

**H-*ras* AKTİF HÜCRELERİNİN
FİBRONEKTİN PROTEİNİNE BAĞLANMA
YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ**

Çağlar Fırat

Yüksek Lisans Tezi

**H-*ras* AKTİF HÜCRELERİNİN
FİBRONEKTİN PROTEİNİNE BAĞLANMA
YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ**

Çağlar FIRAT

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Şubat 2010

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zerrin İNCESU

Çağlar FIRAT' ın 'H-ras Aktif Hücrelerinin Fibronektin Proteinine Bağlanma Yeteneklerinin İncelenmesi' başlıklı, Biyokimya Anabilim Dalı' ndaki Yüksek Lisans tezi, 17/Şubat/2010 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
26.01.2010..... tarih ve ..02/4..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Çağlar Fırat
Doğum tarihi ve yeri : 1979, Çorum
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
İletişim Adresleri : Bahçelievler Mh. 2. Bahar Sk. No: 29
19200 ÇORUM
Tel: 0505 632 74 14
e-posta: caglarfirat5@hotmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : Çambekış Köyü İlkokulu (1990)
Orta Okul : Eti Orta Okulu (1993)
Lise : Çorum Atatürk Lisesi (1996)
Üniversite : Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi (2003)
Yabancı Diller : İngilizce

Mesleki Deneyim

Fen Bilimleri Merkezi Dershanesi, Öğretmen, 2007

ÖNSÖZ

Kanser, radikal tedavisi bulunamamış, ölümcül bir hastalıktır. Tedavi stratejileri geliştirmede kanser mekanizmalarının anlaşılması önemlidir. Araştırmalar ekstraselüler matriks (ECM) proteini olan fibronektin (FN)'in, programlanmış hücre ölümü olan apoptozu kaspaz aktivasyonuna bağlı olarak baskılayan anti-apoptotik membran proteini Bcl-2'nin ekspresyonunu düzenlediğini göstermiştir. Bundan dolayı tez çalışmamızda FN'nin H-*ras* aktif 5RP7 sıçan embriyo fibroblast hücreleri üzerine apoptotik etkilerini araştırdık.

Tez çalışmamda ve lisansüstü eğitimim sürecinde bana danışmanlık yaparak beni yönlendiren, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zerrin İncesu' ya desteği ve sabrı için teşekkür ederim. Ayrıca hücre kültürü çalışmalarımı yürüttüğüm ve olanaklarından yararlandığım BİBAM müdürü Sayın Prof. Dr. Rıdvan Say ve tüm BİBAM çalışanlarına, tez çalışmam sürecinde bilgisini ve emeğini esirgemeyen arkadaşım Araş. Gör. Gülşen Akalın'a, tezimin her aşamasında emeği olan ablam Pınar Fırat Mashnad (M.A.T), eşi Dr. Mehedy Mashnad ve arkadaşlarım Sinem Ayşen Gürhan, Evren Gürsoy Uysal, Emrullah Orhan, Durdu Özen, Nail Öztürk ve Şerife Aydoğdu'ya, kardeşim Burcu Fırat'a, beni yetiştiren annem Safiye Fırat ve babam Fikret Fırat'a manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

H-*ras* AKTİF HÜCRELERİNİN FİBRONEKTİN PROTEİNİNE BAĞLANMA YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Ras proteini, aktif olduğu hücrelerde sinyal iletimi yollarının düzenlenmesinde, hücre büyümesi ve farklılaşmasında merkezi bir moleküldür. Embriyogenezde, yara iyileştirmede ve mitozun artmış olduğu durumlarda ras proteininin hücre içi ekspresyonu artmaktadır. Ras uyarıcı döngünün aktifleşmesinin, çeşitli kanserlerin ilerlemesinde önemli bir etken olduğu bulunmuştur.

Fibronektin, ekstraselüler matriksin glikoprotein ailesine ait yüksek moleküler kütleli bir proteindir. % 5 karbonhidrat içerir ve hücre zarındaki spesifik integrin moleküllerine bağlanır. Fibronektin, hücre gelişimi, hücre farklılaşması, doku oluşumu, apoptoz gibi birçok hücreyel olayda önemli etkiye sahiptir. Fibronektin reseptörleri tümörojenik fenotiple ilişkilendirilmiştir ve metastaz için önemlidir.

Bu çalışmada, H-*ras* aktif sıçan embriyo fibroblast hücreleri (5RP7)'nin çoğalma oranının zamana bağlı olarak belirlenmesi, bu hücrelerin fibronektin proteinine bağlanma kapasitelerinin ve bu bağlanmanın hücre apoptozu üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

5RP7 hücrelerinin büyüme eğrisinin belirlenmesi için tripan mavisi ile boyama yöntemi, bu hücrelerin fibronektine bağlanma kapasitesinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmış, değişik konsantrasyonlardaki fibronektin'e bağlı hücrelerin apoptozunda kaspaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için DNA parçalanma oranları ölçülmüştür.

5RP7 hücre konsantrasyonları zamana bağlı olarak doğru orantılı bir artış göstermiştir ve etki çalışmalarında kullanılmak üzere optimum hücre sayısı $12,5 \times 10^4$ olarak tespit edilmiştir. 5RP7 hücrelerinin fibronektin'e bağlanmalarının konsantrasyona bağlı olarak değişim gösterdiği ve hücrelerin 30 µg/ml fibronektin'e maksimal oranda bağlandığı gösterilmiştir. Buna karşın, 30 µg/ml fibronektin'e bağlanan hücrelerin canlılığını sürdürerek apoptoza gitmediği, 10 µg/ml fibronektin'e bağlanan 5RP7 hücrelerinin ise apoptoza giderek apoptotik DNA belirteci görüntüsüne paralel görüntü verdiği gösterilmiştir. Kaspaz-3 ve kaspaz-9'un fibronektin'e bağlı 5RP7 hücre apoptozu üzerindeki etkileri bu enzimlere spesifik inhibitörlerin eklenmesiyle araştırılmıştır. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 inhibisyonunun fibronektin'e bağlı 5RP7 hücre DNA parçalanma oranını azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak 5RP7 hücrelerinin fibronektin'e bağlı apoptoz mekanizmasının, mitokondrial yoldan ya da endoplazmik retikulumla bağlı $[Ca]^{+2}$ artışı sonucunda kaspaz-12 ve daha sonra kaspaz-9'un aktivasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: 5RP7, integrin, ekstraselüler protein, fibronektin, apoptoz

A STUDY of ADHESION ABILITY of H-*ras* ACTIVE CELLS TO FIBRONECTIN

ABSTRACT

Ras protein is a key molecule in regulating cell signaling proliferation and differentiation. Expression of ras protein increases in embriogenesis, healing of wounds and mitosis. It is found that activation of Ras signaling cycle is an important factor in prevention of cancer.

Fibronectin is one of the extracellular matrix glycoproteins with high molecular weight. It contains %5 carbohydrate and it binds to the specific integrin molecules on the cell membrane. Fibronectin plays an important role in many cellular activities, such as cell growth, differentiation and migration, tissue formation and apoptosis. Fibronectin receptors are related to the tumorigenic phenotype and important for metastasis.

The purpose of this study was to determine the growth rate of H-*ras* active mouse embryo fibroblast cells (5RP7) in a specific time, the adhesion capacity of these cells to fibronectin protein and the effects of adhesion on cell apoptosis.

Growth curve of 5RP7 was investigated by using trypan blue dying method. The adhesion capacity of 5RP7 to fibronectin was determined by adhesion assay (MTT). Furthermore, the apoptotic rate of fibronectin–adherent 5RP7 cells was also investigated by DNA fragmentation and the role of caspase-3 and 9 was studied using cell death detection ELISA kit.

Growth rate of 5RP7 cells was found time concentration-dependent and the optimum number of cells for using further studies is determined as 12.5×10^4 . The results obtained from adhesion assay suggest that binding of 5RP7 cells to a fibronectin substrate is dose dependent, cell adhesion increased to a maximum at 30 µg/ml concentration of fibronectin. On the other hand, the cells which adhered to 30 µg/ml fibronectin continued to survive and did not undergo apoptosis and the 5RP7 cells which adhered to 10 µg/ml fibronectin underwent apoptosis and their appearance was similar to that of apoptotic DNA markers. The effects of caspase-3 and caspase-9 on the apoptosis of 5RP7 cells that adhered to fibronectin were studied by addition of the specific inhibitors of these enzymes. It is found that inhibition of caspase-3 and caspase-9 reduces the rate of DNA fragmentation in the 5RP7 cells that adhered to fibronectin. As a result, it is found that the apoptosis mechanism of the 5RP7 cells that adhered to fibronectin depends on first the increase in the caspase-12 activity and then the increase in the caspase-9 activity triggered by mitochondrial pathway or increase in $[Ca]^{+2}$ that adhered to endoplasmic reticulum.

Key Words: 5RP7, integrin, extracellular protein, fibronectin, apoptosis

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Ras Proteini	3
İntegrin Reseptörleri	5
Fibronektin Proteini	7
Apoptoz Mekanizması	8
GEREÇLER ve YÖNTEMLER	11
Kullanılan Maddeler	11
Sarf Malzemeler	11
Kullanılan Cihazlar	11
Hücre Kültürü	11
Tripan Mavisi ile Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	11
Hücrelerin Fibronektin'e Bağlanma Oranlarının Ölçümü	12
DNA Ekstraksiyonu ve Elektroforetik Analizi	12
<i>DNA ekstraksiyonu</i>	12
<i>Elektroforetik analiz</i>	12
Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Hücre Canlılık	
Tespiti	12
BULGULAR ve TARTIŞMA	14
5RP7 H-ras Aktif Hücrelerinin Büyüme Eğrisi	14
5RP7 Hücrelerinin Fibronektin Proteinine Bağlanma Kapasiteleri	15
Fibronektin'e Bağlı 5RP7 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi	17
Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Fibronektin'in	
5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	18

SONUÇ ve ÖNERİLER	22
KAYNAKLAR	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Moleküler Şalter gibi Çalışan Ras	4
Şekil 2 İntegrinin Temel Yapısı	6
Şekil 3 İntegrin Alt Ünitelerinin Kombinasyonları	6
Şekil 4 Apoptoz Aktivasyonu	9
Şekil 5 5RP7 Hücre Büyüme Eğrisi	14
Şekil 6 5RP7 Hücrelerin Fibronektin'e Bağlanma Oranlarının MTT ile Belirlenmesi	16
Şekil 7 Fibronektin'e Bağlı 5RP7 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi	17
Şekil 8 Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Çeşitli Konsantrasyonlardaki Fibronektin'in 5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	19
Şekil 9 Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Çeşitli Konsantrasyonlardaki Fibronektin'in 5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	20

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf-1	: Apoptotik proteaz-aktif edici faktör 1
DNA	: Deoksiribonükleotit
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FN	: Fibronektin
GAP	: GTPaz aktif proteini
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
GDI	: Durdurucu guanin-nükleotit ayrılma faktörü
GDP	: Guanidin di fosfat
GDS	: Başlatıcı Guanin-nükleotit ayrılma faktörü
GEF	: Guanin-nükleotit değişim faktörü
GM-CSF	: Granülosit/makrofaj koloni uyaran faktör
GTP	: Guanintrifosfat
LTβP-I	: Gizil büyüme faktörü dönüştürücü-β bağlanma proteini - I
MAPK	: Mitojen aktifleştirici protein kinaz
MMP	: Matriksmetalloproteinaz
PDGF	: Pıhtılaşmadan edinilmiş büyüme faktörü
PI3K	: Fosfoinositol-3-kinaz
TNF-α	: Tümör nekrotik faktör-α
TRAIL	: Apoptoz indükleyici faktör

GİRİŞ ve AMAÇ

Ras çeşitli hücreler içinde sinyal transdüksiyonu yollarının düzenlenmesinde merkez moleküldür. *Ras* proteinler, hücre dışı çoklu uyarıcılarla aktive edilir ve hücre içi ve dışı birçok biyolojik olayda görev alırlar; dolayısıyla çoğalma, hücre intiharı, bağlanma ve sitokin/matriks üretimi gibi çeşitli hücresel olayları kontrol ederler.

Ras GTP/GDP'ye bağlanma özelliğine sahip proteinlerden biridir. GTP'ye bağlanarak aktif hale geçen *ras* proteini, GTP'nin GDP'ye dönüşümünü takiben inaktif hale geçer. *Ras* ailesi; 12, 13 ve 61. kodonlarda kodlanan H-*ras*, K-*ras* ve N-*ras* genlerinden oluşur. *Ras* gen ailesinin her üç üyesi de GTP'ye bağlanan ve GTPaz aktivitesi gösteren p21 proteinini kodlar. *Ras* gen ailesini kodlayan kodonlarda meydana gelen mutasyonlar, *ras* ailesinin GTPaz aktivitesini değiştirebilir ve bunun sonucu olarak sürekli hücre içine uyarı yani sinyal iletimi gerçekleşir.

