

FİBRONEKTİN VE KOLAJEN IV'E BAĞLI 5RP7 HÜCRELERİNDE APOPTOZUN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF APOPTOSIS ON FIBRONECTIN AND COLLAGEN IV
ADHERED 5RP7 CELLS

Zerrin İNCESU, Çağlar FIRAT, Şerife AYDOĞDU

Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 26470

Tepebaşı-Eskişehir, TÜRKİYE

ÖZET

Fibronectin ve kolajen IV gibi ekstrasellüler proteinler; hücre gelişimi, hücre farklılaşması, doku oluşumu, hücre adezyonu ve yara iyileştirme gibi birçok hücreyel olayda görev almalarının yanı sıra kanser oluşumunda, metastazın gelişiminde ve apoptoz da önemli etkiye sahiptirler. Fibronectin ve kolajen IV ekstrasellüler proteinlerinin, doku ve hücre tipine bağlı olarak apoptotik mekanizmanın uyarılmasına ya da baskılanmasına neden oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmada, fibronectine ya da kolajen IV proteine bağlanan kanser sıçan embriyo fibroblast hücreleri kullanılarak embriyonik dönemde gelişen kanserlerde apoptotik mekanizma incelenmiştir. Bu nedenle, hücrelerin fibronectine ve kolajen IV'e bağlanma oranları belirlendikten sonra apoptotik indeksleri hesaplanmıştır. Bu hücrelerin fibronectine bağlanması ile geç apoptozu indüklediği tespit edilmiştir ancak bu etki kolajen IV 'e bağlanan hücrelerde gözlenmemiştir. Fibronectin ile uyarılan geç apoptoz mekanizmasında kaspaz-3 ve -9'un aktive olduğu ancak inhibisyon çalışmaları kaspaz-3'ün mekanizmada daha etkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Kanser, Hücre Kültürü, Fibronectin, Kolajen IV, Apoptoz.

ABSTRACT

Extracellular proteins such as fibronectin and collagen IV have a function in many cellular events such as cell growth, cell differentiation, tissue formation, cell adhesion, wound healing as well as have an important effects in the formation of cancer, the development of metastasis, and apoptosis. Extracellular proteins of fibronectin and collagen IV, depending on the type of tissue and cell have been shown to cause stimulation or inhibition of apoptotic mechanisms. In this study, using fibronectin or collagen IV protein-adhered cancer rat embryo fibroblast cells, cancer of the apoptotic mechanism in the embryonic period was

investigated. Therefore, after the binding ratios fibronectin or collagen IV-adhered cells were calculated, the apoptotic indices were determined. It was identified that these cells by binding to fibronectin induced late apoptosis, but this effect was not observed on collagen IV adhered cells. During the mechanism of fibronectin-induced late apoptosis, caspase-3 and -9 were activated, but inhibition studies were shown that the mechanism of caspase-3 was more effective.

Key words: Cancer, Cell Culture, Fibronectin, Collagen IV, Apoptosis.

GİRİŞ

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, embriyonik gelişimin ve doku homeostazının dengede tutulmasını sağlayan genel bir mekanizmadır (1,2). Nekrozdan farklı olarak, apoptoz; hormona bağımlı doku atrofisi, timusta lenfosit olgunlaşması, morfogenez gelişiminin düzenlenmesi ve kanser gibi pek çok biyolojik süreçte rol oynamaktadır (3-5). Buna ek olarak, apoptotik hücreler; kromatin yoğunlaşması, genetik materyalin parçalanması (6), fosfotidil serin molekülünün translokasyonu, sitoplazmik hacmin kaybolmasından dolayı hücrenin küçülmesi ve hücre zarına bitişik hücrelerarası ortama uzanan "apoptotik cisim" lerin oluşması (7) gibi morfolojik değişimler bakımından nekrotik hücrelerden farklılık göstermektedirler.

Apoptotik mekanizmanın hücre içi uyarıcıları arasında yer alan kaspazlar, sistein proteaz ailesine ait olup, aspartat kalıntısından sonraki protein kısmının kesiminden sorumludurlar (8,9). Bu enzimler hücre içinde aktif olmayan proenzim formunda sentezlenirler ve apoptoz mekanizmasının uyarılması ile düşük yerel konsantrasyonda bulunan başlangıç kaspazlarının konsantrasyonları hücre içi protein-protein etkileşimi ile artmaktadır (10). Bu miktar artışı ile birlikte, aktif hale gelen başlangıç kaspazları, efektör prokaspazların parçalanmasına ve buna bağlı olarak da aktif kaspazların oluşumuna ve kaspaz yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır (10). 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 (11). Kaspazların aktivasyonu çeşitli pro- ve anti-apoptotik sinyal iletim yolağı ile düzenlenmektedir.

