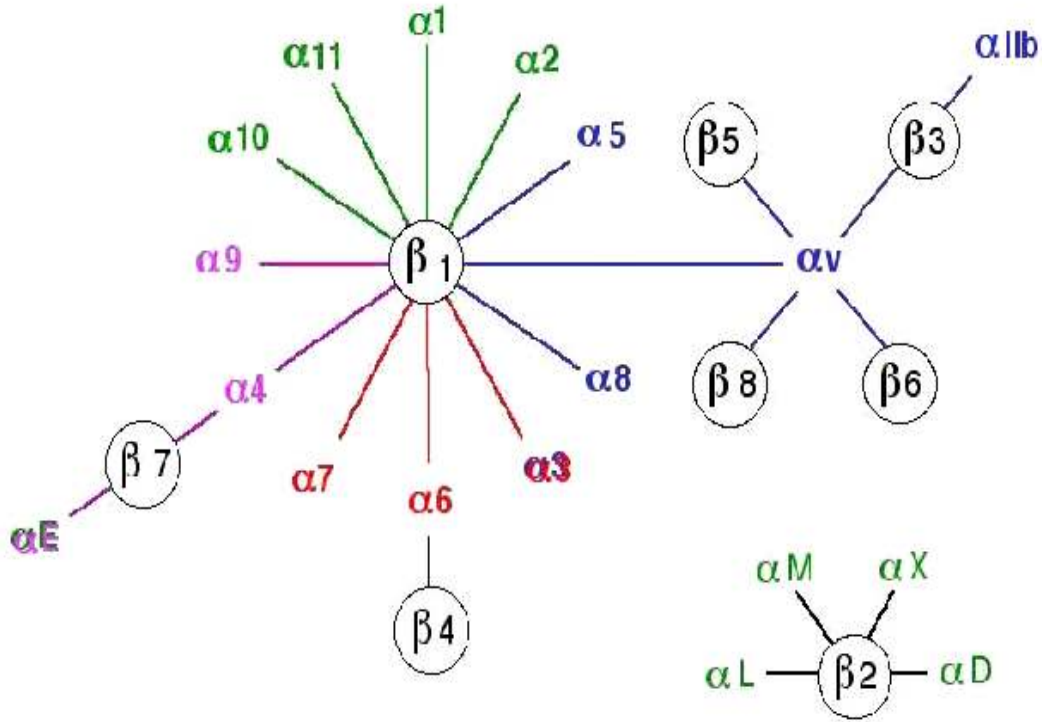
H-ras aktivitesi Ras/PI3K/PDK/PKB yolakları gibi Ras/Raf/MEK/Erk yolağının her ikisinin aktivasyonu ile düzenlenmiştir (Kang ve ark., 2006). Spesifik bir antikor tarafından Akt ve Erk ekspresyonu ölçülerek, bunların *H-ras* yolağında tipik aşağı akış sinyal proteinleri olduğu gösterilmiştir (Kang ve ark., 2006).

İntegrinlerin Yapısı ve Fonksiyonları

İntegrin reseptörleri, hücre zarına gömülü bir şekilde lokalize olmuş glikoproteinlerdir. Temel olarak hücre dışı sinyalleri hücre içine iletebildikleri gibi hücre içinde oluşturulan sinyallerin hücre dışına iletilmesinden de sorumludurlar (Leitinger ve Hohenester, 2007).

İntegrinler, kovalent olmayan bağlarla bağlanmış, α ve β olmak üzere iki alt birimden meydana gelmiş heterodimer bir yapıya sahiptirler. Transmembran bir yapıya sahip olan moleküler düzeyde yapısal farklılıklar gösteren 18 α alt ünitesi ile 8 β alt ünitesinin kombinasyonları sonucu 24 farklı integrin reseptörü tespit edilmiştir (Leitinger ve Hohenester, 2007) (**Şekil 2**). Bu çeşitlilik, ekstraselüler ligantlara spesifik olarak bağlanmasını (Liu ve ark., 2000), ligant bağlanma aktivitesini ve değişik sinyal fonksiyonlarını tanımlamaktadır. Örneğin; insan barsak epitelinde yapılan integrin analizi sonucunda β_1 ve β_4 integrinlerinin çeşitleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$ integrinler ve barsak hücre farklılaşmasından sorumlu görünen $\alpha_6\beta_4$ 'ün fonksiyonel formu tespit edilmiştir (Lussier ve ark., 2000).

İntegrinlerin her bir alt ünitesi kısa sitoplazmik kısımlar ile hücre içi iskelet yapısına tutunur ve böylece heterodimer integrin molekülünün dıştan içe sinyal iletimini sağlar (Dzamba ve ark., 2001).



Şekil 2. İntegrin Reseptörleri (<http-2>)

Her bir α alt ünitesi yaklaşık olarak 1000-1150 amino asit içerir ve boyutu 140-210 kDa dur. Bütün integrinlerin α alt üniteleri 7 amino terminal ucu tekrarlanan katları içinde 7 ünite β -pervane motifi içermektedir. İkinci ve üçüncü ünitelerin tekrarlanan amino terminali arasında bazı α alt ünitelerinin etki alanları yer alır. α alt ünitelerin karboksil ucundaki yarılma disülfid bağı ile bağlanmıştır (Beaulieu, 1997).

β alt ünitesi ise yaklaşık olarak 730-800 amino asit içerir ve boyutu 90-130 kDa dur. β zincirinin ortasında dört kez tekrarlanan çözünmeyen sistein halkaları vardır. β_2 alt ünitesi lökosit hücrelerinin inflamatuvar bölgeye göçünü ve geçişini sağlar. İntegrin β_1 alt ünitesi hemen hemen bütün hücre tiplerinde eksprese edilmiştir ve 12 farklı α alt ünite ile kompleks oluşturur (Goessler ve ark., 2006).

Her iki α ve β alt ünitelerine +2 değerlikli katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2}) bağlanır ve bu katyonların rolü tam olarak bilinmemekle birlikte Mn^{+2} ve Mg^{+2} ve bazı integrinleri bağlayan antikörler da hücre içi sinyali almaksızın integrin aktivasyonu yapabildikleri gösterilmiştir (Kotovvori ve ark., 1999).

İntegrinlerin Fonksiyonları ve Aktivasyonu

İntegrinler; hücre büyümesi, çoğalması, morfolojik değişim, göç, invazyon, gen ekspresyonu, hücre içi pH değişimi ve hücre canlılığını düzenlemede intraselüler sinyal yollarını tetikleyerek ekstraselüler proteinlere (ESM) bağlanmaya aracılık ederler (Hood ve Cheresch, 2002). Ekstraselüler sinyalleri hücre içinde yer alan fokal adezyon kinaz (FAK) (Ilic ve ark., 1998), PI3-kinaz (Lee ve Juliano, 2000) ve MAPK (Howe ve ark., 1994) gibi sinyal proteinlerine aktararak hücre içi sinyal iletim mekanizmalarının uyarılmasına neden olurlar. İntegrinler hem gen ekspresyonuna yol gösteren çeşitli sinyal yollarını hem de adezyon moleküllerini düzenlerler (Lussier ve ark., 2000). Ayrıca integrinler (Clegg ve ark., 2000, Clegg ve ark., 2003) serebral korteksin oluşumunda, nöronal migrasyonunda ve nevroz sistemin gelişiminde önemli rol oynarlar (Milner ve Campbell, 2002).

Kolajen Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu

Embriyonik gelişim, doku regülasyonu ve onarımı, makro moleküllerin filtrasyonu, yara iyileşmesi ve tümör invazyonu gibi çeşitli biyolojik olaylarda rol alan bazal membran, ekstra-selüler matriks de ince ve şekilsizdir (Pasco ve ark., 2004). Bazal membranlar; kolajen XV, XVIII, XIX, fibulin distroglikan, kolajen IV, laminin, nidojen, heparin sülfat proteoglikan ve diğer glikoproteinlerden meydana gelmiştir (Olsen ve ark., 1973; Timple, 1989).

Kolajen proteinleri memelilerde çok miktarda bulunurlar ve dokuların biyokimyasal yapıları için önemlidirler. Ayrıca hücre adezyonu, taşınması, büyümesi, morfogenez ve yara iyileşmesinde önemli role sahiptirler. Bunun aksine insan kanser tiplerinin birçoğunda kolajen protein geninde mutasyon olduğu saptanmıştır (Myllyharju ve Kivirikko, 2004).