Hücre döngüsünde ya da döngüyü düzenleyen her hangi bir gende meydana gelen bozukluk genellikle hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz mekanizması hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da mitokondrial yolun aktivasyonu sonucu tetiklenmektedir.

Spesifik hücre reseptörleri olarak bilinen integrinler, hücre oluşum ve onarımı, hücre göçü ve hücre bağlanmasında görev alan α - β heterodimerik transmembran glikoproteinleridir. Bilinen 18 α ve 8 β alt ünitesi vardır. Hücre içinden dışına ve dışından içine doğru iki yönde sinyal göndererek, hücrelerin çevreleriyle etkileşimini sağlarlar. Hücre dışı yani ekstrasellüler matriks proteinlere bağlanması sonucu aldığı sinyalleri hücre içine ileterek hücrenin çoğalması, yapışması veya hareketi sağlar. Integrinler yardımı ile hücre dışından alınan uyarılar hücre içinde protein kinaz C, tirozin kinaz, p21, *ras*, MAPK gibi bir seri sinyal molekülünün aktifleşmesine neden olur. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar integrinlerin hücre ölüm mekanizmasında etkili olduğunda göstermiştir. Integrin tipine bağlı olarak apoptoz mekanizması ya uyarılmakta ya da baskılanmaktadır. Bu nedenle integrinlerin apoptoz mekanizması üzerindeki rolleri tam olarak bilinmemektedir ve araştırılması son derece önemlidir. Özellikle kanserli hücrelerin apoptotik uyarılara karşı direnç geliştirmesi bu mekanizmanın tam olarak anlaşılması sonucu çözümlenebilir.

Ekstrasellüler matriks proteinlerinden olan fibronektin, yüksek moleküler kütleyle sahip bir glikoproteindir. İki polipeptit zincirin disülfid bağları ile birbirine bağlanması sonucu meydana gelmiştir. Yapısında % 5 karbonhidrat bulunmaktadır ve hücre zarındaki integrin reseptörlerine spesifik olarak bağlanma özelliğine sahiptir. Birçok hücre tipinin fibronektin proteini üretme yeteneğine sahip olduğu ve üretilen fibronektinin hücre dışına salgılandığı gösterilmiştir. Ekstrasellüler ortamda hücreler arası dolgu maddesi olarak görev yapan ve hücrelerin birbirine bağlanmasını sağlayan fibronektin harici kollojen proteini, proteoglikanlar, trombospondinler, tenasin, fubilin ve glikozaminoglikanlar bulunur. Hücrelerin, fibronektin, kollojen ve laminin gibi hücre dışı matriks proteinlerine bağlanması, hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve hücre hareketi için son derece önemlidir.

Hücrelerin fibronektin'e integrin aracılıklı bağlanmaları sonucunda fokal adezyon plakları meydana gelir. Bu oluşumlar hem integrin moleküllerinin kümelenmesine hem de hücre içi iskelet yapı elemanlarının kümelenmesine neden olmaktadır. Bu şekilde fibronektin'e bağlanma sonucunda meydana gelen değişimler hücre iskelet yapısında etkilemektedir. Özellikle kanser vakalarında ve kanser hücrelerinde fibronektin miktarında bir artış gözlenir. Akciğer kanseri hücrelerinin fibronektin'e bağlanması ile hücre bölünmesinde artış olduğu görülmüştür.

Bu tez kapsamında, H-*ras* onkogeni transform edilmiş sıçan embriyo fibroblast hücrelerinin (5RP7) öncelikle çoğalma oranlarının zamana bağlı olarak belirlenmesi daha sonra bu hücrelerin fibronektin proteinine bağlanma kapasitelerinin ve bu bağlanmanın hücre apoptozu üzerine etkilerinin kaspaz enzim aktivasyonu ve DNA hasarı düzeyinde meydana gelen değişimlere bağlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Ras Proteini

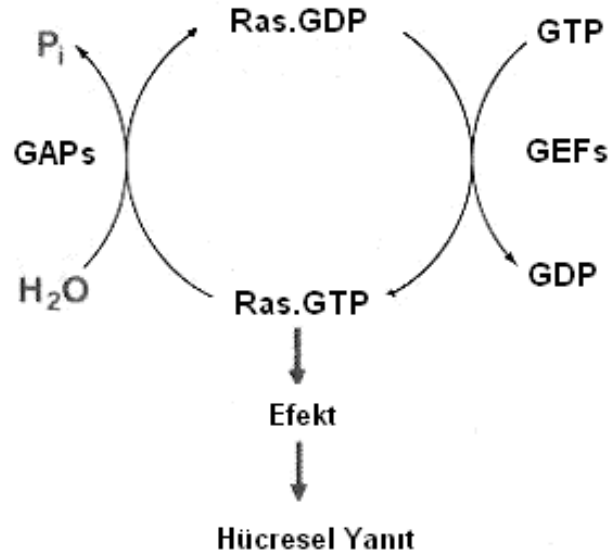
Aktif olduğu hücrelerde sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde, hücre büyümesi ve farklılaşmasında merkezi bir molekül olan ras proteininin; embriyogenezde, yara iyileştirmede ve mitozun artmış olduğu durumlarda hücre içi ekspresyonu artmaktadır. Hücre, dışarıdan uyarıldığı zaman ras proteinin sinyal iletim mekanizmasında görevli olan Raf-1/mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK), Ral guanin nükleotit ayrılma uyarıcı, fosfoinositol 3-kinaz (P13K), protein tirozin kinazlar ve küçük GTPazlar gibi, bir çok efektörle çift oluştururlar (Bourne ve ark., 1991; Tanaka ve ark., 2002).

189 aminoasit uzunluğunda ve hücre zarında lokalize olmuş olan ras proteini guanin tri fosfat (GTP) aktivitesine sahip bir proteindir. Yapısal olarak, karboksil terminalinin hücre zarıyla iletişimini sağlayan iki aminoasit dizisi içermektedir (Valencia ve ark., 1991). Birinci aminoasit dizisi; C terminal CAAX (A: alifatik amino asit, X: metionin veya serin) motifinin sistein amino asitinin farnesilasyonundan oluşur. Bunu AAX kalıntılarının proteolitik nakli ve C-terminalinin karboksil metilasyonu izler. İkinci amino asit dizisi ise; ya N-ras veya H-ras proteinlerindeki sistein kalıntılarının S-asilasyonu ile ya da K-ras4B proteini olması durumunda amino asitlerin çoklu alt yapılarının esnemesi ile görülmektedir (Magee ve Marshall, 1999).

Ras, değişken olarak hücreye dağılır fakat biyolojik aktivitesi prenil grubu eklenildiğinde ve sıklıkla sitoplazmik zara ulaştığında ortaya çıkar (Mather ve ark., 2009). Ras sinyal yolağı, ERK1 ve ERK2'ye doğru ilerleyen MAPK yolağıdır (Fehrenbacher ve ark., 2009). Farklı büyüme faktörlerinin (örneğin, EGF ve IGF-1) bağlantısı ras'ın aktivasyonunu diğer alıcılara indükler, dönüşümlü olarak da c-raf, MEK ve ERK'yı aktive eder. Çekirdekte fosforile olan ERK, transkripsiyon faktörlerini (örneğin, Elk-1, c-jun) aktive eder ve proliferasyon ve hayatta kalmayı içeren genlerin ekspresyonunu düzenler (Newell ve ark., 2009).

Ras-GTP kompleksi aktif bir yapıdadır. İntrasellüler seviyesini GTP hidrolizi ve GDP'den GTP'ye dönüş arasındaki dengeden alır. GTP analogları, doğal fosfat hidrolizi ile onkojenik *ras* mutasyonlarının düşük GTP aktivitesini ve Raf'ın aşağı akım etkisi ile birlikte *ras* etkileşiminin inhibitörlerini dengeleme koşulu ile aktive olurlar (Palmioli ve ark., 2009). Ras, aktif (GTP-bağlı) ve inaktif (GDP-bağlı) durum arasında yer değiştirir (Şekil 1). Bu döngü guanin dönüşüm faktörü (GEF) ve GTPaz aktif proteini (GAP) tarafından kontrol edilir. GEF, SOS (Son of Sevenless) gibi GDP ayrılması oranını artırırken, GAP, p120, RasGAP gibi *ras*'ın inaktivasyonunu destekleyerek *ras*'ın içindeki GTPaz aktivasyonunu hızlandırır (Pamonsinlapatham ve ark., 2009).

Başlatıcı (GDS) ve durdurucu (guanin ayrılma inhibitörleri, GDI) olmak üzere GEF'lerin iki tipi vardır. GDI'nin durdurucu etkisi, GDS'nin başlatıcı etkisinden çok daha güçlüdür. GEF'in sadece başlatıcı türü, Ras ile başlatılan sinyal uyumu işlemlerinde aktiftir (Kikuchi ve ark., 1994). GDI, özellikle *ras*'ın GDP-bağlı formuna bağlanır, GDP'nin açığa çıkmasını inhibe eder ve GTPaz'ın inaktif durumunu sürdürür (Brito ve Scorrano, 2009).



Şekil 1. Moleküler Şalter gibi Çalışan Ras (Adjei, 2001)

Ras'ın SOS ile aktifleşmesi, bir dizi serin/tironin kinaz, Raf proteininin (özellikle c-Raf), sitozolden, N-terminal bölgesinin ras'a bağlandığı yer olan plazma zarına yer değiştirmesine sebep olur. Bağlanmanın üstünde, MEK içindeki bütün tirozin ve serin aminoasit kalıntıları fosforlanmıştır. Fosfor bağlanmış MEK, tekrar fosfor bağlanmasıyla bir MAP kinaz (ERK1/2) aktifleştirir. Sonunda MAP kinaz, diğer proteinlere fosfor bağladığı ve epidermal büyüme faktörü (EGF), pıhtılaşmadan edinilmiş büyüme faktörü (PDGF), granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit/makrofaj koloni uyaran faktör (GM-CSF) gibi birçok transkripsiyon faktörlerini uyardığı yer olan çekirdeğe gider. Çekirdeğe ulaşana kadar, hücre içi olarak uyum sağlamaya ve üretilmeye devam eder ([http-2](http://2)).

Memelilerde *ras* ailesinin 3 üyesi *K-ras*, *N-ras* ve *H-ras*'tır (Karreth ve Tuveson, 2009). Birbirlerine % 85 homoloji gösteren 21 kilodalton'luk (kDa) birer protein kodlarlar. Ras proteinlerinin, retrovirüsler içinde form değiştirdiklerinde kanserojen olabilme potansiyelleri yüksektir. İnsan kanser hücrelerinin yüzde 10 ila 50'sinde, bu üç *ras* türünden birinin, somatik nokta mutasyonu tarafından aktifleştirildiği görülmüştür (Valencia ve ark., 1991).

H-ras ve *K-ras* 1981 yılında Harvey ve Kirsten sıçan sarkoma retrovirüslere bağlı transforming proteinlerin hücresel homologlarında keşfedilmiştir (Wu ve Terada, 2009). *K-ras* genellikle mutasyona uğramış aile üyesiyken (*ras* mutasyon kanserlerinin yaklaşık % 85'inde), *N-ras* ve *H-ras* mutasyonları nadirdir (% 15). *K-ras*, yaygın olarak pankreas, karaciğer, kolon epitelyum kanserlerinde mutasyona uğrarken; *N-ras* mutasyonları sık sık melonama, karaciğer, ilik malignanlarında meydana gelir. *H-ras* mutasyonları mesane kanserlerinde gözlemlenmiştir (Karreth ve Tuveson, 2009).

H-ras, integrin-mediated bağlanma ve lenfositlerin çoğalmasında önemli rol oynamaktadır. *H-ras*/Raf-1/MAPK yollarının, integrin ve integrinin matriks proteinlerine bağlanma olaylarında ve hücre intiharı başlatılmasında rol

almaktadır (Tanaka ve ark., 2002). Bu bağlanma (integrin-mediated bağlanma), kanser gelişiminde düzensizleşir, değişime uğramış hücrelerin, normal hücrelerden daha çok büyümesine ve yaşama şansının artmasına sebep olur. Bağlanmaya bağlı yaşama ve çoğalma, kanser hücrelerinin kütesinin artmasına ve kanser hücrelerinin, metastaz zamanında farklı dokularda yaşayabilmesine olanak sağlar (Galownia ve ark., 2007). Bazı çalışmalarda, ERK uyarısının, bağlanmaya bağlı artışının, hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bağlanmanın ERK uyarısını artırmasının, bu büyüme faktörlerine tepkisi mi, yoksa sadece büyüme faktörlerinin alt gruplarının sinyallerine mi bağlı olduğu tam olarak bilinmemektedir.

H-*ras* sinyalleri, özellikle Raf-1/ERK döngüsünün başlattığı, β_1 'in aracılık ettiği, osteoblastların FN, LM, VN gibi matriks proreinerine bağlanmasını azaltmıştır (Tanaka ve ark., 2002).