Bu iletim yolları hücre-ekstrasellüler protein ya da hücre-hücre etkileşimi sonucunda uyarılmaktadır. Hücre zarında yer alan ve transmembran bağlanma reseptörleri olan integrinler aracılıklı ekstrasellüler proteinlere bağlanma, hücre tipine ve dokuya özelliği olarak hücre proliferasyonu, invazyon, yaşam ya da pro- apoptotik sinyallerin başlatılmasından sorumludur (12). Ekstrasellüler matriks glikoprotein ailesine ait olan fibronectin iki tane 250 kDa'luk alt üniteye sahip olup disülfid bağları ile birbirlerine bağlanmış bir yapıya sahiptir.

Bu çalışma, kanserli sıçan embriyo fibroblast hücrelerinin (5RP7) fibronektin ve kolajen IV ekstrasellüler proteinlerine bağlanma kapasitelerinin belirlenmesi ve bağlanmanın apoptoz mekanizması üzerine etkilerinin incelenmesi amacı ile yürütülmüştür.

MATERYAL YÖNTEM

Hücre Kültürü

Sıçan embriyo fibroblast 5RP7 (*H-ras* onkogeni transform hücreler) hücreleri % 10 fetal sığır serumu (FCS), 100 ünite/ml penisilin-streptomisin, %1 glutamin içeren dulbecco's modified eagle solüsyonu (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. 5RP7 hücre tipi hücre kültürü ortamına kolay adapte olduğu, hızlı çoğalma gösterdiği ve *H-ras* onkogenine bağlı kanser gelişimi göstermesi nedeniyle bu çalışmada tercih edilmiştir (13).

Deney öncesi hücreler toma lam yardımı ile sayılmışlar ve belirlenen sayılarda deney koşullarına uygun ortamlara ekildikten sonra 24 saat % 5 CO₂ içeren atmosfer ortamında inkübe edilmişlerdir.

Bağlanma Deneyi

Farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 20, 40 ve 50 µg/ml) fibronektin ve kolajen tip IV ekstrasellüler proteinleri Ca⁺² içeren Tris solüsyonu (24 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, % 0.1 bovine serum albümin (BSA), 2mM Glikoz) içerisinde hazırlanmıştır. Daha sonra 96-kuyulu plakaların her bir kuyucuğu 50 µl dilüe fibronektin ya da kolajen tip IV solüsyonu ile kaplanarak +4 °C' de bir gece inkübe edilmiştir. % 2'lik 100 µl BSA (w/v) solüsyonu ile spesifik olmayan bağlanma önledikten sonra, her bir kuyucuk 2 kez % 0.1'lik TBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücreler 0.25 % tripsin/EDTA ile toplanarak, 12.5 × 10⁴ hücre/ml Mg⁺² ve Ca⁺² içeren DMEM solüsyonu içerisinde süspansiyon haline getirildikten sonra 50 µl hücre süspansiyonu 96-kuyulu plakalara aktararak 37 °C 'de inkübe edilmiştir. Yıkama işleminden sonra, 50 µg/ml (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)(MTT) her bir kuyucuğa aktararak hücreler 37 °C 4 saat inkübe edilmiştir. Her bir kuyuya 100 µl DMSO eklenerek oda ısısında 10 dakika inkübasyona tabi tutularak, hücrelerdeki renk değişimi, EL × 808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir.

DNA Ekstraksiyonu ve Elektroforetik Analizi

Steril cam petriler, fibronektin (10 µg/ml ve 30 µg/ml), kolajen tip IV (10 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. Tripsin ile muamele edilen hücreler, iki kez DMEM ile yıkandıktan sonra 2 mM Ca⁺² ve 0.5 mM Mg⁺² içeren DMEM içerisinde süspansiyon edilmiş ve 1 × 10⁶ hücre/ml protein kaplı cam petrilere eklenmiş 2 saat 37 °C 'de inkübe edilmiştir.