Kolajen molekülü α zinciri adı verilen üç polipeptit zincir içermektedir. Zincir üzerinde tekrar eden glisin-X-Y aminoasit dizileri yer almaktadır. Üç aynı veya farklı α zinciri, sağ-el üçlü sarmal oluşturmaktadır (Vitagliano ve ark., 2001; Brodskyl ve Persikov, 2005). İnsan genomunun 43 farklı kolajen α zinciri içerdiği bilinmektedir. Bu zincirler 28 kolajen türü oluşturmaktadırlar (Myllyharju ve Kivirikko, 2004; Veit ve ark., 2006)

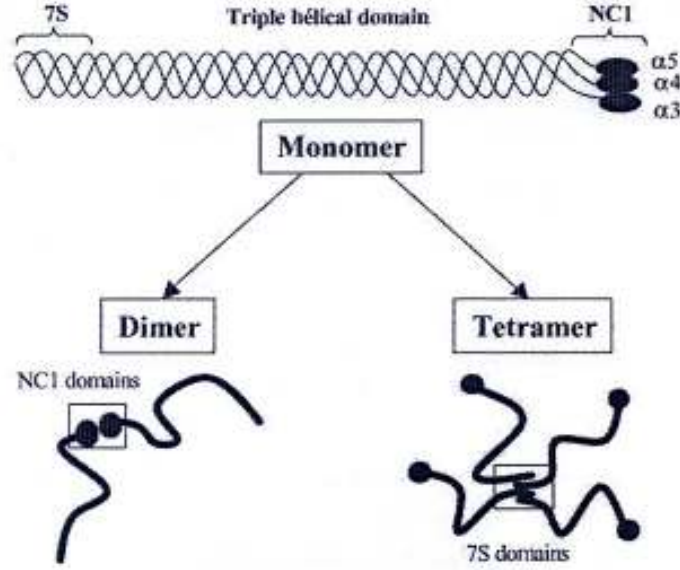
Hücreler doku içerisinde kolajen proteini yardımı ile bağlanır ve yaşam sinyali alırlar. Deri fibroblastları, kolajence zengin stromalarda göç ederler ve hastalıklarda (tümör oluşumu) veya yaralanmalarda kolajen ile birlikte çalışırlar (Leitinger ve Hohenester, 2007).

Kolajen tip IV

Kolajen tip IV; laminin, heparin sülfat ve kondroitin sülfat proteoglikanlar, entaktin ve nidogen ile beraber transmembran yapının büyük kısmını oluşturur (Timple ve Dziadek, 1986).

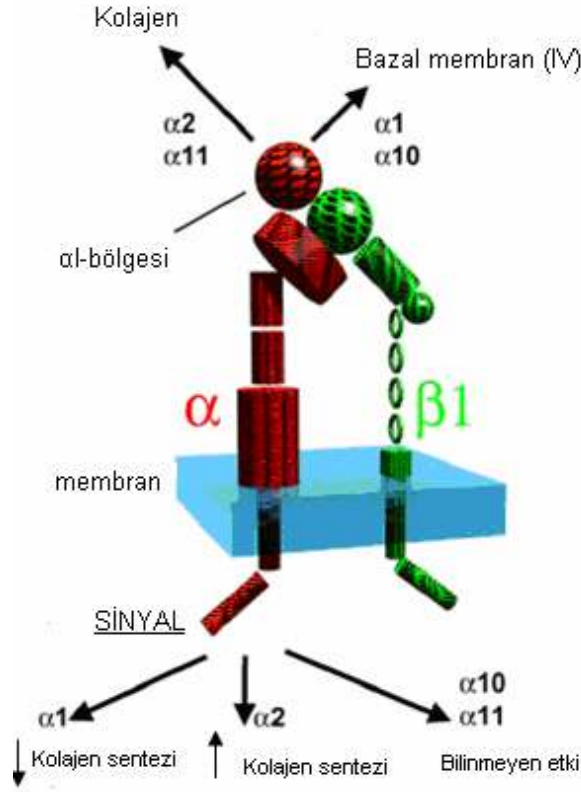
Kolajen tip IV molekülü genetik olarak 6 farklı (α_1 (IV)- α_6 (IV)) formda bulunan üç α -zincirinin heterodimerik kompozisyonu sonucu oluşmaktadır (Pasco ve ark., 2004). α -zincirleri glisin-X-Y tekrarları içerir ve zincirlerin farklı parçaları arasında korunmuş olan hidroksi ucunda 230 aminoasit kalıntısı içeren kısa non-kolagenous (NCI) alan ve 1400 aminoasit kalıntısı içeren uzun non-kolagenous alan bulunur. Tam trimerik

molekül yaklaşık 390 nm uzunluğundadır. Dimerler anti paralel ve paralel faza alternatif olarak düzenlenmiş, 7S alanlarının yan ilişkisi ile şekillenmiş tetradimerlerken, NC1 alanları arasındaki etkileşimler ile oluşturulabilir (**Şekil 3**) (Pasco ve ark., 2004). Majör kolajen tip IV zincirleri olan α_1 ve α_2 zincirler bazal membranda % 50 paya sahiptir. α_3 , α_4 , α_5 ve α_6 zincirler tamamlanmamış olarak bilinen kolajen tip IV moleküllerinde ve minör bazal komponentleridir (Kalluri ve Cosgrove, 2000; Borza ve ark., 2000).



Şekil 3. Kolajen Tip IV' ün Yapısı (Pasco ve ark., 2004)

Kolajen reseptörleri farklı kolajen tipleri ile spesifik olarak etkileşen integrinlerin alt ünitelerinin ayrılmasıyla meydana gelmiştir (Santoro ve Zutter, 1995; Hynes, 2002). Mezenşimal hücrelerde yaygın olarak bulunan $\alpha_1\beta_1$ ve epitel hücrelerde bulunan $\alpha_2\beta_1$ kolajen integrin reseptörleri en fazla çalışılan moleküllerdir (Kisiel ve ark., 2004; Leitinger ve Hohenester, 2007). Bu kolajen integrin reseptörlerinde yer alan I-bölgesi ligant bağlanmadan sorumlu 200 aminoasitten oluşmaktadır (Dickeson ve Santoro, 1998; Leitinger ve Hagg, 1999). Kolajen bağlayan integrinlerin yapısal fonksiyonları ile ilgili çalışmalarda iki önemli gelişme kaydedilmiştir. Bunlardan birincisi; izole edilmiş I bölgeleri, yapı analizi için kristalleştirilmiştir ve özelliklerini ve bağlanma şekillerini korudukları gözlenmiştir (Bahou ve ark., 1994; Kamata ve Takata, 1994). İkincisi; kolajenlerin üçlü sarmal bölgeleri içinde özel integrinlere bağlanma bölgelerinin varlığı belirlenmiştir. Örneğin, kolajen integrin reseptörleri $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_2\beta_1$ için çeşitli bağlanma sıraları bulunmuştur. Bunlardan biri GFOGER (Knight ve ark., 1998; Knight ve ark., 2000) dir. Üç sarmallı GFOGER peptitleriyle birleşmiş α_2 integrin I bölgesinin kristal yapısı belirlenmiştir (Emsley ve ark., 2000). I bölge, klasik α/β Rossman katlanmış kısımlarına bağlanır. Bu ilk kez lökosit integrin $\alpha_m\beta_1$ ' nin I bölge yapısında görülmüştür (Lee ve ark., 1995) (**Şekil 4**).



Şekil 4. Kolajenin İntegrine Bağlanması (White ve ark., 2004)

Çizelge 1. Memeli Kolajen Reseptörleri (Leitinger ve Hohenester, 2007)

	Reseptör Yapısı	Spesifik Kolajen	Seçilmiş Biyolojik Fonksiyon
$\alpha_1\beta_1$ İntegrin	Büyük α ve β alt ünitelerin heterodimerleri; α alt ünite I alanda MIDAS' a kolajen bağlanır	Tercihli olarak kolajen IV ve VI; kolajen I ve IV de spesifik alanlar tanımlanmıştır	Fibroblast proliferasyonu; MMP ekspresyonu ve kolajen sentezinin düzenlenmesi
$\alpha_2\beta_1$ İntegrin	Büyük α ve β alt ünitelerin heterodimerleri; α alt ünite I alanda MIDAS' a kolajen bağlanır	Tercihli olarak fibril formda kolajenler; kolajen I ve III' de spesifik alanlar tanımlanmıştır	Trombosit adezyonu; dallanma morfogenezi; mast hücre aktivasyonu; keratinosit adezyon
$\alpha_{10}\beta_1$ İntegrin	Büyük α ve β alt ünitelerin heterodimerleri; α alt ünite I alanda MIDAS' a kolajen bağlanır	Tercihli olarak kolajen IV ve VI; ayrıca kolajen II	Tabaka morfogenez büyümesi ve fonksiyonu

Kolajen proteinin üçlü sarmal bölgesinde integrine özgü bağlanma alanları belirlenmiştir. Örneğin; kolajen integrin reseptörü $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_2\beta_1$ 'de I bölge yapısı görülmüştür (Emsley ve ark., 2000). Kolajen, integrin reseptörüne bağlanmadan önce Mg^{+2} iyonu integrinde bulunan metal iyonu bağlanma alanına (MIDAS) bağlanır. Ancak bağlanacak iyonun koordinasyonu ligandsız integrinin MIDAS'ında tamamlanmamış olması nedeniyle integrinin I bölgesindeki GFOGER sırasının glutamat asit yan zinciri bu bağlanmaya izin vermektedir (Emsley ve ark., 2000). Metal iyonunun bağlanmasının iki belirteci, fenilalanin yan zincirini düzenleyen bir hidrofobik cep ve kolajen arijininin yan zinciri ile iyon çifti oluşturan I bölgesindeki aspartat asit kalıntısıdır (Letinger ve Hohenester, 2007).