Ras uyarıcı döngünün aktifleşmesi, çeşitli kanserlerin ilerlemesinde önemli etkindir. Bazı çalışmalarda *ras*'ın ciddi rahim kanserleriyle alakalı olduğu bulunmuştur. *Ras*'ın aşırı ekspresyonu veya mutasyonu rahim kanselerinde belli derecelere kadar belirlenmiştir (Alonio ve ark., 2003).

Bazı çalışmalarda *ras*'ın değişime nadiren uğradığı ve kanserin derecesinin *ras*'ın etki miktarıyla korelasyon göstermediği bildirilmiştir (Ngan ve ark., 1999; O'Leary ve ark., 1998; Van Le ve ark., 1993).

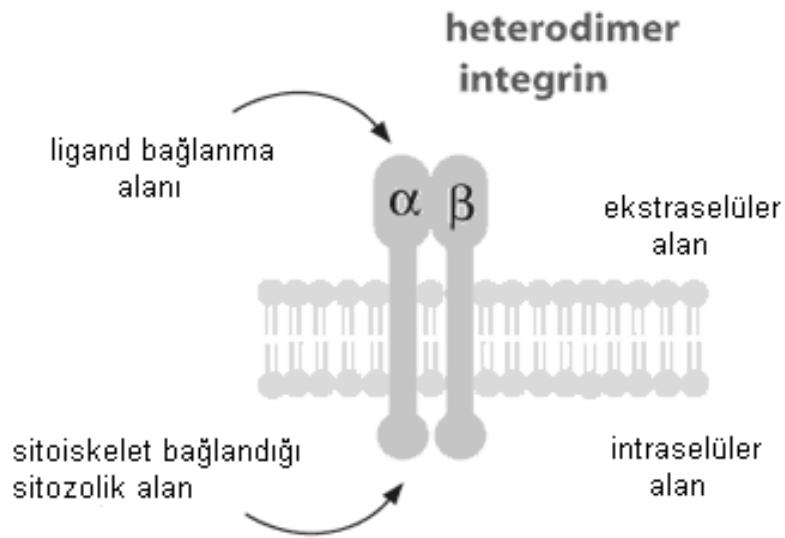
Birincil fibroblastlarda *ras*'ın ortaya çıkması büyümenin durmasına ve erken yaşlanma fenotipinin ortaya çıkmasına sebep olur. Fare keratinositleri, insan yumurtalık yüzeyi epitel hücreleri ve insan özifagus keratinositleri de aynı şekilde davranırlar. Bununla birlikte, insan tiroit epitel hücreleri, *ras* etkisiyle çoğalırlar (Skinner ve ark., 2004). Bu göstermektedir ki, *ras*'ın etkileri hücre tipine bağlıdır. *Ras*'ın yaşlanmayı başlattığı hücrelerde, yaşlanmanın AFP-p53 ve p16^{INK4a} döngülerinin aktifleşmesiyle başladığı düşünülmektedir. Bu döngüler hücre bölünmesinin G1 fazında kalmasına sebep olur (Ferbeyre ve ark., 1997). Bu mekanizma, tümör çoğalmasını durdurduğundan tümör durdurma mekanizması olarak adlandırılmaktadır.

İntegrin Reseptörleri

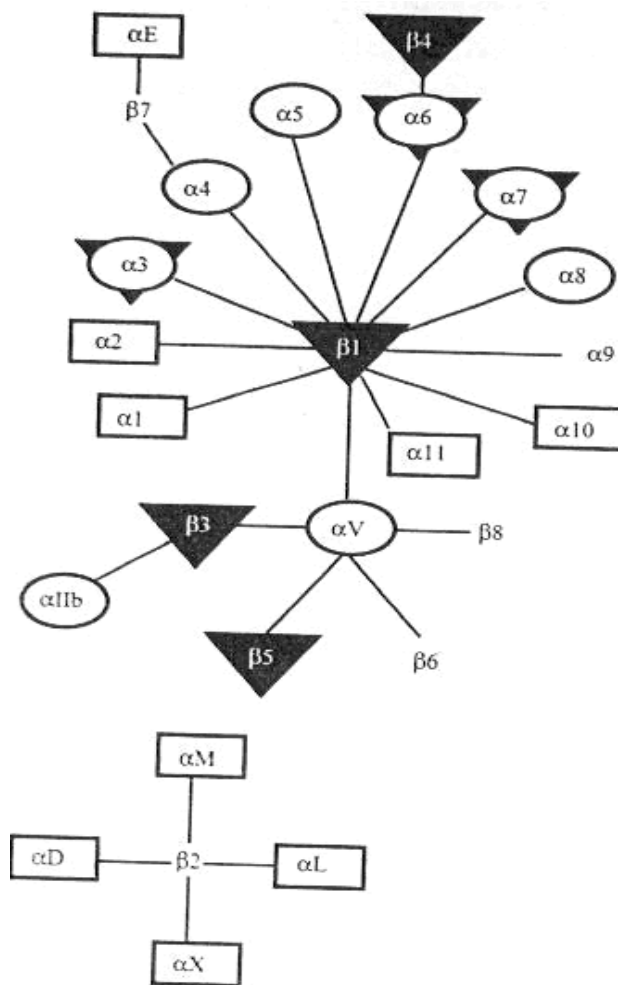
Hücre çoğalması, farklılaşması, bağlanması ve göçü için gerekli adhesif fonksiyonları sağlayan α - β heterodimerik transmembran glikoprotein ailesi integrinlerdir (Schwartz ve Ginsberg, 2002).

İntegrinler, ekstrasellüler matriks (ECM) ile hücrelerin etkileşimini sağlarlar ve yara iyileşme sürecinde kritik olan; hücrelerin hayatta kalması, adezyon, migrasyon, proliferasyon, farklılaşma gibi davranışları düzenlerler (Farias ve ark., 2005). İntegrinler, hücre dışı proteinleri için reseptör veya diğer hücrelere karşı anti-reseptör rolünü üstlenmektedirler (Feire ve ark., 2004).

Her bir integrin, α ve β alt ünitesinden oluşmaktadır (**Şekil 2**). Bu α ve β alt üniteleri kovalent olmayan bağlarla birbirlerine bağlanmışlardır (Feire ve ark., 2004). Bilinen 18 α ve 8 β alt ünitesi vardır (Giancotti ve Rouslahti, 1990; Mashcler ve ark., 2005). β ve α alt birimlerinin kombinasyonundan en az 24 farklı integrin oluşur ve bağ karakterini bu kombinasyonlar belirler (**Şekil 3**).



Şekil 2. İntegrinin Temel Yapısı (http-1)



Şekil 3. İntegrin Alt Ünitelerinin Kombinasyonları (Beaulieu ve Jean-François, 1997)

Her integrin, ligantına karşı spesifik bir affinite göstermektedir (Moir ve ark., 2008). İntegrin- ligand affinitesi, integrin aktivasyonu olarak adlandırılır. İntegrin aktivasyonu, integrin-ligant uyumunun aktif olmayan durumdan (düşük afinite), aktif olan duruma (yüksek afinite) değişimi anlamındadır (Strachan ve Condic, 2008).

İntegrin-ligant etkileşimi ya integrinlerin ekspresyon düzeylerinin ya da integrin reseptörünün aktivasyonu ile düzenlenmektedir (Shibayama ve ark., 1999).

İntegrin aktivasyonu enerji gerektirmektedir (Sethi ve ark., 1999) ve integrinlerin aktifleşmesinde sitoplazmik birimler önemli role sahiptir. İntegrinler, forbol esterleri ve kalsiyum iyonu formları gibi moleküllerle aktifleştirilirler. Bazı sitokinlerin ve H-ras'ın da integrinleri inaktifleştirdiği bildirilmiştir (Shibayama ve ark., 1999).

İntegrinler, hücre fonksiyonlarını düzenlemek için plazma zarı içinden biyokimyasal uyarı gönderme yeteneğine sahiptirler. İntegrinler; östrojen, paratiroid hormonu, glukokortikoid, prostaglandinler, tümör nekroz faktör- α ve kemokinez kontrol osteoblastlar gibi aynı kökenli G-proteinlerle bağlı alıcılar veya küçük türev G proteinlerin başlattığı sinyallerle çalışır ve integrinler, hücre içinden dışına ve dışından içine doğru iki yönde sinyal göndererek, hücrelerin çevreleriyle etkileşimini sağlamaktadırlar (Giancotti ve Ruoslahti., 1999; Mashcler ve ark., 2005).

İntegrinler hücre türüne ve farklılaşma evresine göre değişir. Bir tür integrin, çeşitli hücrelerde çoğalma ve hücre göçüne özgüdür ve yara iyileşmesinde görev alır (Leitinger ve Hohenester, 2007; Mashcler ve ark., 2005), memeli hücrelerinde, hücre dışı matrikslere ve hücre içi proteinlere bağlanmayı sağlayan alıcılardır, örneğin protein kinaz C, protein tirozin kinaz, p21 *ras*, MAPK ve p13 kinaz ve sinyal iletimini başlatırlar (Giancotti ve Rouslahti, 1990; Mashcler ve ark., 2005). Bazı çalışmalar, integrinin, matriks metalloproteinazın (MMP) ortaya çıkmasını düzenlemede görev aldığını göstermiştir (Mitra ve ark., 2006).

İntegrinler, kanser hücrelerinin dağılmasında, çeşitli hücre dışı matrikslere bağlanarak, hücrelerin ana hücre zarına bağlanmasını düzenlerler. İntegrinler, hücre dışından içine sinyal göndererek hücre çoğalması, farklılaşması, hücre göçü ve hücre ölümünü düzenlerler (Mashcler ve ark., 2005).

Fibronektin Proteini

Ekstrasellüler matriks proteinleri (ECM) (fibronektin, vitronektin ve fibrinojen gibi) hücre farklılaşmasında, hücre gelişiminde, apoptozda, doku oluşumu ve devamlılığının sağlanmasında, tümör oluşumu ve metastaz gibi birçok normal ve patolojik olaylarda önemli etkiye sahiptirler (Hynes ve Zhao, 2000; Pankov ve Yamada, 2002; Sottile ve Hocking, 2002). ECM; glikoproteinler, kollojenler ve proteoglikanlar olmak üzere üç ana bileşikten oluşmaktadır.

ECM'nin glikoprotein ailesine ait olan fibronektin (FN), bağ onarımında önemli role sahip yüksek moleküler kütleli bir proteindir. % 5 karbonhidrat içerir ve hücre zarındaki spesifik integrin moleküllerine bağlanır.

Fibronektin, iki 250 kDa' luk alt ünite disülfid bağıyla bağlanmıştır. 230-270 kDa alt biriminin disülfid bağı dimerden oluşmuş olan FN, birçok farklı hücre çeşidi

tarafından sentezlenir. Bu modüller FN'nin kendisi ile hücre yüzeyi reseptörleri ile diğer ECM elemanlarının ilişkilerine aracılık eden işlevsel alanları kapsarlar. FN geninde 17 tane kodlanmış tip III tekrarı vardır. 15 tanesini temel olarak içerir, 2 tanesi alternatif olarak eklenmiştir (Hynes, 1990; Schwarzbauer ve ark., 1987). Tip III modüllerinin yüksek çözünürlük işlevleri kristalografi ve NMR ile belirlenmiştir. Bu tekrarlar esnek düğümler ile bağlanmış 2 tane anti-paralel β tabakası içerisine düzenlenmiş 7 tane β -kolonun oluşturulması ile meydana gelir (Main ve ark., 1992; Dickinson, 1994).

FN fibrilleri çoklu ECM bileşenleri bağlanma bölgelerine sahiptir, bunlar kollojen I ve II, fibulin-I, fibronojen, trombospondin-I, latent transform büyüme faktörü- β bağlanma protein-I (LT β P-I), dekorin ve biglikon içeren çeşitli diğer ECM proteinlerinin aktivasyonlarını düzenler (Leiss ve ark., 2008).

İntegrin reseptörleri ile etkileşime giren FN proteini hücreye bağlı olarak polimerizasyona uğramaktadır. İntegrin-FN etkileşimi gerçekleştiğinde FN konformasyon değişimine uğrar bu da FN-FN polimerizasyonunun gizli alanını ekspoz etmektedir (Kadler ve ark., 2008).

FN reseptörleri tümöröjik fenotiple ilişkilendirilmiştir ve metastaz için önemlidir. Birçok integrin reseptörü ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ ve $\alpha_v\beta_6$), fibronektin reseptörü olarak rapor edilmiştir. Bunlar arasında $\alpha_5\beta_1$ integrin reseptörü ligant spesifitesi açısından klasik fibronektin reseptörü olarak kabul edilmiştir (Reyes-Reyes ve ark., 2006). Genetik çalışmalarda, anjiyogenezin fibronektin ve onun ana reseptörü $\alpha_5\beta_1$ integrini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Serini ve ark., 2006).