Hücre DNA'ları apoptotik DNA-Ladder kit (Roche) prosedürüne uygun olarak izole edilmiştir. Her birine 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek, 800 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş, altta kalan sıvılar atılmıştır. Ekstre edilen DNA'ların filtreli tüpte toplanması amacı ile son santrifüj işleminde alttaki sıvı dökülmeden 8 saniye 1300 rpm'de santrifüj edilmiştir.

5 µl yükleme çözeltisi (Sigma, U.K.) 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 Apoptozun Tespiti

96-kuyulu plakalar, 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.

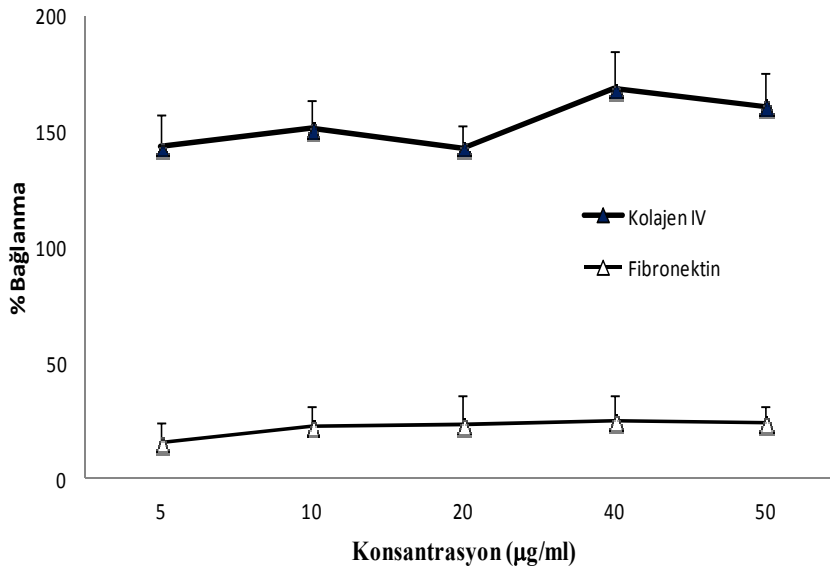
Her bir kuyuya 1 × 10⁵ hücre/ml eklenmiş, 2 saat 37 °C 'de inkübe edilmiştir. 10 µM kaspaz-3 ve 10 µM kaspaz-9 inhibitörü eklenerek plakalar 37 °C 'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre ölümünü belirlemek amacıyla Cell Death Detection ELISA (Roche) kit'i kullanılmıştır. Plakalar 300 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiş ve her bir kuyuya 200 µl liziz çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 20 µl süpernatant alınarak streptavidin kaplı kuyucuklara konulmuş, üzerine anti-histon-biotin, anti-DNA-POD ve inkübasyon çözeltisinden oluşan kompleks solüsyondan 80 µl eklenerek 300 rpm' de 2 saat oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. 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.

SONUÇ TARTIŞMA

5RP7 Hücrelerinin Fibronektin ve Kolajen IV Proteinlerine Bağlanma Kapasiteleri

5RP7 hücreleri integrin aracılıklı fibronektin ve kolajen IV proteinlerine bağlanma kapasiteleri MTT deneyi ile belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 20, 40 ve 50 µg/ml) fibronektin ya da kolajen IV proteini ile kaplanmış 96-kuyulu plakalara ekilen hücreler inkübasyon süresi bitiminde MTT ile muamele edilerek, bağlanma gösteren hücre sayıları plaka okuyucu ile belirlenmiş olup sonuçlar Şekil 1’de verilmiştir.

5RP7 hücrelerinin fibronektin ve kolajen IV proteinlerine bağlanma yüzdesi protein konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Hücreler 5, 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonundaki fibronektin proteinine sırasıyla, % 15, 22, 23 ve 27 oranlarında bağlandığı ve bu oranın protein konsantrasyonunun arttırılması ile (40 ve 50 µg/ml) değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. 5RP7 Hücrelerin Fibronektin ve Kolajen IV Ekstrasellüler Proteinlerine Bağlanma Oranlarının MTT ile Belirlenmesi. 96 kuyulu plakalar 5, 10, 20, 40 ve 50 µg/µl fibronektin veya kolajen IV dilüsyonları ile 24 saat + 4 °C’ de kaplanmıştır. 12.5×10^4 /ml hücre her bir kuyuya ekildikten sonra, MTT ile muamele edilerek hücre bağlanma oranı % olarak hesaplanmıştır. Kontrol kuyucuğu protein ile kaplanmamıştır. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir (n=6).