Kolajen proteinin integrin MIDAS' a bağlanması integrin reseptöründe konformasyon değişikliğine neden olmaktadır (Letinger ve Hohenester, 2007). Yapı oluşumu değişiklikleri I bölgesinde ilerler ve I bölgesindeki C ucu α sarmalındaki büyük değişimlerin taşınması sağlar (Emsley ve ark., 2000). İntegrinin I bölgesine liganın bağlanma eğilimi integrin konfigürasyonu ile düzenlenir. Böylece, hücre içi ve dışı sinyaller ile aktifleşen kolajen bağlayan integrinler de uygun bağlanma alanları oluşturabilir (Letinger ve Hohenester, 2007).

Kolajen tip IV üzerindeki $\alpha_1\beta_1$ integrinin bağlantı bölgelerinin haritasında kolajen üçlü sarmalının farklı bölgeleri üzerinde aspartat asit ve arjinin kalıntıları bulunmaktadır (Eble ve ark., 1993). Bununla beraber, kolajenin integrine bağlanması ile başlayan hücre içi iletişim henüz açık değildir. Tek integrin heterodimerin konformasyon değişimi sinyalleşmeyi başlatıyor olabilir (Kim ve ark., 2003). İntegrin konsantrasyonunun fazla olması da sinyalleşme mekanizmasını temsil edebilir (Letinger ve Hohenester, 2007).

Kolajen proteini integrin reseptörleri $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_2\beta_1$ her ikisi de bir çok organın fizyolojisinde önemli roller oynarlar ve çeşitli hücre tiplerinden ekprese edilmişlerdir. Son zamanlarda bu reseptörler, anjiyojenezin inhibisyonu ile desteklenen yeni kanser terapilerinin merak konusudur (Kisiel ve ark., 2004). $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_2\beta_1$ integrinler hayvan modellerinde tümör büyümesi ve mikrovazküler endotel hücrelerinden yüksek derecede ekprese edilmiştir (Kisiel ve ark., 2004).

GEREÇLER

Kullanılan Maddeler

Kimyasal maddeler

%10 asetik asit çözeltisi, %95 metanol çözeltisi (Merck, Almanya), etidyum bromür, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), bovin serum albumin, puck's saline A (PSA), penisilin-streptomisin solüsyonu, glutamataldehit, tris-HCl, dimetilsülfoksit, yükleme çözeltisi, 2-propanol, sodyum klorür, kalsiyum klorür, magnezyum klorür, agaroz jel (Sigma, Almanya), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal sığır serumu (FCS) (Gibco, UK), glasiyel asetik asit (Riedel-de Haen, Almanya), tripan mavisi solüsyonu (Biochrom AG, Almanya), tripsin/ EDTA (Biological Industries, İsrail), apoptotik DNA-Ladder kit (Roche, Almanya), kristal mor (Sigma, USA).

Sarf malzemeler

Otoklavlanabilir cam şişe (Iso-Lab, Hollanda), 10,200 ve 1000 µl' lik pipet takımı ve uçları (Gilson, Fransa), 1000 µl' lik mikrosantrifüj tüpü (Eppendorf, Almanya), toma lamı (Marienfeld, Almanya), 25 ve 75 cm²' lik kültür şişeleri, 26 ve 96 kuyucuklu plakalar, 15 ve 50 ml' lik santrifüj tüpü (TPP, İsviçre), steril cam petri kapları (Corning, ABD).

Kullanılan Cihazlar

Yatay DNA jel ünitesi (Consdet, UK), güç kaynağı (Consdet E844, Belçika), DNA görüntüleme cihazı (Gel Logic 100, Kodak, EEC), eliza cihazı (Elx808-IU, Bio-Tek, USA), hassas terazi (Ohaus, ABD), invert mikroskop (Olympus, ABD), karbondioksit inhibitörü (Heraeus, Almanya), kuru hava sterilizatörü (Heraeus, Almanya), manyetik karıştırıcı (Heidolph, Almanya), mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya), megafuge 1.0/1.0R santrifüj (Heraeus, Almanya), otoklav (Hirayama), steril kabin (Holten, İngiltere), etüv (Nüve, Türkiye), otoklav (Hirayama, Japonya).

YÖNTEMLER

Hücre Kültürü ve Bileşiklerin Hazırlanması

Sıçan embriyo fibroblast 5RP7 (H-ras onkogeni transform hücreler) (Garbisa ve ark., 1987) hücreleri % 10 FCS, 100 ünite/ml penisilin-streptomisin, %1 glutamin içeren DMEM içerisinde 37 °C' de kültürde tutulmuşlardır. Her 2 günde bir hücreler, tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürlere ayrılmışlardır.

Hücreler deneye alınmadan önce, hücre sayısı toma lam ile belirlenerek deney koşullarına uygun ortamlara ekildikten sonra 24 saat % 5 CO₂ içeren atmosfer ortamında inkübe edilmişlerdir.

Tripan Mavisi ile Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

% 10 FCS içerisinde 8 farklı dilüsyonları (625x10³, 125x10³, 25x10³, 5x10³, 1x10³, 5x10², 250, 125) hazırlanarak 24'lük plakalara ekilen hücreler 24, 48 ve 72 saat 37 °C, %5 CO₂ atmosferinde inkübe edildikten sonra 50µl alınarak eşit miktarda tripan mavisi

boya solüsyonuna (% 0.5 w/v) eklenmiştir. Hücre-boya karışımı 2 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra ışık mikroskopunda 40X büyüteç altında renksiz canlı hücreler ve mavi renkli ölü hücreler sayılmıştır. Her bir deney bağımsız olarak iki kez tekrar edilmiştir (Hayashi ve ark., 1990).

Kristal Mor Ölçümü

96 kuyulu hücre kültürü plakalarının her bir kuyusu, PBS çözeltisi içerisinde 7 farklı dilüsyon (2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml) halinde hazırlanmış kolajen tip VI protein ile +4°C’ de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün, kuyucuklar % 1 BSA ile 1 saat 37 °C inkübe edildikten sonra $12,5 \times 10^4$ hücre/ml süspansiyon haline getirilerek 50µl hücre süspansiyonu plakanın her kuyucuğuna aktarılıp 2 saat 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Ardından her bir kuyucuk %10 FCS ile doldurulup tutunamayan hücreler temizlenip, tutunan hücreler % 1 glutaraldehit ile 15 dakika süreyle sabitlenmiştir. Sabitlenen hücreler 2 kez 100µl PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 50 µl % 0.1 kristal mor boya eklenmiştir ve 3 saat 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, kuyucuklar 5 kez PBS çözeltisi ile yıkanmıştır ve her bir kuyucuğa 35 µl % 10 asetik asit çözeltisi eklenip 15 dakika 37 °C’ de inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemler sonunda oluşan boya miktarı Elx808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon deney içerisinde 4 farklı kuyucukta tekrarlanmıştır (Dillon ve ark., 1994).