Apoptoz Mekanizması

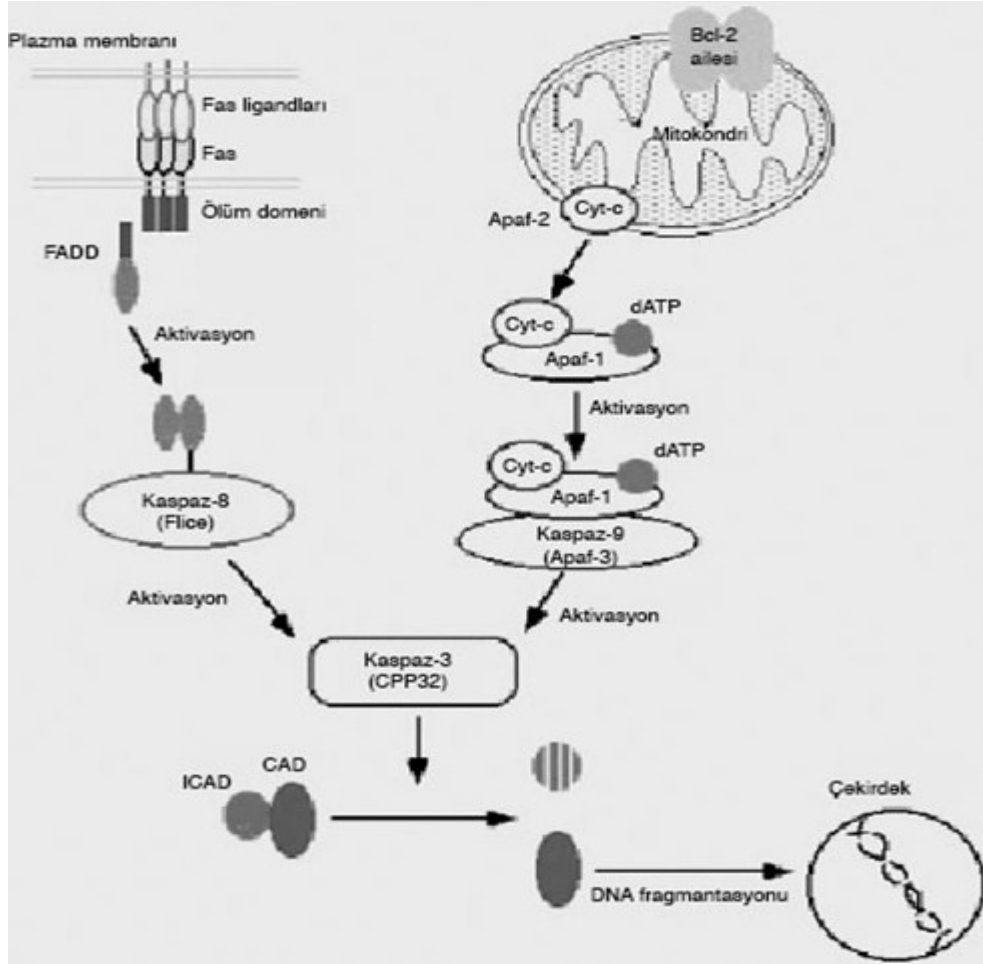
Hücresel ölümü, apoptoz ve nekroz olmak üzere iki farklı yolla gerçekleşir (Lee ve ark., 2009). Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, normal gelişimi sağlamak ve vücut homeostazını korumak için, istenmeyen hücrelerin uzaklaşmasını sağlayan (Tian ve ark., 2009) yaşam boyu oluşan aktif ve enerjiye bağlı doğal bir süreçtir (Grosse ve ark., 2009). Apoptotik hücreler, hücresel büzülme, zarda balonlaşma, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşumu (Lee ve ark., 2009), kaspaz aktivasyonu, fosfatidilserin açığa çıkması ile karakterize edilir (Chitnis ve ark., 2008).

Proteaz ailesi olarak bilinen kaspazlar, aktif merkezlerinde sistein aminoasidi içeren öncül enzim formunda bulunurlar. Kaspazlar, proenzim (prokaspaz) formunda aktif değildirler fakat birçoğu apoptoz sırasında proteolitik ayrılma ile aktif hale geçerler (Huang ve ark., 2008). İçerdikleri sistein aminoasiti sayesinde substratlarına nükleofilik ataklar yaparak, her aspartik asit aminoasitinden sonraki peptit bağlarının parçalanmasına neden olurlar (Chowdhury ve ark., 2008). Apoptotik kaspazlar, başlatıcı ve öldürücü kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılır. Başlatıcı kaspazlar; kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10 ve efektör kaspazlar; kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7'dir (Lee ve ark., 2008).

Hücrede apoptozun uyarılması ile kaspaz aktivasyonunun tetiklendiği 2 büyük sinyal yolağı bilinmektedir, bunlardan bir tanesi mitokondriyal yolak ve diğeri ölüm reseptör yolağıdır (Şekil 4).

Mitokondriyal yolağın ya da hücre içi yolağın tetiklenmesi ile mitokondriden sitokrom c salınımı gerçekleşir ve Apaf-1, sitokrom c ve prokaspaz-9'u içeren

apoptozom formasyonu meydana gelmektedir. Kaspaz-9 aktivasyonu, kaspaz-3'ün aktivasyonuna ve DNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır. Mitokondriyal zarın bütünlüğü Bcl-2 protein ailesi üyeleri ile kontrol edilmektedir (Xing ve Boyce, 2005).



Şekil 4. Apoptoz aktivasyonu (http-3)

Ölüm reseptör yolağında, hücre yüzeyindeki transmembran protein ailesine ait ölüm reseptörleri aktive olmaktadır. Yapılan son çalışmalarda hücre ölüm reseptörü olarak tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) ve Fas (APO-1 veya CD-95) reseptörleri tanımlanmıştır. Spesifik agonistin hücre ölüm reseptörlerine bağlanması sonucunda (Marin ve ark., 2002) aktif hale geçen reseptör üzerinde yer alan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile etkileşime girerler. Bu ölüm bölgeleri daha sonra apoptotik sinyal yollarının alt bölgelerinde yer alan enzim ve efektör aktivasyonunu başlatırlar. Bu aşamada, kaspaz-8 kritik biyokimyasal role sahiptir (Sharifi ve ark., 2009).

Hücre içi proteinlerden olan Bcl-2 aile üyelerinin bir kısmının apoptozu indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs) bilinirken bir kısmının ise bu mekanizmayı baskıladığı (Bcl-2, Bcl-Xl) bilinmektedir (Choi ve ark., 2008). Bcl-2 ailesi

üyelerinden Bax ve Bak ekspresyonu ölümcülken, Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 ve A1 bu ölümcüllüğü baskılamaktadır (Liang ve ark., 2008).

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

Kullanılan Maddeler

Bovin serum albümin (BSA), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), penisilin streptomisin solüsyonu, dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, Almanya), sodyumbikarbonat, sodyumklorür, dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal sıgır serumu (FCS) (Gibco, İngiltere), fibronektin (Roche, İsviçre), tripan mavisi solüsyonu (Biochrom AG, Almanya), tripsin-EDTA (Biological Industries, İsrail), puck's saline A (PSA), klorür, magnezyum klorür, apoptotik DNA-Ladder kit (Roche, Almanya), hücre ölüm ELISA kit (Roche, Almanya).

Sarf Malzemeler

5 ve 10 ml'lik plastik pipetler (HBG, İngiltere), otoklavlanabilir cam şişe (Iso-Lab, Hollanda), 10, 200 ve 1000 µl'lik pipet uçları (Gilson, Fransa), 96 kuyucuklu plakalar, 25 ve 75 cm² flasklar, 15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpü (TPP, İsviçre), cam petri kapları (Corning, ABD), lam, lamel, toma lamı (Mariendfeld, Almanya), steril petri kapları (Corning, ABD).

Kullanılan Cihazlar

ELISA cihazı (EL × 808-IU) (Bio-Tek, USA), hassas terazi (Ohaus, ABD), invert mikroskop (Olympus, ABD), karbondioksit inkübatörü (Heraeus, Almanya), kuru hava sterilizatörü (Heraeus, Almanya), manyetik karıştırıcı (Heidolph, Almanya), santrifüj, otoklav (Hiroyama, Japonya), steril kabin (Holten, İngiltere), etüv (Nüve, Türkiye), yatay DNA jel ünitesi (Consdet, UK), güç kaynağı (Consdet E844, Belçika), DNA görüntüleme cihazı (Gel Logic 100, Kodak, EEC).

Hücre Kültürü

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

Deney öncesinde tripsin/EDTA solüsyonu ile toplanan hücreler toma lamı kullanılarak sayılmış, hücre sayısı belirlenmiştir. Hücreler deney için uygun ortamlara ekilerek 37 °C % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren atmosfer ortamında kültürde tutulmuşlardır.

Tripan Mavisi ile Büyüme Eğrisin Belirlenmesi

24 kuyulu hücre kültürü plakalara 8 farklı konsantrasyon (6.25×10^4 , 12.5×10^4 , 25×10^3 , 5×10^3 , 1×10^3 , 5×10^2 , 250 ve 125 hücre) hazırlanarak ekilen hücreler 24, 48 ve 72 saat 37 °C'de inkübasyon edilmiştir. Hücreler her inkübasyon süresi sonunda tripsinle toplanıp solüsyon haline getirilmiştir ve 100 µl alınarak eşit miktardaki tripan mavisi boya solüsyonuna (% 0.5 w/v) eklenmiştir. Hücre-boya karışımı 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra ışık mikroskopunda 40x büyüteç altında renksiz canlı hücreler ve mavi renkli ölü hücreler sayılmıştır. Herbir deney bağımsız olarak 2 kez tekrar edilmiştir (Hayashi ve ark., 1990).

Hücrelerin Fibronektin'e Bağlanma Oranlarının Ölçümü

Farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/ml) fibronektin proteini Ca^{+2} içeren TBS pH 7.4 (24 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, % 0.1 BSA, 2 mM Glikoz) solüsyonu içerisinde hazırlanmıştır. Daha sonra her bir 96 kuyucuk 50 µl dilüe fibronektin solüsyonu ile kaplanarak +4 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün her bir kuyucuk % 2'lik 100 µl BSA (w/v) solüsyonu ile inkübe edilerek spesifik olmayan bağlanma önlenmiştir. Her bir kuyucuk 2 kez % 0.1'lik TBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücreler % 0.25 tripsin/EDTA ile toplanarak, 12.5×10^4 hücre/ml Mg^{+2} ve Ca^{+2} içeren DMEM solüsyonu içerisinde süspansiyon haline getirildikten sonra 50 µl hücre süspansiyonu farklı konsantrasyonlardaki fibronektin solüsyonu ile kaplı 96 kuyucuklara ekilerek 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda, fibronektin proteinine bağlanmayan hücreler 0.5 mM Mg^{+2} ve 1 mM Ca^{+2} içeren TBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. 50 µg/ml MTT (Mossman, 1983; Zeytinoğlu ve ark., 2003) her bir kuyucuğa aktararak hücreler 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde, yıkama işlemi ile ortamdan MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, bağlanan canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 100 µl DMSO eklenerek oda ısısında 10 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Hücrelerdeki renk değişimi, EL × 808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon deneyi içerisinde üç farklı kuyuda tekrarlanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu ve Elektroforetik Analizi

DNA ekstraksiyonu

Steril cam petriler, fibronektin (10 µg/ml ve 30 µg/ml) ve poly-L-lizin (5 µg/ml) ile kaplanmış bir gece +4 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra % 2 BSA ile 1 saat 37 °C'de inkübe edilen petriler iki kez % 0.1 BSA ile yıkanmıştır. Tripsinle muamele edilen hücreler, iki kez DMEM ile yıkandıktan sonra 2 mM Ca^{+2} ve 0.5 mM Mg^{+2} içeren DMEM içerisinde süspansiyon edilmiş, toma lamı ile sayılmıştır. 1×10^6 hücre/ml protein kaplı cam petrilere eklenmiş, 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu işlemten sonra tripsinle toplanan hücreler 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınmış, üzerine 200 µl PBS eklenmiştir. Hücre DNA'ları apoptotik DNA-Ladder kit (Roche) prosedürüne uygun olarak izole edilmiştir. Her birine 500 µl yıkama solüsyonu eklenen ependorf tüpler, 800 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş, altta kalan sıvılar atılmıştır. Santrifüj işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Ekstre edilen DNA'ların filtreli tüpte toplanması amacı ile ependorf tüpler, son santrifüj işleminde alttaki sıvı dökülmeden 8 saniye 1300 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Elektroforetik analiz

5 µl yükleme çözeltisi (Sigma) ile izole edilen DNA örnekleri karıştırılarak % 1.2'lik agaroz jel üzerine yüklenmiş, 1.5 saat 50 V'da yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel DNA görüntüleme cihazında (Gel Logic 100, Kodak, EEC) görüntülenmiştir.

Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Hücre Canlılık Tespiti

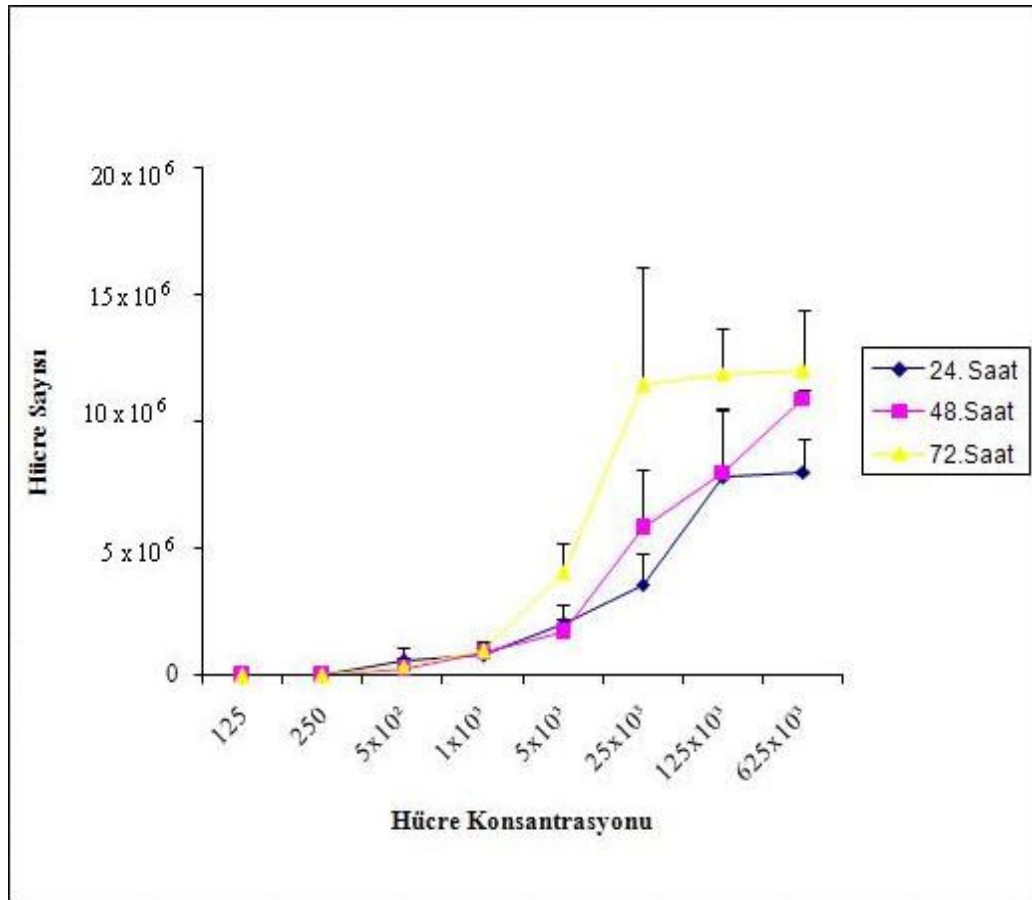
96 kuyulu hücre kültürü plakaları, fibronektin (10 µg/ml ve 30 µg/ml) ve poly-L-lizin (5 µg/ml) ile kaplanmış bir gece +4 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra % 2 BSA ile 1 saat 37 °C'de inkübe edilen plakalar iki kez % 0.1 BSA ile yıkanmıştır.

Trypsinle muamele edilen hücreler, iki kez DMEM ile yıkandıktan sonra 2 mM Ca^{+2} ve 0.5 mM Mg^{+2} içeren DMEM içerisinde süspansiyon edilmiş, toma lamı ile sayılmıştır. Her bir kuyuya 1×10^6 hücre/ml eklenmiş, 2 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. 10 μM kaspaz-3 ve 10 μM kaspaz-9 inhibitörü eklenerek plakalar 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre ölümünü belirlemek amacıyla Cell Death Detection ELISA (Roche) kit'i kullanılmıştır. Plakalar 300 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve her bir kuyuya 200 μl liziz çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra plakalar 200 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş 20 μl süpernatant alınarak streptavidin kaplı kuyucuklara konulmuş, üzerine anti-histon-biotin, anti-DNA-POD ve inkübasyon çözeltisinden oluşan immünreagent'tan 80 μl eklenerek 300 rpm'de 2 saat oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant dökülüp plakalar 3 kez inkübasyon çözeltisi ile yıkanmıştır. ABTS tablet çözülerek hazırlanan karışımdan 100 μl kuyucuklara eklenmiş 250 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra absorbans değerleri 405 nm'de ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da ölçülmüştür. Deney her bir kuyucuk için 2'şer kez tekrarlanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

5RP7 Hücrelerinin Büyüme Eğrisi

% 10 FCS, 100 ünite/ml penisilin-streptomisin ve % 1 glutamin içeren DMEM içerisinde kültürde çoğaltılan 5RP7 hücreleri tripsinlenerek hücre solüsyonundan 10 μ l alınarak hemositometrede hücre sayımı yapılmıştır. Daha sonra, 100 μ l hücre süspansiyonunda sırası ile 125, 250, 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 25×10^3 , $12,5 \times 10^4$ ve $62,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde 24 kuyulu tabakalara ekim işlemi yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki 5RP7 hücreleri 24, 48 ve 72 saat 37 $^{\circ}$ C'de inkübe edildikten sonra zamana bağlı hücre sayısındaki artış, tripan mavisi ile boyanmış ölü hücrelerin ve boyanmamış canlı hücrelerin mikroskop altında sayımı sonucu belirlenmiştir.



Şekil 5. 5RP7 Hücre Büyüme Eğrisi. 125 μ l, 250 μ l, 5×10^2 μ l, 1×10^3 μ l, 5×10^3 μ l, 25×10^3 μ l, $12,5 \times 10^4$ μ l, $62,5 \times 10^4$ μ l konsantrasyonlarındaki hücreler 96 kuyulu plakalara ekilerek 24, 48 ve 72 saat 37 $^{\circ}$ C de inkübe edilmiştir. Her inkübasyon süresi sonunda hücreler 2x tripsin ile toplanarak 1:1 oranla tripan mavisi ile muamele edilmişlerdir. Her veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir (n=6)

Tripan mavisi bir diazo boyasıdır ve yalnızca ölü doku ya da hücreler tarafından absorbe edilerek mavi renkte boyanmalarını sağlamaktadır. Hücre zarları bozulmamış canlı doku ya da hücreler ise tripan mavi boyası ile boyanmamakta ve mikroskop altında şeffaf olarak görünmektedirler (Vinardell ve Garcia, 2000).

Her bir zaman aralığının tamamlanmasından sonra, 100 µl hücre süspansiyonu eşit orandaki % 0.4' lük tripan mavisi ile karıştırılarak, 2 dakika oda ısında inkübe edilmiştir. Daha sonra boyanan hücrelerden 10 µl alınarak hemositometrede canlı (boyanmamış) hücreler sayılmıştır.

Başlangıç hücre sayılarına göre değişen canlı 5RP7 hücre büyüme eğrilerindeki değişim zamana karşı **Şekil 5**'de verilmiştir.

Her bir 5RP7 hücre konsantrasyonu zamana bağlı olarak doğru orantılı bir artış göstermiştir. Ancak başlangıç hücre sayısı 125 ve 250 olan kuyularda hücre sayısının yüzey alanına olan oranın düşük olması nedeni ile hücreler arasındaki etkileşim gerçekleşmemekte ve bunun sonucu olarak da bu kuyularda hücre büyümesi tespit edilememiştir (**Şekil 5**). Bunun aksine 5×10^3 ve 25×10^3 hücre sayısı ile başlandığında hücre çoğalmasının 72 saat sonra sırası ile 5×10^6 ve 12×10^6 değerlerine yükseldiği gözlenmiştir. Başlangıç hücre sayılarının 12.5×10^4 ve 6.25×10^4 'e yükseltilmesi ile de 48 saat sonra hücrelerin büyümeye devam ettiği ancak 24 ve 72 saat sonra ise büyümenin yavaşladığı bulunmuştur (**Şekil 5**).

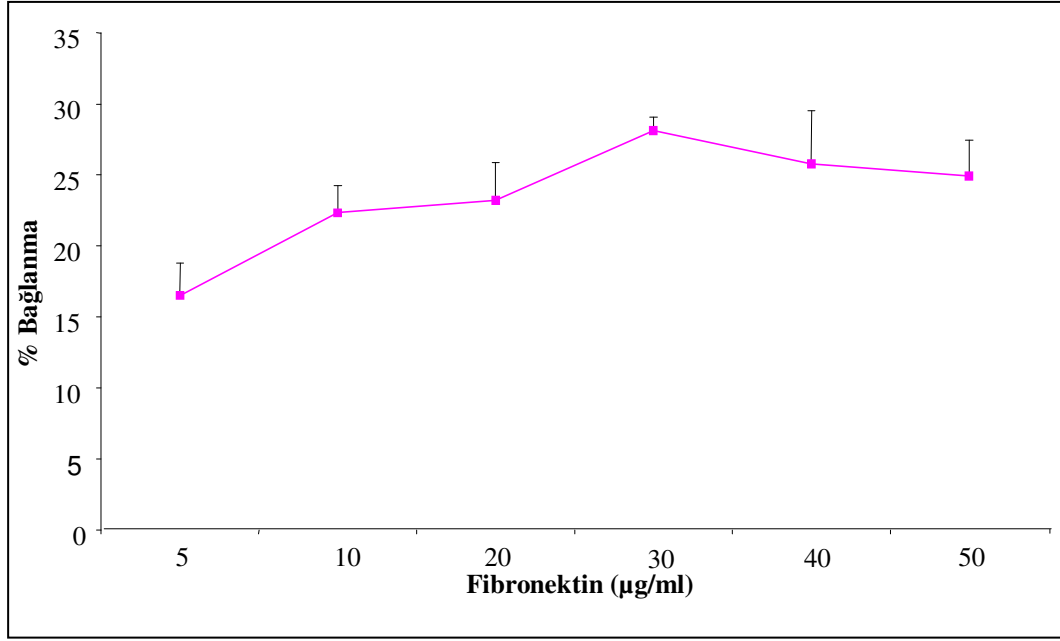
Bu sonuçlara göre optimum hücre sayısı 12.5×10^4 olarak belirlenmiştir.

5RP7 Hücrelerinin Fibronektin Proteinine Bağlanma Kapasiteleri

5RP7 sıçan embriyo hücrelerinin integrin reseptörleri aracılıklı fibronektin'e bağlanma kapasiteleri MTT deneyi ile belirlenmiştir. TBS içerisinde dilüe edilen 5RP7 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki fibronektin proteini (5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/ml) ile kaplanmış 96 kuyulu plakalara ekilerek 1 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi bitiminde hücreler, MTT ile muamele edilerek fibronektin proteinine bağlanma gösteren hücreler plaka okuyucuda belirlenmiş olup sonuçlar **Şekil 6**'da verilmiştir.

5RP7 hücrelerinin fibronektin proteinine bağlanma oranları konsantrasyona bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir. Hücrelerin 5, 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarındaki fibronektin proteinine sırası ile % 15, 22, 23 ve 27 oranlarında bağlandığı tespit edilmiştir. Fibronektin protein konsantrasyonunun 40 ve 50 µg/ml arttırılması ile bağlanma oranında da (sırası ile % 25 ve 24) bir düşme gözlenmiştir (**Şekil 6**).

5RP7 hücreleri 30 µg/ml oranındaki fibronektin proteinine maksimal oranda bir bağlanma göstermiştir.



Şekil 6. 5RP7 Hücrelerin Fibronektin'e Bağlanma Oranlarının MTT ile Belirlenmesi. 96 kuyulu plakalar 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml Fibronektin dilüsyonları bir gece + 4 °C' de kaplanmıştır. 12.5×10^4 hücre/ml her bir kuyuya ekilmiştir ve MTT ile muamele edilerek hücre bağlanma oranı % olarak hesaplanmıştır. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir (n=6)

5RP7 hücrelerinin fibronektin'e bağlanma oranları, hem fibronektin konsantrasyonuna hem de hücre yüzey integrin reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu hücrelerin fibronektin reseptörleri olarak bilinen $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ ya da $\alpha_v\beta_6$ integrinlerden biri ya da bir kaçının aktivasyonu sonucunda fibronektin proteinine bağlanma gösterdiği düşünülmektedir. Laboratuvarımızda, 5RP7 hücrelerinin yüzey integrin haritalarının belirleme ile ilgili çalışmaları devam etmektedir. Bu hücrelerin fibronektin'e bağlanmasında etken olan integrin reseptörlerinin tayin ve aktivitelerinin belirlenmesinden sonra da inhibisyon çalışmaları ile bağlanmanın spesifitesinin belirlenmesi düşünülmektedir.