MTT Ölçümü

96 kuyulu hücre kültürü plakaların her kuyucuğu 100 µl Ca^{+2} içeren tris tampon tuz çözeltisi (TBS) içerisinde 7 farklı dilüsyonu (2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml) hazırlanan kolajen tip IV ile +4 °C’ de bir gece kaplanmıştır. % 2 BSA ile 1 saat 37 °C’ de inkübe edildikten sonra % 0.1 BSA ile kuyucuklar iki kez yıkanmıştır. Ardından 12.5×10^4 hücre/ml hücre Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren DMEM içerisinde süspansiyon haline getirilerek, 50µl hücre süspansiyonu plakanın her kuyucuğuna aktarılıp 1 saat 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda yüzeye tutunamayan hücreler, Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren TBS çözeltisi ile uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 50 µg/ml MTT eklendikten sonra hücreler 37 °C’ de 4 saat inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 100 µl DMSO eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve renk değişimi, Elx808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir konsantrasyon deney içerisinde 4 farklı kuyuda tekrarlanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu ve Elektroforetik Analizi

DNA ekstraksiyonu

Steril petriyerler, kolajen tip IV (10 µg/ml) ve poly-L-lizin (5 µg/ml) ile +4 °C’ de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün % 2 BSA ile 1 saat 37 °C de inkübe edilen petriyerler daha sonra % 0.1 BSA ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler tripsinle muamele edilerek DMEM ile 2 kez yıkandıktan sonra 2 mM Ca^{+2} ve 0.5 mM Mg^{+2} içeren DMEM içerisinde süspanse edilip, toma lamı ile sayılmışlardır. 1×10^6 hücre/ml protein ile kaplı petri kaplarına aktarılmıştır ve 37 °C’ de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücreler tripsin ile toplanarak 1.5 ml’ lik ependorf tüplere aktarılıp üzerine 200 µl PBS eklenmiştir. Apoptotik DNA-ladder kitin (Roche) prosedürüne uygun olarak hücre

DNA' ları izole edilmiştir. Her bir tüpe 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek, 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiş ve altta toplanan sıvı atılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmış ve son santrifüj işleminden sonra alttaki sıvı dökülmeden 13000 rpm' de 8 saniye santrifüj edilmiştir. Böylelikle ekstre edilen DNA' lar filtreli tüpte toplanmıştır.

Elektroforetik analiz

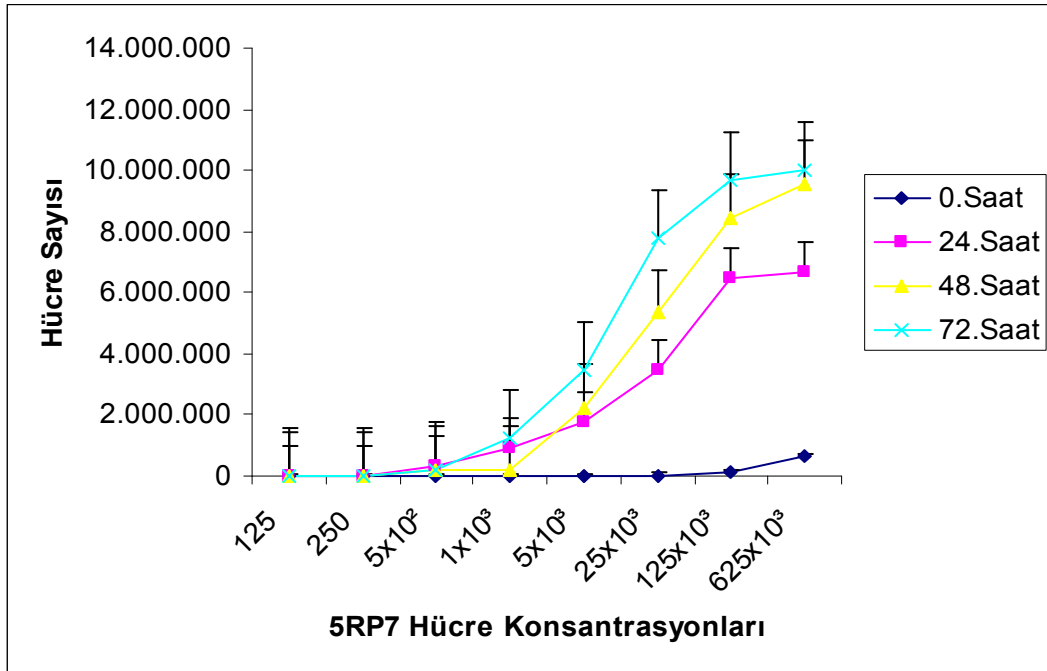
İzole edilen DNA örnekleri veya pozitif kontrol hücre DNA ile 5 µl yükleme çözeltisi (Sigma) karıştırılarak % 1.2' lik agaroz jel üzerine yüklenmiştir. 30 V' da 1.5 saat jel yürütülmüştür.

Yürütme işleminin ardından jel üniteden alınarak DNA görüntüleme cihazında (EL Logic 100, Kodak) görüntülenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

5RP7 H-ras Aktif Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

5RP7 hücrelerinin zamana bağlı büyüme oranı tripan mavi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Bozulan hücre zar yapısı sonucu ölü hücreler boyayı içeri almakta ve mavi renge boyanmaktadır. Canlı ve ölü hücrelerin mikroskop altında sayımı sonucu büyüme oranı tespit edilmektedir. Farklı hücre konsantrasyonları (625×10^3 , 125×10^3 , 25×10^3 , 5×10^3 , 1×10^3 , 5×10^2 , 250 ve 125 /ml) 24 kuyulu plakalara ekilerek 24, 48 ve 72 saat 37°C ' de inkübe edilmişlerdir. Her bir zaman aralığının sonunda, eşit miktarlarda hücre solüsyonu ile tripan mavi boyası karıştırılarak toma lamda sayım gerçekleştirilmiştir.

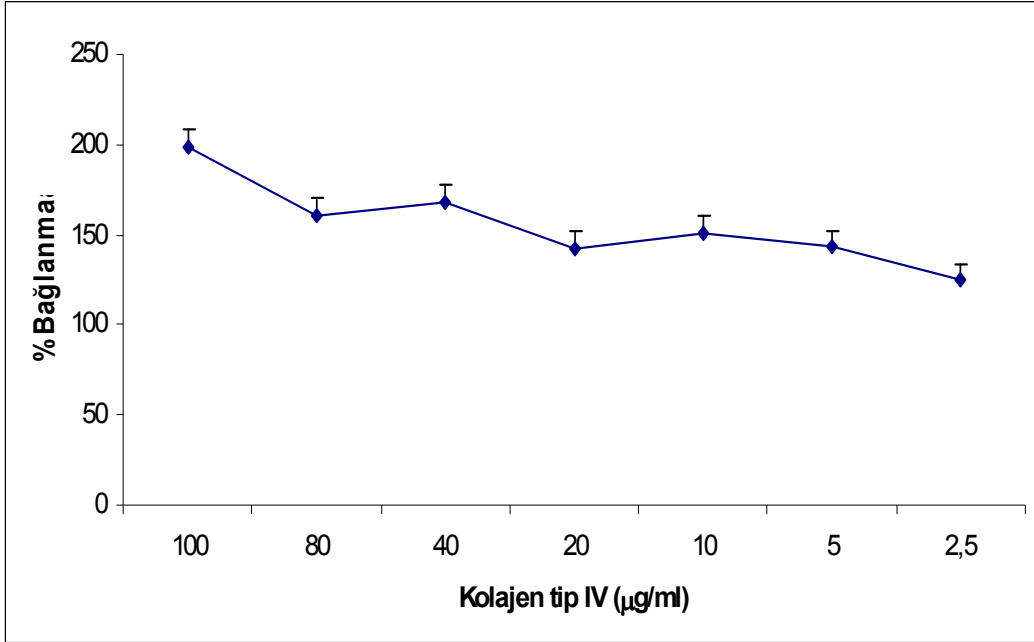


Şekil 5. 5RP7 Hücre Büyüme Eğrisi. 625×10^3 , 125×10^3 , 25×10^3 , 5×10^3 , 1×10^3 , 5×10^2 , 250 ve 125 olarak hazırlanan hücreler 24 kuyulu plakalara ekim yapılarak 24, 48 ve 72 saat 37°C ' de inkübe edilmişlerdir. Tripsinle muamele edilen hücreler 1:1 oranda tripan mavisi ile boyanarak toma lamda sayılmıştır. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir (n=6) ve her bir deneyde örnekler üç kez sayılmıştır

Şekil 5' de görüldüğü üzere, 125 ve 250 hücre konulan kuyularda hücre çoğalması gözlenmemiştir. Bu kuyularda hücre sayısı/yüzey oranı yüksek olduğundan hücreler arası haberleşme gerçekleşmemiştir ve buna bağlı olarak da çoğalma gözlenememiştir. Fakat hücre konsantrasyonunu 125×10^3 ' e kadar kademeli olarak arttırdığımızda, hücrelerin büyüme oranlarında zamana bağlı olarak bir artış gözlenmiştir. Hücre sayısı 625×10^3 /ml olarak ekim yapıldığında ise, hücrelerin üst üste tabaka halinde çoğaldığı gözlenmiştir. 48 saat sonunda yapılan ölçüm sonucunda, bu konsantrasyonundaki hücrelerin sayısında artış tespit edilmiştir (Şekil 5).

5RP7 Hücrelerinin Kolajen Tip IV Proteinine Bağlanma Oranlarının MTT ile Belirlenmesi

Ca⁺² (2mM) ile zenginleştirilmiş TBS solüsyonu içerisinde farklı dilüsyonlarda hazırlanan kolajen tip IV proteini, (2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml) 96 kuyulu plakalara aktararak +4 °C' de bir gece inkübe edilmiştir. %2 BSA ile yapılan bloklama işleminden sonra, her bir kuyuya 12.5x10⁴ hücre/ml ekim yapılarak, bağlanmanın gerçekleşmesi için 4 saat 37 °C' de hücreler muhafaza edilmişlerdir. Bu süre sonunda, MTT boyası eklenerek, kolajen tip IV proteinine bağlanan 5RP7 hücre oranı hesaplanarak elde edilen sayısal veriler % olarak Şekil 6'da görüldüğü üzere grafiğe aktarılmıştır. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondri içinde gerçekleşen bir reaksiyon ile renkli ve suda çözünmeyen formazan tuzuna indirgenen bir bileşiktir (Alley ve ark., 1988). Hücrelerin MTT boyasını indirgeme özellikleri hem hücre canlılığı hem de bağlanma yetenekleri ile ilişkilendirilebilir ve MTT boyasının yoğunluğu bu iki hücre özelliği ile korelasyon göstermektedir (Abe ve ark., 2000).



Şekil 6. MTT Yöntemi ile 5RP7 Hücrelerinin Kolajen tip IV' e Bağlanma Oranının Tespiti. 96 kuyulu plakaların her bir kuyucuğu farklı konsantrasyonlardaki (100, 80, 40, 20, 10, 5 ve 2.5 µg/ml) kolajen tip IV ile +4°C' de bir gece kaplanmıştır. Her bir kuyuya 12.5x10⁴ hücre/ml hücre ekim yapıldıktan sonra bağlanma oranı ELISA (Elx808-IU) ile 540 nm' de ölçülmüştür. Her bir veri noktası iki bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir (n=6)

5RP7 kanser hücrelerinin kolajen tip IV proteinine bağlanma oranının konsantrasyona bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. 100 µg/ml kolajen tip IV proteini ile kaplı yüzeye 5RP7 hücrelerinin en yüksek oranda (%198) bağlandığı tespit edilmiştir. Protein konsantrasyonu 80, 20, 5 ve 2.5 µg/ml düşürüldüğünde ise, hücre bağlanma oranında sırasıyla % 160, 142, 141 ve 125 olarak lineer bir azalma gözlenmiştir. Ancak 40 ve 10 µg/ml kolajen tip IV protein konsantrasyon uygulamasında yüksek protein konsantrasyonlarına kıyasla bağlanma oranında azalma bulunmamaktadır.

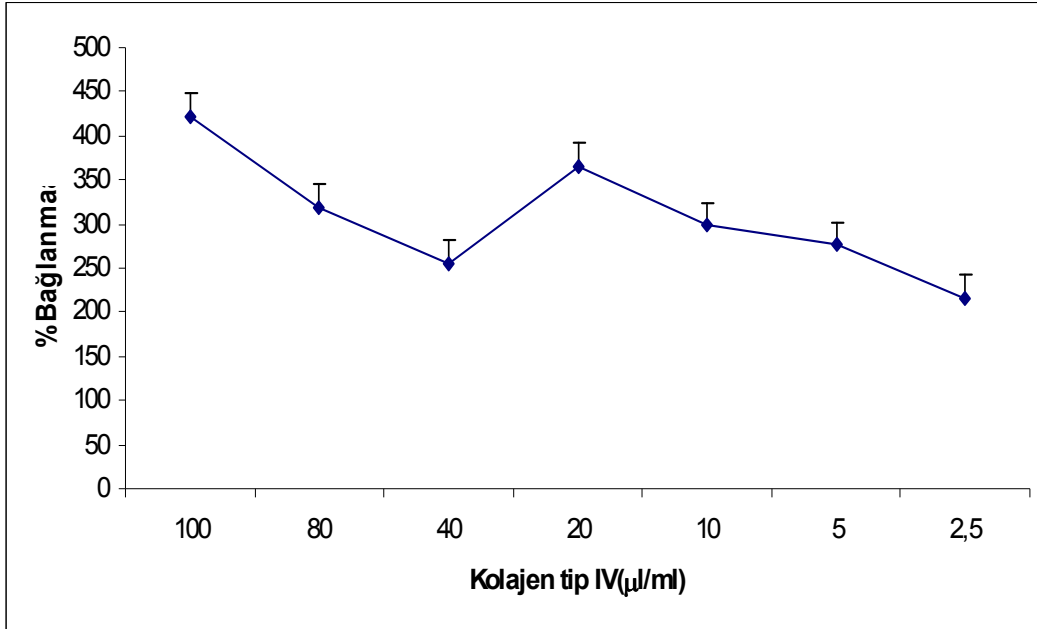
5RP7 kanserli hücreleri 100 µg/ml kolajen tip IV proteinine % 198 oranında bağlanma göstermiştir. Bu bağlanma sırasında özellikle $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ ve $\alpha_3\beta_1$ integrinlerinin aktive olduğu düşünülmektedir.

Literatürde yer alan çalışmalarda, kolajen tip IV' e bağlanma konsantrasyonlarının hücre tipine göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. 50 µg/ml kolajen tip IV' e ovaryum karsinoma hücresi (NIH:OVCAR5) % 80 (Casey ve ark., 2001) oranında, insan nöroblastoma hücresi (SK-N-SH) ise % 45 (Tzinia ve ark., 2002) oranında bağlandığı belirtilmiştir. 25 µg/ml kolajen tip IV' e hepatom hücresi (KYN-3) kontrol hücresine göre yaklaşık % 350 oranında bağlandığı gösterilmiştir (Torimura ve ark., 2001). 20 µg/ml kolajen tip IV' e 4T1 fare epitel hücresi % 20 (Sloan ve ark., 2006) ve insan mezenşimal stem hücresi (HMSC) kontrol hücresine oranla yaklaşık 6-8 kat daha fazla (Salasznyk ve ark., 2003) bağlanma gösterdiği tespit edilmiştir. 5 µg/ml kolajen tip IV' e insan adenosarkoma hücresi (HT-9) %69 (Gout ve ark., 2001) oranında ve B16 fare melanoma hücresi yaklaşık % 85 (Vollmers ve ark., 1984) oranında bağlanma gösterdiği tespit edilmiştir. İnsan göbek bağı endotel hücresi (HUVEC) 10 µg/ml kolajen tip IV' e % 50 oranında, 20 µg/ml kolajen tip IV' e ise yaklaşık % 80 oranında bağlandığı gösterilmiştir (Sheu ve ark., 1997).

5RP7 Hücrelerinin Kolajen Tip IV Proteinine Bağlanma Oranlarının Kristal Mor Boyası ile Belirlenmesi

MTT boyama metodu ile bulunan 5RP7 hücrelerinin kolajen tip IV proteinine bağlanma oranı, kristal mor boyama yöntemi ile de tespit edilerek, sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi, kolajen tip IV ile kaplı plakalara 12.5×10^4 hücre/ml hücre ekim yapılarak 2 saat 37°C ' de inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda kristal mor ile boyanan hücreler, ELİSA (Elx808-IU) okuyucuda 540 nm' de ölçüme alınmıştır. Herhangi bir proteinle muamele edilmemiş plakalara ekilen hücreler ise, kontrol hücreleri olarak değerlendirmeye alınmıştır. Bu hücrelerin bağlanma oranı % 100 olarak tespit edilmiştir.