Bu bağlamda, her hücre içerdiği yüzey integrin reseptör profiline göre fibronektin'e farklı oranlarda bağlanma göstermektedir. Örneğin, MCF-7 hücrelerinin kullanılarak yapılan bir çalışmada, bu hücrelerin kullanılan tüm konsantrasyondaki fibronektine etkili bir şekilde bağlandığını (Das ve ark., 2007) gösterirken, WEHI-3B hücrelerinin (Giancotti ve ark., 1986) yalnızca 25 µg/ml fibronektine en yüksek oranda bağlandığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, P ve K fetüs fibroblast hücreleri 5µg/ml fibronektine % 80 (Lebbe ve ark., 1997), HM1-IMSS (Franco ve ark., 1997) hücresi 100 µg/ml fibronektine % 100; HCE hücreleri 10 µg/ml fibronektine (Kimura ve ark., 2006) % 600, HCV29 hücreleri aynı orandaki fibronektine % 70, T24 hücreleri % 10 (Przybylo ve ark., 2005), HUVEC hücrelerinin ise % 80 (Sheu ve ark., 1997) oranında bağlandığı tespit edilmiştir.

Fibronectin'e Bağlı 5RP7 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi

Petri kapları, 10 µg/ml ya da 30 µg/ml konsantrasyonundaki fibronectin ve hücrelerin bağlandığı ancak hücre yayılmasının gerçekleşmediği poly-L-Lizin (5 µg/ml) ile +4 °C' de 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, 5RP7 hücreleri tripsinlenerek fibronectin ya da poly-L-Lizin ile kaplanmış petrilere ekilerek 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Apoptotik DNA Ladder Kit (Roche) prosedürüne göre izole edilen genomik DNA'lar, % 1.2' lik agaroz jel üzerinde 50 V akım ile 1.5 saat yürütülmüştür ve jel DNA görüntüleme cihazı (Kodak) ile görüntülenmiştir (Şekil 7).

Apotozun en önemli özgül yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Agaroz jel elektroforezi DNA kırıklarının gösterildiği bir yöntemdir. DNA 180 bp ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan kırıldığı için merdiven görüntüsü "Ladder pattern" oluşturmaktadır (http-4).

M 1 2 3 4



Şekil 7. Fibronectin'e Bağlı 5RP7 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi. Değişik konsantrasyonlardaki Fibronectin (10 µg/ml, 30 µg/ml) ve 5 µg/ml poly-L-lizin kaplı petrilere ekim yapılarak 2 saat inkübe edilen 5RP7 hücrelerinin DNA'ları Apoptotik DNA Ladder Kit prosedürüne uygun olarak izole edilip 1.5 saat 50 V akım ile % 1.2'lik agaroz jel üzerinde yürütülmüş, apoptotik DNA'lar DNA görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir. M: DNA Markır, 1: Pozitif Kontrol, 2: poly-L-Lizinkaplı yüzey + 5RP7 Hücreleri, 3: 30 µg/ml Fibronectin kaplı yüzey + 5RP7 Hücreleri, 4: 10 µg/ml Fibronectin kaplı yüzey + 5RP7 Hücreleri

Şekil 7'de görüldüğü gibi 30 µg/ml fibronectin ve poly-L-Lizin'e bağlanan 5RP7 hücrelerinin DNA'ları tek bant şeklinde görüntülenirken 10 µg/ml fibronectin'e bağlı 5RP7 hücrelerinin DNA'ları ise apoptotik DNA belirteci olan "merdiven görüntüsü" şeklinde görüntülenmiştir. Bu sonuca göre 30 µg/ml fibronectin ve poly-L-Lizin'e bağlı 5RP7 hücreleri canlılığını sürdürerek apoptoza gitmemiştir.

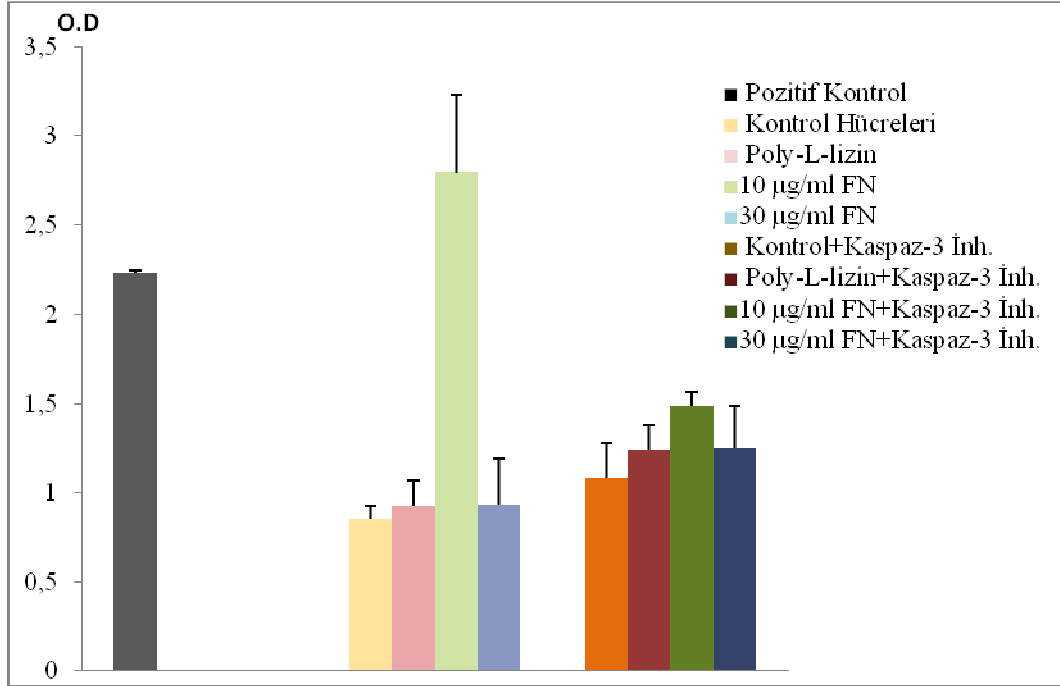
10 µg/ml fibronektin'e bağlı 5RP7 hücreleri ise canlılığını sürdürememiş apoptoza gitmiştir ve apoptotik DNA belirteci görüntüsüne paralel görüntü vermiştir.

Daha önce MTT yöntemi kullanılarak yapılan bağlanma deneyi ile 30 µg/ml fibronektine en yüksek oranda bağlandığı tespit edilmiştir (**Şekil 6**). 5RP7 hücrelerinin daha düşük konsantrasyondaki (10 µg/ml) fibronektine bağlanması ile DNA fragmentasyonunun oluşumu, yüksek konsantrasyondaki fibronektine bu hücrelerin daha sıkı bir şekilde bağlanması nedeniyle apoptotik mekanizmanın indüklenmediğini düşündürmektedir. Düşük konsantrasyonda bağlanmasında zayıf olması nedeni ile fibronektin bu hücrelerde apoptoza indüklediği sanılmaktadır.

Agaroz jel elektroforezi ile fibronektin kaplı yüzeye bağlanan Pasifik Oyster (*Crassostrea, gigas*) hemocytes hücrelerinin apoptoza gitmediği belirlenmiştir (Terahara ve ark., 2005). Fibronektin'in $\alpha_5\beta_1$ integrine bağlanmasının, ölümsüzleşmiş tiroid hücrelerin (TAD-2)'nin apoptoza gitmesinin engellenmesinde etkili olduğu (Vitale ve ark., 1998), mast hücrelerinin aktifleşmesi ile salgılanan chymase'in , FN'nin matriks kısmının bozulmasına sebep olduğundan SMCs (kalp düz kası hücreleri)'nin apoptoza gitmesini indüklediği (Leskinen ve ark., 2003), insan endotiyal hücrelerinin, yüksek fibronektin konsantrasyonlarında apoptoza gitmezken, düşük fibronektin konsantrasyonlarında apoptoza gittiği (Re ve ark., 1994), Integrin Linked Kinaz (ILK, integrine bağlı kinaz) apoptoz oranını artırdığı ve FN'nin ILK'ye bağlandığında radyasyon uygulanan HL60 (insan lösemi hücreleri)'nde apoptozun artan fibronektin konsantrasyona bağlı olarak azaldığı (Hess ve ark., 2007) belirlenmiştir.

Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Fibronektin'in 5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Fibronektin (10 µg/ml, 30 µg/ml) ve 5 µg/ml poly-L-Lizin ile kaplanan hücre kültürü plakalarına 24 saat sonra 5RP7 hücreleri ekim yapıldıktan sonra 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra farklı plakalara 10 µM kaspaz-3 (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) ve 10 µM kaspaz-9 (Z-Leu-Glu (OMe)-His-Asp (OMe)-CH₂F) inhibitörleri ile 1 saat 37 °C'de inkübasyona tabi tutularak enzim aktivasyonunun baskılanması sağlanmıştır. İnkübasyon işleminden sonra kuyucuklara ABTS tablet çözeltisi eklenerek 405 nm'de ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucuda ölçüm yapılmıştır (**Şekil 8, 9**).



Şekil 8. Kaspaz-3 İnhibitörü Varlığında Çeşitli Konsantrasyonlardaki Fibronektin'in 5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi. ■: Pozitif kontrol, ■: 5RP7 kontrol Hücreleri, ■: 5 µg/ml poly-L-lizin + 5RP7 hücreleri, ■: 10 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri, ■: 30 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri, ■: 5RP7 Kontrol Hücreleri + 10 µM Kaspaz-3 İnhibitörü, ■: 5 µg/ml poly-L-Lizin + 5RP7 Hücreleri + 10 µM Kaspaz-3 İnhibitörü, ■: 10 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri + 10 µM Kaspaz-3 İnhibitörü, ■: 30 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri + 10 µM Kaspaz-3 İnhibitörü. Deney 2 kez tekrarlanmıştır

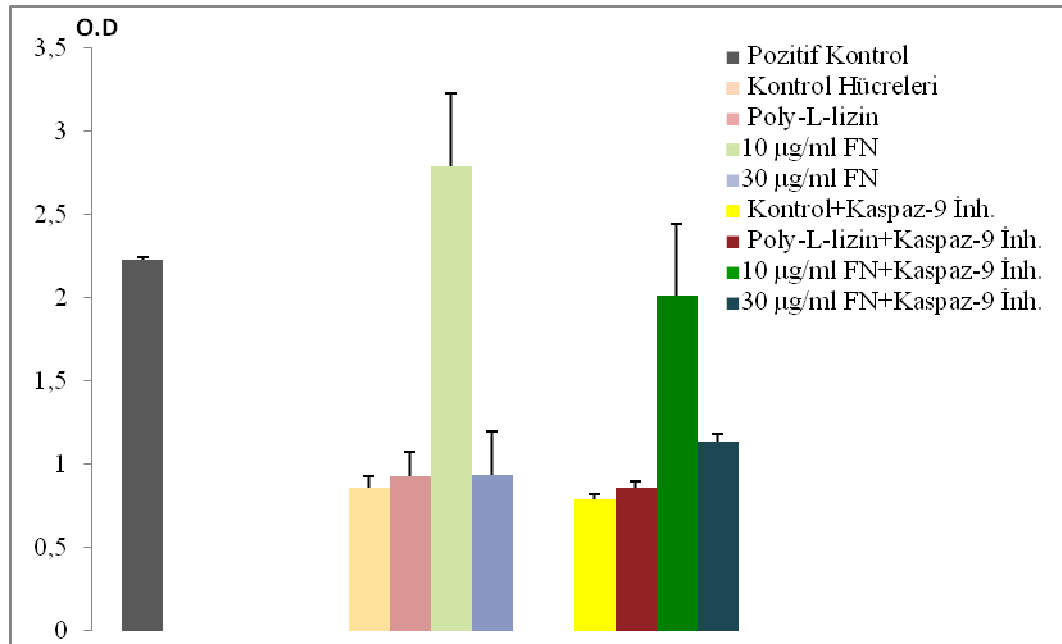
Pozitif kontrol olarak kullanılan nükleozomal DNA parçalanma oranı % 100 kabul edilerek (O.D. 2.2) fibronektin'e bağlı ve/veya inhibitör varlığındaki 5RP7 hücrelerinin DNA parçalanma oranlarının yüzdeleri hesaplanmıştır. Buna göre, ekstrasellüler protein içermeyen kuyucuklara ekilen hücrelerdeki (kontrol hücre) DNA parçalanma oranı % 36 bulunurken benzer şekilde poly-L-lizin ile kaplı kuyucuklara ekilen 5RP7 hücre DNA parçalanma oranı % 40 olarak bulunmuştur (Şekil 8). Buna karşı DNA fragmentasyon çalışmasından elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde 10 µg/ml fibronektin üzerine bağlanan 5RP7 hücre DNA parçalanma oranı % 127 olarak hesaplanmıştır ki bu oran pozitif kontrolden daha yüksektir. Ancak fibronektin konsantrasyonu 30 µg/ml'ye çıkarıldığında ise DNA parçalanma oranı kontrol hücre oranına yakın bulunmuştur (% 40). Bu bulguda yine DNA fragmentasyon deneyinde elde ettiğimiz sonuçlarla birebir örtüşmektedir (Şekil 7).