5RP7 hücrelerinin, 100 $\mu\text{g/ml}$ kolajen tip IV proteinine en yüksek oranda (% 420) bağlanma göstermiştir. Diğer protein konsantrasyonlarında ise dalgalanma ile birlikte hücre bağlanma oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Kristal Mor Yöntemi ile 5RP7 Hücrelerinin Kolajen Tip IV' e Bağlanma Tespiti. Farklı kolajen tip IV dilüsyonları (100, 80, 40, 20, 10, 5 ve 2.5 $\mu\text{g/ml}$) ile 96 kuyulu plakaların her bir kuyucuğu bir gece $+4^\circ\text{C}$ ' de kaplanmıştır. 12.5×10^4 hücre her bir kuyuya ekim yapıldıktan sonra % 0.1 kristal mor boyası ile % hücre bağlanması tespit edilmiştir. Her bir veri iki bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir (n=6)

Her iki yöntemle elde edilen 5RP7 bağlanma oranlarının birbirini destekleyici nitelikte olduğu fakat kristal mor boyasının daha hassas sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

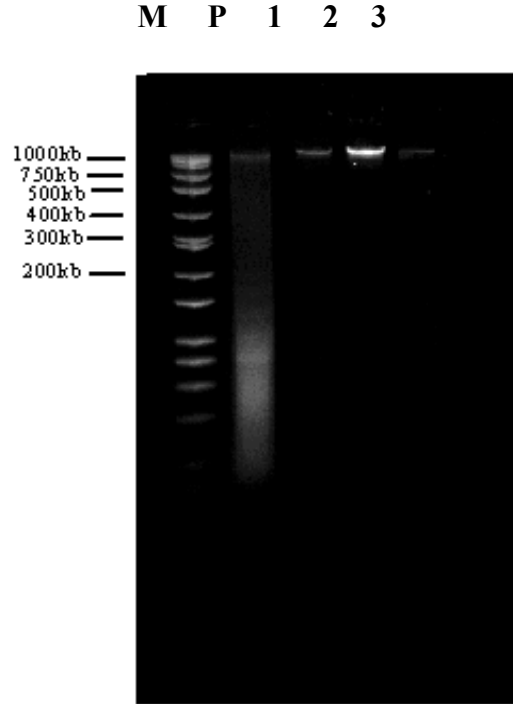
Litaratürde yer alan çalışmalarda, kolajen tip IV' e bağlanma konsantrasyonlarının hücre tipine bağlı olarak farklılık gösterdiği belirtilmiştir. C6 glioma hücrelerinin (De Aguior ve ark., 2005) 10 $\mu\text{g/ml}$ kolajen tip IV en yüksek oranda bağlandığı belirtilmiştir. Benzer şekilde, CHO (Chirese hanster ovary) ve insan monosit lösemi hücre tipinde 20-10 $\mu\text{g/ml}$ kolajen tip IV' e yüksek oranda adezyon gösterdiği bulunmuştur (Li ve ark., 1999).

Kolajen Tip IV' ün Apoptotik Özelliği

Kolajen tip IV ve poly-L-lizin ile 24 saat kaplanan petrilere 5RP7 hücreleri ekim yapıldıktan sonra 2 saat 37 °C' de inkübasyona tabi tutuldular. Deney ve kontrol hücrelerinden izole edilen genomik DNA' lar (Apoptotik DNA ladder kit, Roche) 1,5 saat 30V akım ile %1,2' lik agoroz jel de yürütme işlemi yapılmıştır ve bu jel DNA görüntüleme cihazı (Kodak) ile görüntülenmiştir (Şekil 8).

Agaroz jel elektroforezi, DNA fragmentasyonundan sonra DNA kırıklarının gösterilmesi ile apoptozun belirlendiği biyokimyasal bir yöntemdir. Apoptotik DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü 'ladder pattern' oluşur ve bu bulgu apoptozun karakteristik özelliğidir (Wyllie, 1993).

Yapılan bu çalışmada, kolajen tip IV' e bağlanan hücreler toplanarak genomik DNA' larının agaroz jelde yürütülmesi sonucu, kolajen tip IV' ün 5RP7 H-ras aktif hücre DNA' sı üzerinde apoptotik etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 8. Kolajen IV' e Bağlı 5RP7 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi. Kolajen tip IV ve poly-L-Lizin üzerinde 2 saat inkübe edilmiş 5RP7 ve kontrol hücrelerinin DNA' ları Apoptotik DNA Ladder Kit ile izole edilmiştir. İzole edilen DNA' lar 1,5 saat süreyle % 1,2' lik agoroz jel de 30 V akım ile yürütülmüş ve bu süre sonunda DNA görüntüleme cihazı ile DNA görüntülenmiştir. M: DNA Marker , P: Pozitif Kontrol, 1: 1000 kb Poly-L-Lizin ile kaplı yüzey + 5RP7 Hücreleri, 2: 1000 kb Kolajen Tip IV ile kaplı Yüzey + 5RP7 Hücreleri, 3: 1000 kb 5RP7 Hücreleri

5RP7 hücreleri kolajen tip IV ile kaplı yüzeye bağlanmış ve canlılıklarını sürdürerek apoptoza gitmemiştir. Dolayısıyla sadece apoptoza giden hücrelerin DNA'larının oluşturduğu merdiven görüntüsü gözlenmemiştir, canlı hücrelerin DNA ları tek bant şeklinde gözlenmiştir. Aynı şekilde poly-L-Lizine de hücreler bağlanmış ve DNA merdiven görüntüsü vermemiştir.

Apoptotik DNA görüntüsünün belirteci olan 180 kb'lık DNA şekli apoptatik DNA'nın belirtecidir. **Şekil 8'** de de görüldüğü gibi apoptotik DNA belirteci görüntüsüne paralel olarak bir görüntü elde edilememiş, kolajen tip IV, poly-L-lizin kaplı yüzey + hücrelerinin apoptoza gitmediği gösterilmiştir.

Bu sonuca göre iki farklı yöntemle yapılan bağlanma deneyleri ile kolajene güçlü bir şekilde bağlandığı tespit edilen 5RP7 hücrelerinin bu kez de kolajene bağlanan bu hücrelerin canlılıklarını sürdürerek apoptoza gitmedikleri tespit edilmiştir.

Genel olarak, *H-ras'*ın integrin matriks proteinlerine bağlanma olaylarında ve hücre intiharı başlatılmasında rol alabileceği gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 2002).

Aynı şekilde kolajen tip IV ile kaplı yüzeyde, fakat 8701-BC (DIC-derived cell line) hücreleri ile yapılan apoptoz belirlenme deneyinde apoptatik DNA değeri 512 bp olarak tesbit edilmiştir (Pucci-Minafra ve ark., 2000).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında sonuç olarak, 5RP7 hücrelerinin kolajen kaplı yüzeye oldukça iyi bağlandığı iki farklı yöntemle gösterilmiştir. Kristal violet mor yönteminde, 100 µg/ml kolajen tip IV proteinine 5RP7 hücreleri en yüksek oranda (% 420) bağlanma göstermiştir. MTT yönteminde ise 100 µg/ml kolajen tip IV proteini ile kaplı yüzeye 5RP7 hücrelerinin en yüksek oranda (% 198) bağlandığı tespit edilmiştir. Protein konsantrasyonu 80, 20, 5 ve 2.5 µg/ml düşürüldüğünde MTT ve kristal mor yöntemlerinde, hücre bağlanma oranında olarak lineer bir azalma gözlenmiştir. Bunun paralelinde kolajen tip IV proteinine bağlanan hücrelerin apoptoza gitmeyerek canlılıklarını sürdürdükleri agoroz jel elektroforez yöntemi ile gösterilmiştir.

Bu bulgular ışığında, 5RP7 hücrelerinin kolajen tip IV proteinine bağlanması sırasında aktive olduğu düşünülen $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ ve $\alpha_3\beta_1$ integrinlerin profillerinin ve bağlanma oranlarının belirlenmesi ve daha sonra bu bağlanmanın bloke edilerek 5RP7 hücrelerinin invazyonunun önlenip önlenemeyeceği konusunun deneysel olarak araştırılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, K., Matsuki, N., Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT, *Neurosci Res.*, 38 (1), 325-329 (2000).
- Adams, J.M., Cory, S., The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 281, 1322-1325 (1998).
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.N., Boyd, M.R., Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.*, 48 (1), 589-601 (1988).
- Arends, M.J., Wyllie, A.H., Apoptosis: mechanisms and roles in pathology, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 32, 223-54, (1991).
- Bahou, W.F., Potter, C.L., Mirza, H., The VLA-2 ($\alpha_2\beta_1$) I domain functions as a ligand-specific recognition sequence for endothelial cell attachment and spreading: molecular and functional characterization, *Blood*, 84 (1), 3734-3741 (1994).
- Bao, Q., Shi, Y., Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases, *Cell Death Differ.*, 14 (1), 56-62 (2007).
- Basu, A., Sivoprasad, U., Protein kinase C ϵ makes the life and death decision, *Cell Sig.*, 19 (8), 1633-1642 (2007).
- Beaulieu, J.F., Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation, *Prog. Histochem. Cytochem.*, 31 (1), 1-78 (1997).
- Blalock W.L., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: Identification of an Achilles heel in leukemia, *Leukemia*, 17 (6), 1058-1067 (2003).
- Borza, D.B., Netzer, K.O., Leinonen, A., The goodpasture autoantigen identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3 (IV) collagen chain, *J. Biol. Chem.*, 275 (8), 6030-6037 (2000).
- Bos, J.L. , *Ras* oncogenes in human cancer, *Cancer Res.*, 49 (6) , 4682-4689 (1989).
- Brodsky, B., Persikov, A.V., Molecular structure of the collagen triple helix, *Adv. Protein Chem.*, 70, 301-339 (2005).
- Casey, R.C., Burlison, K.M., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema, Ruff, L.E., Skubitz, A.P.N., β_1 -Integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids, *Am. J. Pathol.*, 159 (6), 2070-2080 (2001).
- Chen, C.A., Tsai, J.C., Su, P.W., Lai, Y.H., Chen, H.C., Signaling and regulatory mechanisms of integrin $\alpha_3\beta_1$ on the apoptosis of cultured rat podocytes, *J. Lab. Clin. Med.*, 147 (6), 274-280 (2006).

- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner, J.W., Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G.D., DePinho, R.A., Essential role for oncogenic ras in tumour maintenance, *Nature*, 400 (6743), 468-472 (1999).
- Clegg, D.O., Mullick, L.H., Wingerd, K.L., Lin, H., Atienza, J.W., Brodshow, A.D., Gervin, D.B., Cann, G.M., Adhesive events in retinal development and function: the role of integrin receptors, *Results Probl. Cell Differ.*, 31, 141-156 (2000).
- Clegg, D.O., Wingerd, K.L., Hikita, S.T., Tolhurst, E.C., Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system, *Front. Biosci.*, 8, 723-750 (2003).
- Daum, G., Eisenmann-Tappel, H.W., Troppmair, J., Rapp, U.R., The ins and outs of Raf kinases, *Trends Biochem. Sci.*, 19 (11), 474-480 (1994).
- De Aguiar, C.B.M.N., Lobão-Soares, B., Alvarez-Silva, M., Trentin, A.G., Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration, *BMC Cell Biology*, 6, 31-39 (2005).
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases, *Nature*, 388 (6639), 300-304 (1997).
- Doğan, A.L., Güç, D., Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42 (2004).
- Downward, J., Targetting ras signalling pathways in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 3 (1), 11-22 (2003).
- Dickeson, S.K., Santoro, S.A., Ligand recognition by the I domain-containing integrins, *Cell Mol. Life Sci.*, 54 (6), 556-566 (1998).
- Dillon, P.W., Keefer, K., Blackburn, J.H., Houghton, P.E., Krummel, T.M., The extracellular matrix of the fetal wound: hyaluronic acid controls lymphocyte adhesion, *J. Surg. Res.*, 54 (1), 170-173 (1994).
- Dual, E., Wyllie, A.H., Death and the cell, *Immunol., Today*, 7 (4), 115-119 (1986).
- Dzamba, B.J., Bolton, M.A., Desimone, D.W., *Frontiers in molecular biology: cell adhesion*, New York, 104-105 (2001).
- Eble, J.A., Golbik, R., Mann, K., Kuhn, K., The $\alpha_1\beta_1$ integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule $[\alpha_1(IV)]_2\alpha_2(IV)$, *EMBO J.*, 12 (12), 4795-4802 (1993).
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Liddington, R.C., Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha_2\beta_1$, *Cell*, 101 (1), 47-56 (2000).
- Feig, L.A., Buchsbaum, R.J., Cell signaling: Life or death decisions of ras proteins, *Current Biology.*, 12 (7), 259-261 (2002).
- Flierman, R., Daha, M.R., The clearance of apoptotic cells by complement, *Immunobiology*, 212 (5), 363-370 (2007).

- Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R.J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R.H., Khoury, G., Liotta, L.A., Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with *c-HA-ras* but not *c-HA-ras* plus *ad2-ela*, *Cancer Res.*, 47 (6), 1523-1528 (1987).
- Goessler, U.R., Bugert, P., Bieback, K., Sadick, H., Baisch, A., Hormann, K., Riedel, F., Germany, M., In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes, *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 134 (3), 510-515 (2006).
- Gout, S.P., Jacquier-Sarlin, M.R., Rouard-Talbot, L., Rousselle, P., Block, M.R., RhoA-dependent switch between $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation, *Mol. Biol. Cell*, 12, 3268–3281 (2001).
- Hand, P.H., Vilasi, V., Thor, A., Ohuchi, N., Schlam, J., Quantitation of Harvey ras p21-enhanced expression in human breast and colon carcinoma, *J. Nat. Cancer Inst.*, 79 (1), 59-65 (1987).
- Hayashi, K., Hayashi, T., Morita, N., Niwayama, S., Antiviral activity of an *cordia salicifolia* on herpes simplex virus type I, *Planta Med.*, 56, 439-443 (1990).
- Hood, J.D., Cheresch, D.A., Role of integrins in cell invasion and migration, *Nat. Rev. Cancer*, 2 (2), 91-100 (2002).
- Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K., Juliano, R.L., Integrin signaling and cell growth control, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10 (2), 220-231 (1998).
- http-1** Apoptosis Ders Notları, www20.uludag.edu.tr/~eulukaya (11.04.2003).
- http-2** The integrin family, www.chuv.ch/cpo_research/integrins.html
- Hu, R., Zhai, Q., Liu, W., Liu, X., An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: Roles of Bcl-2 family proteins, caspase, calcium dependent proteases and protein kinase C, *J. Cell Biochem.*, 81 (4), 583-593 (2001).
- Hynes, R.O., Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell*, 110 (6), 673-687 (2002).
- Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S., Damsky, C.H., Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis, *J. Cell Biol.*, 143 (2), 547-560 (1998).
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French L.E., Tschopp, J., Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP, *Nature*, 388 (6638), 190-195 (1997).
- Kalluri, R., Cosgrove, D., Assembly of type IV collagen insights from alpha3 (IV) collagen-deficient mice, *J. Biol. Chem.*, 275 (17), 12719-12724 (2000).
- Kamata, T., Takata, Y., Direct binding of collagen to the I domain of integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner, *J. Biol. Chem.*, 269, 26006-26010 (1994).

- Kang, H.M., Lee, S.K., Shin, D.S., Lee, M.Y., Han, D.C., Baek, N.I., Son, K.H., Kwon, B.M., Dehydrotrametenolic acid selectively inhibits the growth of H-*ras* transformed rat2 cells and induces apoptosis through caspase-3 pathway, *Life Sci.*, 78 (6), 607-613 (2006).
- Karp, J.E., Lancet, J.E., Kaufmann, S.H., End, D.W., Wright, J.J., Bol, K., Horak, I., Tidwell, M.L., Liesveld, J., Ange, D., Buddhharaju, L., Gojo, I., Highsmith, W.E., Belly, R.T., Hohl, R.J., Rybak, M.E., Thibault, A., Rosenbalt, J., Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: A phase I clinical-laboratory correlative trial, *Blood*, 97 (11), 3361-3369 (2001).
- Kauffman, Z.A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., Evan, G., Suppression of c-myc-induced apoptosis by *ras* signaling through PI(3)K and PKB, *Nature*, 385, 544-548 (1997).
- Kerkhoff, E., Ropp, U.R., Cell cycle targets of Ras/Raf signalling, *Oncogene*, 17 (11), 1457-1462 (1998).
- Kim, H.S., Kim, J.W., Gang, J., Wen, J., Koh, S.S., Koh, J.S., Chung, H.H., Song, S.Y., The farnesyltransferase inhibitor LB42708 inhibits growth and induces apoptosis irreversibly in H-*ras* and K-*ras* transformed rat intestinal epithelial cells, *Toxicol. App. Pharmacol.*, 215 (3), 317-329 (2006).
- Kim, M., Carman, C.V., Springer, T.A., Bidirectional Transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins, *Science*, 301 (5640), 1720-1725 (2003).
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Saytoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, *EMBO J.*, 14 (22), 5579-5588 (1995).
- Kisiel, D.G., Calvete, J.J., Katzhendler, J., Fertala, A., Lanzarovic, P., Marcinkiewicz, C., Structural determinants of the selectivity of KTS-disintegrins for the $\alpha_1\beta_1$ integrin, *FEBS Lett.*, 577 (3), 478-482 (2004).
- Kjoller, L., Engelholm, L.H., Hoyer-Hansen, M., Dano, K., Bugge, T.H., Behrendt, N., uPARAP/endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV, *Exp. Cell Res.*, 293, 106-116 (2004).
- Klug, S.W., Cummings, M.R., Concepts of genetics, 6th Edition, Printice Hall, Oxford, 2000.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Messent, A.J., Smethurst, P.A., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Identification in collagen type I of an integrin $\alpha_2\beta_1$ -binding site containing an essential GER sequence, *J. Biol. Chem.*, 273, 33287-33294 (1998).
- Knight, C.G., Morton, L.F., Peachey, A.R., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., Barnes, M.J., The collagen-binding A-domains of integrins $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens, *J. Biol. Chem.*, 275, 35-40 (2000).

- Kolch, W., Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem J.*, 351 (2), 289-305 (2000).
- Kotovvari, A., Pessa-Morikava, T., Kotovari, P., Nortomo, P., Gahmber, C.G., ICAM-2 and a peptide from its binding domain are efficient activators of leukocyte adhesion and intergrin affinity, *J. Immunol.*, 162, 6613-6620 (1999).
- Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C., Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi, *Solunum*, 5 (3), 127-138 (2003).
- Kriaris, H., Spandidos, D., Mutations of *ras* genes in human tumors, *Int. J. Oncol.*, 7, 413-421 (1995).
- Kumar, S., Caspase function in programmed cell death, *Cell Death Differ.*, 14, 32-43 (2006).
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., Liddington, R., Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR (CD11b/CD18), *Cell*, 80, 631-638 (1995).
- Lee, J.T., McCubrey, J.A., The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia, *Leukemia*, 16 (4), 486-507 (2002).
- Lee, J.W., Juliano, R.L., Alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway, *Mol. Biol. Cell*, 11 (6), 1973-1987 (2000).
- Leevers, S.J., Paterson, H.F., Marshall, C.J., Requirement for *Ras* in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane, *Nature*, 369 (6479), 411-414 (1994).
- Leitinger, B., Hagg, N., Integrin I domains and their function, *Biochem. Soc. Trans.*, 27 (6), 826-832 (1999).
- Leitinger, B., Hohenester, E., Mammalian collagen receptors, *Matrix Biol.*, 26 (3), 146-155 (2007).
- Li, X.F., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., Yu, F.J.X., Amyloid precursor-like protein 2 promotes cell migration toward fibronectin and collagen IV, *J. Biol. Chem.*, 274 (38), 27249-27256 (1999).
- Liu, S., Calderwood, D.A., Ginsberg, M.H., Integrin cytoplasmic domain-binding proteins, *J. Cell Sci.*, 113 (20), 3563-3571 (2000).
- Lussier, C., Basara, N., Bouatrous, Y., Beaulieu, J.F., Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interaction in the human small intestinal mucosa, *Microsc. Res. Tech.*, 51, 169-178 (2000).
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Marshall, C.J., *Ras* recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation, *EMBO J.*, 14 (13), 3136-3145 (1995).
- McCormick, F., Signalling networks that cause cancer, *Trends Cell. Biol.*, 9 (12), 53-56 (1999).

- Meyn, M.S., Strasfeld, L., Allen, C., Testing the role p53 in the expression of genetic instability and apoptosis in ataxia-telangiectasia, *Int. J. Radiat. Biol.*, 66 (6), 141-149 (1994).
- Milner, R., Campbell, I.L., The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS, *J. Neurosci. Res.*, 69 (3), 286-291 (2002).
- Myllyharju, J., Kivirikko, K.I., Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms, *Trends Gene*, 20 (1), 33-43 (2004).
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N., Caspases: The proteases of the apoptotic pathway, *Oncogene*, 17 (25), 3237-3245 (1998).
- Olsen, B.R., Alper, R., Kefalides, N.A., Structural characterization of a soluble fraction from lens-capsule basement membrane, *Eur. J. Bio. Chem.*, 38 (2), 220-228 (1973).
- Park, H.R., Jung, W.W., Bertoni, F., Bacchini, P., Park, J.H., Kim, Y.W., Park, Y.K., Molecular analysis of p53, MDM2 and H-ras genes in low-grade central osteosarcoma, *Patho.Res. Practice*, 200 (6), 439-445 (2004).
- Pasco, S., Brassart, B., Ramont, L., Maquart, F.X., Manboisse, J.C., Control of melanoma cell invasion by type IV collagen, *Cancer Detec. Prevent.*, 29 (3), 260-266 (2004).
- Pucci-Minafra, I., Carella, C., Cirincione, R., Chimenti, S., Minafra, S., Luparello, C., Type V collagen induces apoptosis of 80701-BC breast cancer cells and enhances m-calpain expression, *Breast Cancer Res.*, 2 (3), 1140-1130 (2000).
- Salaszyk, R.M., Williams, W.A., Boskey, A., Batorsky, A., Plopper, G.E., Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J. Biomed. Biotechnol.*, 1, 24-30 (2003).
- Salvesen, G.S., Dixit V.M., Caspase activation: the induced-proximity model, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96 (20), 10964-10967 (1999).
- Santoro, S.A., Zutter, M.M., The alpha2beta1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells, *Thromb. Haemost.*, 74 (3), 813-821 (1995).
- Schubbert, S., Bollag, G., Shannon, K., Deregulated *Ras* signalling in developmental disorders: new tricks for an old dog, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 17 (1), 15-22 (2007).
- Sheu, R.J., Yen, M.H., Kan, Y.C., Hung, W.C., Chang, P.T., Luk, H.N., Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- α integrin monoclonal antibody, *Biochem. Biophys. Acta*, 1336, 445-454 (1997).
- Shields, J.M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., Understanding Ras: “it ain’t over til it’s over”, *Trends Cell Biol.*, 10 (4), 147-154 (2000).
- Sloan, E.K., Pouliot, N., Stanley, K.L., Chia, J., Moseley, J.M., Hards, D.K., Anderson, R.L., Tumor-specific expression of α v β 3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone, *Breast Cancer Res.*, 8 (2), 4-14 (2006).

- Tanaka, Y., Nakayamada, S., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Kataoka, T., Minami, Y., H-ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts, *J. Biochem.*, 277 (24), 21446-21452 (2002).
- Timple, R., Structure and biological activity of basement membrane proteins, *Eur. J. Biochem.*, 180 (3), 487-502 (1989).
- Timple, R., Dziadek, M., Structure, development and molecular pathology of basement membranes, *Int. Rev. Exp. Parhol.*, 29, 1-112 (1986).
- Torimura, T., Ueno, T., Kin, M., Harada, R., Nakamura, T., Sakamoto, M., Kumashiro, R., Yano, H., Kojiro, M., Sata, M., Laminin deposition to type IV collagen enhances haptotaxis, chemokinesis and adhesion of hepatoma cells through $\beta 1$ -integrins, *J. Hepatology*, 35, 245-253 (2001).
- Tzinia, A.K., Kitsiou, P.V., Talamagas, A.A., Georgopoulos, A., Tsilibary, E.C., Effects of collagen IV on neuroblastoma cell matrix-related functions, *Exp. Cell Res.*, 274, 169-177 (2002).
- Veit, G., Kobbe, B., Kenne, D.R., Paulsson, M., Koch, M., Wagener, R., Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain, *J. Biol. Chem.*, 281 (6), 3494-3504 (2006).
- Vitagliano, L., Berisia, R., Mazzarella, L., Zagari, A., Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation, *Biopolymers*, 51 (5), 459-464 (2001).
- Vojtek, A.B., Der, C.J., Increasing complexity of the Ras signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, 273 (32), 19925-19928 (1998).
- Vollmers, H.P., Imhof, B.A., Braun, S., Wailer, C.A., Schirmach, V., Birchmeier, W., Monoclonal antibodies which prevent experimental lung metastases, 172 (1), 17-21 (1984).
- Walker, P.R., Sikorska, M., Endonuclease activates, Chromatin structure and DNA degradation in apoptosis, *Biochem. Cell Biol.*, 72 (11), 615-623 (1994).
- White, D.J., Puranen, S., Johnson, M.S., Heino, J., The collagen reseptor subfamily of the integrins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36 (8), 1405-1410 (2004).
- Wyllie, A.H., Apoptosis, *Br. J. Cancer*, 67 (2), 205-208 (1993).
- Wyllie, A.H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 284 (5756), 555-556 (1980).
- Zhu, L., Xiang, R., Dong, W., Liu, Y., Qi, Y., Anti-apoptotic activity of Bcl-2 is enhanced by its interaction with RTN3, *Cell Biol. Inter.*, 31 (8), 825-830 (2007).