5RP7 hücrelerinde fibronektin'in uyardığı apoptoz mekanizması üzerinde kaspaz-3 enzim aktivasyonunun etkisini araştırmak üzere fibronektin'e bağlı hücrelere 10 µM kaspaz-3 inhibitörü (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) eklenerek DNA parçalanma oranı ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, kontrol hücrelerinde (% 54), poly-L-lizin'e bağlı hücrelerde (% 59) ve 30 µg/ml fibronektin'e bağlı hücrelerde (% 59) DNA parçalanmasında kaspaz-3 aktivasyonunun rol oynamadığını göstermektedir. Bunun aksine özellikle 10 µg/ml fibronektin'e bağlı 5RP7 hücre

DNA parçalanma oranı kaspaz-3 enziminin inhibisyonu sonucunda % 50 oranında baskılanmıştır.

Bu nedenle 10 µg/ml fibronektin'e bağlı 5RP7 hücre apoptoz mekanizmasında kaspaz-3 enziminin aktive olarak bu hücrelerde DNA fragmentasyonuna neden olduğu sanılmaktadır.

İnsan monosit hücrelerinde FN6 peptidi kullanıldığında başlayan apoptozda kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonu gözlenmiş, kaspaz-3'ün aktivasyonunda kaspaz-9'un da rol aldığı ve spesifik kaspaz inhibitörleri kullanılarak yapılan deneylerde apoptoz oranının azaldığı belirlenmiştir (Natal ve ark., 2006). İnsan bronşiyal epitelyum hücrelerinde (BEAS-2B and 16-HBE) fibronektin, kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitelerini engelleyerek ve DNA parçalanmasını azaltarak apoptozu engellemiştir (Han ve Roman, 2006). ECM'siz olarak inkübe edilen kontrol dokularda görülen orta derecedeki kaspaz aktivitesinde, ZVAD caspase-3 inhibitörü kullanıldığında fibronektin, kolajen ve LPA'nın kaspaz-3 aktivitesini 0.5'ten 0.2'ye kadar düşürdüğü gözlenmiştir (Svoboda ve ark., 2006). Dana retina perisit kültür hücrelerinde modifiye edilen fibronektin'in kaspaz-3 aktivitesi ve apoptozu artırdığı gözlenmiştir (Bingfen ve ark., 2004).



Şekil 9. Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Çeşitli Konsantrasyonlardaki Fibronektin'in 5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi. ■: Pozitif kontrol, ■: 5RP7 kontrol Hücreleri, ■: 5 µg/ml poly-L-lizin + 5RP7 hücreleri, ■: 10 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri, ■: 30 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri, ■: 5RP7 Kontrol Hücreleri + 10 µM Kaspaz-9 İnhibitörü, ■: 5 µg/ml poly-L-Lizin + 5RP7 Hücreleri + 10 µM Kaspaz-9 İnhibitörü, ■: 10 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri + 10 µM Kaspaz-9 İnhibitörü, ■: 30 µg/ml Fibronektin + 5RP7 Hücreleri + 10 µM Kaspaz-9 İnhibitörü. Deney 2 kez tekrarlanmıştır

5RP7 hücre integrinlerinin fibronektin'e bağlanarak hücre içine gönderdikleri sinyal ya ölüm reseptörlerinin aktivasyonu sonucunda olduğu gibi kaspaz-8 ve

kaspaz-3'ün aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur ya da mitokondrial yolda mitokondriden sitokrom c'nin salınımı gerçekleşerek sitokrom c'nin Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozomları oluşturarak DNA fragmentasyonuna neden olabilir (Clermont ve ark., 2003). $\alpha_v\beta_5$ ve $\alpha_6\beta_1$ integrinlerinin CCN1 substratına bağlanması ile kaspaz 8/10 aktive ettiği ve daha sonra bax-düzenlediği bir mekanizma ile mitokondrilerden sitokrom c'nin salınımının gerçekleşmesi ile kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2007).

Bu nedenle fibronektin'e bağlı 5RP7 hücrelerinde mitokondrial yolun son basamağı olan kaspaz-9 aktivasyonunun rolü inhibitör varlığında incelenmiştir (**Şekil 9**). Buna göre, kaspaz-9 inhibitörü (Z-Leu-Glu (OMe)-His-Asp (OMe)-CH₂F) varlığında kontrol, poly-L-lizine bağlı ve 30 µg/ml fibronektine bağlı 5RP7 hücrelerinin DNA parçalanma oranlarında belirli bir inhibisyon gözlenmemiştir. Buna karşın 10 µg/ml fibronektin'e bağlanan 5RP7 hücre DNA parçalanma oranı % 120 iken, kaspaz-9 inhibitörünün eklenmesi ile bu oran % 86'ya düşmüştür. Kaspaz-9 enziminin fibronektin'e bağlı 5RP7 hücre apoptozunda etkili olduğu düşünülmektedir.

zLEHD'nin başlattığı kaspaz-9 inhibisyonunun, HL60 (insan lösemi hücresi) süspansiyon kültürlerinin aksine, fibronektin içerisinde radyasyonun başlattığı kaspaz aktivasyonunu engellemekte yetersiz kaldığı belirlenmiştir (Hess ve ark., 2007). Fibronektin bağlı T24 hücrelerinin (human bladder cancer cell lines), kaspaz-9 ve AIF'nin başlattığı döngünün inhibisyonuyla, mitomycin C (MMC)'in başlattığı apoptoza direnç gösterdiği belirlenmiştir (Pan ve ark., 2009). Serumsuz hepatik stellat hücrelerinde fibronektin'in yaşama oranını arttırdığı, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Rodriquez-Juan ve ark., 2009). FN'nin matriks kısmının bozulmasının başlattığı apoptozda SMCs (kalp düz kası hücreleri)'nin, kaspaz-9 ve kaspaz-8 aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Leskinen ve ark., 2006). İnsan beyin kanseri hücrelerinde, matriks metalloproteinaz 9 (MM-9)'un fibronektin'e benzeyen tür II modül içeren katalitik alanlarının, DNA parçalanması ve kaspaz 9/3 aktivitelerinin arttığı apoptozu başlattığı bulunmuştur (Ezhilarasan ve ark., 2009).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında sonuç olarak, 5RP7 hücrelerinin 30 µg/ml fibronectin'e % 27 oranında bağlandığı bulunmuştur. Bu bağlanma sırasında 5RP7 hücre yüzeyinde bulunduğu düşünülen $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ ya da $\alpha_v\beta_6$ fibronectin resptörlerinden biri ya da bir kaçı sorumlu olabilir. Bu hücrelere özgü integrin haritasının çıkarılması çalışmalarının ileri aşamalarda yapılması düşünülmektedir. Fibronectinin hücre apoptozu üzerindeki etkileri DNA fragmentasyon çalışmaları ile incelenmiştir. DNA fragmentasyonu yalnızca 10 µg/ml fibronectin ile kaplı yüzeylere bağlanan hücrelerde gözlenmiştir. Bu sonuçlar Elisa yöntemi ile de desteklenmiştir. Gözlenen apoptotik etki mekanizmasının araştırılmasında ise hem dış apoptotik yolağın hem de mitokondrial yani iç apoptotik yolağın aktive ettiği kaspaz-3 enzim aktivitesi inhibitör varlığında incelenmiştir. 10 µg/ml fibronectine bağlanan hücrelerde meydana gelen DNA parçalanma oranı kaspaz-3 enzim inhibitörü varlığında % 50 oranında inhibe edilmiştir. Bu hücrelerde fibronectine bağlı apoptotik mekanizmanın mitokondrial yolak üzerinden tetiklenip tetiklenmediği ise kaspaz-9 inhibitörü kullanılarak araştırılmıştır. Bunun sonucunda da kaspaz-9'unda bu hücre apoptozunda etkili olduğu sanılmaktadır.

Bu bulgular ışığında fibronectine bağlı 5RP7 apotoz mekanizmasının mitokondrial yolaktan ya da endoplazmik retikuluma bağlı $[Ca]^{+2}$ artışı sonucunda kaspaz-12'nin ve daha sonra kaspaz-9'un aktivasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle ileri ki çalışmalarda mitokondrial membran potansiyeli ve sitokrom c'nin salınım oranının ölçülmesi planlanmaktadır. Bu mekanizmaların aydınlatılması kanser tedavisinde ilaç geliştirme açısında yararlı olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Adjei, A.A., Blocking oncogenic ras signaling for cancer therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 93 (14), 1062-1074 (2001).
- Alonio, L.V., Picconi M.A., Dalbert, D., Mural, J., Bartt, O., Bazan, G., Dominguez, M., Teyssie, A.R., Ha-ras oncogene mutation associated to progresion of papillomavirus induced lesions of uterine cervix, *J. Clin. Virol.*, 27 (3), 263-269 (2003).
- Beaulieu, J.F., Ektracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation, *Prog. Histochem. Cytochem.*, 31 (4), 1-78 (1997).
- Bingfen, L., Bhat, M., Padival, Adival, A.K., Smith, D.G., Nagaraj, R.H., Effect of dicarbonyl modification of fibronectin on retinal capillary pericytes, *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 45 (6), 1983-1995 (2004).
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature*, 349, 117-127 (1991).
- Brito, O.M., Scorrano, L., Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: The role of Ras, *Mitochondrion*, 9 (3), 222–226 (2009).
- Chen, C.C., Young, J.L., Monzon, R.I., Chen, N., Todorovic, V., Lau, L.F., Cytotoxicity of TNF α is regulated by integrin-mediated matrix signaling, *The EMBO J.*, 26, 1257-1267 (2007).
- Chitnis, N.S., D’Costa, S.M., Paul, E.R., Bilimoria, S.L., Modulation of iridovirus-induced apoptosis by endocytosis, early expression, JNK, and apical caspase, *Virol.*, 370 (2), 333–342 (2008).
- Choi, B.H., Kim, W., Wang, Q.C., Kim, D.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Kim, K.T., Yoon, H.S., Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells, *Cancer Lett.*, 261 (1), 37–45, (2008).
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K., Caspases-An update, *Comparative Biochem. and Physiology, Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 151, 10-27, (2008).
- Clermont, F., Adam, E., Dumont, J.E., Robaye, B., Survival pathways regulating the apoptosis induced by tumour necrosis factor- α in primary cultured bovine endothelial cells, *Cel. Signalling*, 15 (5), 539-546 (2003).
- Das, S., Banerji, A., Frei, E., Chatterjee, A., Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium, *82*, 467–476 (2007).
- Dickinson, C.D., Veerapondion, B., Dai, X.P., Hamlin, R.C., Xuong, N.H., Ruoslahti, E., Ely, K.R., Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin, *J. Mol. Biol.*, 236 (4), 1079-1092 (1994).

Ezhilarasan, R., Jadhav, U., Mohanam, I., Rao, J., Gujrati, M., Mohanam, S., The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice, *Int. J. Cancer*, 124, 306–315 (2009).

Farias, E., Lu, M., Li, X., Schnapp, L.M., Integrin $\alpha_8\beta_1$ -fibronectin interactions promote cell survival via P13 kinase pathway, *Biochem. Biophysical Res. Communications* 329 (1), 305-311 (2005).

Fehrenbacher, N., Bar-Sagi, D., Philips, M., Ras/MAPK signaling from endomembranes, *Mol. Oncol.*, 3 (4), 297-307 (2009).

Feire, A.L., Koss, H., Compton, T., Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain, *Proc. Notl. Acad Sci USA*, 101 (43), 15470 -15475 (2004).

Ferbeyre, G., Bourdeau, V., Cedergren, R., Does HIV tat protein also regulate genes of other viruses present in HIV infection?, *Trends Biochem Sci.*, 22 (4), 115-6 (1997).

Franco, E., Vazquez-Prado, J., Meza, I., Fibronectin-derived fragments as inducers of adhesion and Chemotaxis of entamoeba histolytica trophozoites, *J.I.D.*, 176, 1597-1602 (1997).

Galownia, N.C., Kushiro, K., Gong, Y., Asthagiri, A.R., Selective desensitization of growth factor signaling by cell adhesion to fibronectin, *J.Biol. Chem.*, 282, 21758–21766 (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).

Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., Tarone, G., Fibronectin-plasma membrane interaction in the adhesion of hemopoietic cells, *J. Cell Biol.*, 103, 429-437 (1986).

Giancotti, F. G., Ruoslahti, E., Elevated levels of the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells, *Cell*, 60 (5), 849-859 (1990).

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E., Interaction of fibronectin with integrins, *Sci.*, 285 (5430), 1028-1033 (1999).

Grosse, J., Grimm, D., Westphal, K., Ulbrich, C., Moosbauer, J., Pohl, F., Koelbl, O., Infanger, M., Eilles, C., Schoenberger, J., Radiolabeled annexin V for imaging apoptosis in radiated human follicular thyroid carcinomas is an individualized protocol necessary?, *Nuclear Med. Biol.*, 36 (1), 89–98 (2009).

Han, S.V., Roman, J., Fibronectin induces cell proliferation and inhibits apoptosis in human bronchial epithelial cells: pro-oncogenic effects mediated by PI3-kinase and NF- κ B, *Oncogene*, 25, 4341-4349 (2006).

Hayashi, K., Hayashi, T., Morita, N., Niwayama, S., Antiviral activity of an *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type I, *Planta Med.*, 56 (5), 439-443 (1990).

Hess, F., Estrugo, D., Fischer, A., Belka, C., Cordes, N., Integrin-linked kinase interacts with caspase-9 and -8 in an adhesion-dependent manner for promoting radiation-induced apoptosis in human leukemia cells, *Oncogene*, 26, 1372–1384 (2007).

Huang, Z., Pinto, J.T., Deng, H., Richie J.P., Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation, *Biochem. Pharmacol.*, 75 (11), 2234 – 2244 (2008).

Hynes, R.O., Zhao, Q., The evolution of cell adhesion, *J. Cell Biol.*, 150 (2), F89-F96 (2000).

Hynes, R.O., *Fibronectins*, Springer-Verlag, New York, (1990).

http-1 *Ras* aktivasyonu, http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/studentsspring2000/hutchins_ras.htm/

http-2 İntegrinin temel yapısı, <http://www.scq.ubc.ca/the-role-of-integrins-in-wound-healing/> (08.2005)

http-3 Apoptoz aktivasyonu, <http://www.tkd.org.tr/pages.asp?pg=:dergi/dergicontent&plng=tur&id=1643&dosya=159> (03.2004).

http-4 Agaroz jel elektroforezi test prensibi, http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf (11.04.2003).

Kadler, K.E., Hill, A., Cantyl-Laird, E.G., Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators, *Curr. Opin. Cell Biol.* 20(5), 495-501 (2008).

Karreth, F.A., Tuveson, D.A., Modelling oncogenic Ras/Raf signalling in the mouse, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 19 (1), 4–11 (2009).

Kikuchi, A., Demo, S.D., Ye, Z.H., Chen, Y.W., Williams, L.T., raIGDS family members interact with the effector loop of ras p21, *Mol. Cell. Biol.*, 14 (11), 7483-7491 (1994).

Kimura, K., Kawamoto, K., Teranishi, S., Nishida, T., Role of Rac1 in fibronectin-induced adhesion and motility of human corneal epithelial cells, *IOVS*, 47 (10), 4323-4329 (2006).

Lebbe, C., Font, J., Bonavanture, J., Pichon, J., Wantyghem, J., Rossi, M., Haentjens, G., Cohen-Solal, L., Aubery, M., Altered collagen of human pathological fibroblasts impairs the synthesis of fibronectin, *Matrix Biol.*, 15 (7), 503-507 (1997).

Lee, J.H., Jung, J.Y., Jeong, Y.J., Park, J.H., Yang, K.H., Choi, N.K., Kim, S.H., Kim, W.J., Involvement of both mitochondrial and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts, *Toxicol.*, 243 (3), 340–347 (2008).

Lee, R.M., Choi, H., Shin, J.S., Kim, K., Yoo, K.H., Distinguishing between apoptosis and necrosis using a capacitance sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (8), 2586–2591 (2009).

- Leiss, M., Beckmann, K., Giros, A., Costell, M., Fassler, R., The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20 (5), 502-507 (2008).
- Leitingher, B., Hohenester, E., Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.*, 26 (3), 146-155 (2007).
- Leskinen, M.J., Lindstedt, K.A., Wang, Y., Kovanen, P.T., Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by a mechanism involving fibronectin degradation and disruption of focal adhesions, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 23 (2), 238-243 (2003).
- Leskinen, M.J., Heikkila, H.M., Speer, M.Y., Hakala, Laine, M., Kovanen, P.T., Lindstedt, K.A., Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by disrupting NF- κ B-mediated survival signaling, *Exp. Cell Res.*, 312, 1289–1298 (2006).
- Liang, Q., Li W., Zhou B., Caspase-independent apoptosis in yeast, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1783 (7), 1311–1319 (2008).
- Magee, T., Marshall, C., New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane, *Cell*, 98 (1), 9–12 (1999).
- Main, A.L., Harvey, T.S., Baron, M., Boyd, J., Campbell, I.D., The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions, *Cell*, 71 (4), 671-678 (1992).
- Marin, L., Minguela, A., Moya-Quiles, M.R., Torio, A., Muro, M., Garcia-Alonso, A.M., Sanchez-Bueno, F., Bru, M., Parrilla, P., Álvarez-Lopez, M.R., Expression of CD95 and apoptosis induction in peripheral blood cells from liver graft recipients, *Trans. Proc.*, 34 (1), 280-282 (2002).
- Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D.V., Sordat, I., Beug, H., Reichmann, E., Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization, *Oncogene*, 24 (12), 2032–2041 (2005).
- Mather, A., Chen, X.M., McGinn, S., Field, M.J., Sumual, S., Mangiafico, S., Zhang, Y., Kelly, D.J., Pollock, C.A., High glucose induced endothelial cell growth inhibition is associated with an increase in TGF β_1 secretion and inhibition of Ras prenylation via suppression of the mevalonate pathway, *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, 41 (3), 561-569 (2009).
- Mitra, A., Chakrabarti, J., Banerji, A., Das, S., Chatterjee, A., Culture of human cervical cancer cells, SiHa, in the presence of fibronectin activates MMP-2, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 132 (8), 505-513 (2006).
- Moir, L.M., Burgess, J.K., Black, J.L., Transforming growth factor β_1 increases fibronectin deposition through integrin receptor $\alpha_5\beta_1$ on human airway smooth muscle, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121 (4), 1034-1039 (2008).
- Mossman, T., Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunolog. Meth.*, 65 (1-2), 55-63 (1983).

Natal, C., Osés-Prieto, J.A., Pelacho, B., Iraburu M.J., Lopez-Zabalza, M.J., Regulation of apoptosis by peptides of fibronectin in human monocytes, *Apoptosis*, 11, 209–219 (2006).

Newell, P., Toffanin, S., Villanueva, A., Chiang, D.Y., Minguez, B., Cabellos, L., Savic, R., Hoshida, Y., Lim, K.H., Melgar-Lesmes, P., Yea, S., Peix, J., Deniz, K., Fiel, M.I., Thung, S., Alsinet, C., Tovar, V., Mazzaferro, V., Bruix, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Friedman, S.L., Llovet, J.M., Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo, *J. Hepatol.*, 51 (4), 725–733 (2009).

Ngan, H.Y.S., Liu, S.S., Yu, H., Liu, K.L., Cheung, A.N.Y., Proto-oncogenes and p53 protein expression in normal cervical stratified squamous epithelium and cervical intra-epithelial neoplasia, *Eur. J. Cancer*, 35 (10), 1546–1550 (1999).

O’Leary, J.J., Landers, R.J., Silva, I., Uhlmann, V., Crowley, M., Healy, I., Luttich, K., Molecular analysis of ras oncogenes in CIN III and in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix, *J. Clin. Pathol.*, 51(8), 576–582 (1998).

Palmioli, A., Sacco, E., Airoidi, C., Nicolantonio, F.D., D’Urzo, A., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Domizio, A.D., Gioia, L.D., Martegani, E., Bardelli, A., Peri, F., Vanoni, M., Selective cytotoxicity of a bicyclic Ras inhibitor in cancer cells expressing K-Ras^{G13D}, *Biochem. and Biophys. Res. Communications*, 386 (4), 593–597 (2009).

Pamonsinlapatham, P., Hadj-Slimane, R., Lepelletier, Y., Allain, B., Toccafondi, M., Garbay, C., Raynaud, F., P120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): A multi-interacting protein in downstream signaling, *Biochim.*, 91 (3), 320–328 (2009).

Pan, C.W., Shen, Z., Jun, Wu, T., Tang, X.Y., Wang, M., Sun, J., Shao, Y., Cell adhesion to fibronectin induces mitomycin C resistance in bladder cancer cells, *BJU Int.*, 104 (11), 1774–1779 (2009).

Pankov, R., Yamada, K.M., Fibronectin at a glance, *J. Cell. Sci.*, 115 (20), 3861–3863 (2002).

Przybylo, M., Litynska, A., Pocheć, E., Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urothelial and T24 Bladder cancer cells: role of glycosylation, *Biochim.*, 87, 133–142 (2005).

Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfranccone, L., Dejana, E., Colotta, F., Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells, *J. Cell Biol.*, 127 (2), 537–546 (1994).

Reyes-Reyes, M.E., George, M.D., Roberts, J.D., Akiyama, S.K., P-selectin activates integrin-mediated colon carcinoma cell adhesion to fibronectin, *Exp. Cell Res.*, 312 (20), 4056–4069 (2006).

Rodriguez-Juan, C., Torre, P., Garcia-Ruiz, I., Diaz-Sanjuan, T., Munoz-Yague, T., Gomez-Izquierdo, E., Solis-Munoz, P., Solis-Herruzo J.A., Fibronectin increases survival of rat hepatic stellate cells - a novel profibrogenic mechanism of fibronectin, *Cell. Physiol. Biochem.*, 24, 271–282 (2009).

Schwartz, M.A., Ginsberg, M.H, Networks and crosstalk: integrin signalling spreads, *Nat. Cell Biol.*, 4 (4), E65-E68 (2002).

Schwarzbauer, J.E., Patel, R.S., Fonda, D., Hynes, R.O., Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript, *EMBO J.* 6 (9), 2573-2580 (1987).

Serini, G., Valdembrì, D., Bussolino, F., Integrins and angiogenesis: A sticky business, *Exp. Cell Res.*, 312 (5), 651-658 (2006).

Sethi, T., Ginsberg, M.H., Downward, J., Hughes, P.E., The small GTP-binding protein *R-Ras* can influence integrin activation by antagonizing a *Ras/Raf* initiated integrin suppression pathway, *Mol. Biol. of Cell.*, 10 (6), 1799-1809 (1999).

Sharifi, A.M., Eslami, H., Larijani, B., Davoodi, J., Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells, *Neuroscience Letters*, 459, 47-51 (2009).

Sheu, J.R., 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- $\alpha_v\beta_3$ integrin monoclonal antibody, *Biochim. Biophys. Acta*, 1336 (3), 445-454 (1997).

Shibayama, H., Anzai, N., Braun, S.E., Fukuda, S., Mantel, C., Broxmeyer, H. E., *H-Ras* is involved in the inside-out signaling pathway of interleukin-3-induced integrin activation, *Blood*, 93 (5), 1540 -1548 (1999).

Skinner, J., Bounacer, A., Bond, J.A., Haughton, M.F., deMicco, C., Wynford-Thomas, D., Opposing effects of mutant *ras* oncoprotein on human fibroblast and epithelial cell proliferation: implications for models of human tumorigenesis, *Oncogene*, 23, 5994-5999 (2004).

Sottile, J., Hocking, D.C., Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesion, *Mol. Biol. Cell*, 13 (10), 3546 -3559 (2002).

Strachan, L.R., Condic, M.L., Neural crest motility on fibronectin is regulated by integrin activation, *Exp. Cell Res.*, 314 (3), 441-452 (2008).

Tanaka, Y., Nakayamada, S., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Kataoka, T., ve Minami, Y., *H-Ras*/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts, *J. Biol. Chem.*, 277(24), 21446-21452 (2002).

Teraharaa, K., Takahashi, K.G., Mori, K., Pacific oyster hemocytes undergo apoptosis following cell-adhesion mediated by integrin-like molecules, *Biochem. and Physiol.*, 141 (2), 215-222 (2005).

Tian, H., Zhang, K.H., Gao, X., Lei, W.W., Zhang, L., Yu, M.L., Song, J.G., Zhao, F.G., Comparative proteomic analysis of cell cycle-dependent apoptosis induced by transforming growth factor- β , *Biochem. Biophys. Acta*, 1794 (10), 1387-1397 (2009).

Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., Sander, C., The *ras* protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids, *Biochem.*, 30 (19), 4637-4648 (1991).

Van Le, L., Stoerker, J., Rinehart, C.A., Fowler, W.C., H-*ras* codon 12 mutation in cervical dysplasia, *Gynecol. Oncol.*, 49, 181-184 (1993).

Vinardell M.P., Garcia L., The quantitative chloroallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails, *Toxicol. in Vitro*, 14 (6), 551-555 (2000).

Vitale, M., Matola, T.D., Fenzi, G., Illario, M., Rossi, G., Fibronectin is required to prevent thyroid cell apoptosis through an integrin-mediated adhesion mechanism, *J. Clin. Endoc. And Metabolism*, 83 (10), 3673-3680 (1998).

Wu, R.F., Terada, L.S., Ras and Nox: Linked signaling networks? *Free Radical Biol. Med.*, 47 (9), 1276-1281 (2009).

Xing, L., Boyce, B.F., Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells, *Biochem. Biophysical Res. Communications*, 328, 709-720 (2005).

Zeytinoğlu, H., İncesu, Z., and Baser, K.H.C., Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-*ras* oncogene, *Phytomed.*, 10 (4), 292-299 (2003).