Bu hücrelerin 30 µg/ml fibronektine maksimal oranda (% 27) bağlanma gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlanmanın, fibronektin spesifik 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 $\alpha_v\beta_6$ integrinlerinden bir ya da bir kaçının dereceli aktivasyonu sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Literatürde, integrinlerin aktivasyonuna ve hücre tipine bağlı olarak değişen fibronektin bağlanma oranları tespit edilmiştir. Fetüs fibroblast hücrelerinin 5 µg/ml fibronektine % 80 oranında (14), HM1-IMSS (15) hücresi 100 µg/ml fibronektine % 100 oranında, HCE hücreleri 10 µg/ml fibronektine (16) % 600 oranında, HCV29 hücreleri benzer konsantrasyondaki fibronektine % 70 oranında, T24 hücreleri % 10 (17) ve HUVEC hücreleri ise % 80 (18) oranında bağlanma gösterdiği tespit edilmiştir.

5RP7 hücreleri fibronektine oranla kolajen IV proteinine daha yüksek bir oranda bağlanma göstermiştir (Şekil 1). Hücreler en düşük kolajen IV konsantrasyonunda (5 µg/ml) % 141 bağlanma oranına sahipken bu oran en yüksek konsantrasyonda (50 µg/ml) ancak % 160 olarak belirlenmiştir. 5RP7 hücrelerinin kolajen IV proteinine bağlanmasında $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_3\beta_1$ integrinlerin rol oynadığı ve fibronektin reseptörlerine oranla kolajen IV reseptörlerinin daha yüksek aktivasyon derecesine sahip oldukları düşünülmektedir. Fibronektin proteinine benzer şekilde, kolajen IV proteinine bağlanma oranı hücre tipine ve konsantrasyona bağlı olarak farklılık gösterdiği literatür bilgisinde yer almaktadır. Buna göre, 50 µg/ml kolajen IV proteinine ovaryum karsinoma hücresi (NIH:OVCAR5) % 80 (19) oranında, insan nöroblastoma hücresi (SK-N-SH) % 45 (20) oranında ve B16 fare melanoma hücresi % 85 (21) oranında bağlanma göstermiştir.

Fibronektin ve kolajen IV proteinlerine bağlı 5RP7 hücre apoptozunun belirlenmesi

Apoptotik yolağın uyarılması sonrasında genetik materyalde, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırılma meydana gelir ve merdiven görüntüsü 'ladder pattern' oluşur. Bu bulgu, apoptozun özellikle geç apoptozun karakteristik bir özelliğidir.

Fibronektin (10 ve 30 µg/ml), kolajen IV (10 µg/ml) ve negatif kontrol olan poly-L-lizin (5 µg/ml) ile 24 saat kaplanan petrilere 5RP7 hücreleri ekim yapıldıktan sonra petrilere 2 saat 37 °C'de inkübasyona tabi tutuldular. Deney ve kontrol hücrelerinden izole edilen genomik DNA % 1.2'lik agaroz jelde yürütülerek DNA görüntüleme cihazı (Kodak, U.K) ile görüntülenmiştir.

Şekil 2'de görüldüğü üzere, 30 µg/ml fibronektine ve 5 µg/ml poly-L-lizine bağlanan 5RP7 hücrelerde apoptotik DNA kırılması gözlenmezken, 10 µg/ml fibronektine bağlanan hücrelerin DNA'sı kırılma göstermiştir. Bu bulgular, fibronektin proteininin 5RP7 hücre apoptozunu düşük

dozda ve spesifik olarak uyardığını göstermiştir. Başka bir deyişle, 5RP7 sıçan kanserli hücreleri fibronektin dozuna bağlı olarak hücre canlılığının devamlılığı ve hücre apoptozu arasında seçim yaptığını ve buna bağlı olarak anti- veya pro-apoptotik sinyal yollarını uyardığını düşündürmektedir. 10 µg/ml kolajen IV'e bağlı hücrelerde ise apoptotik DNA görüntüsüne rastlanmamıştır (veri gösterilmemiştir).

Literatürdeki farklı hücre tipleri kullanılarak yapılan çalışmalar elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. İnsan endotel hücreleri (22) ve HL60 hücrelerinde (23) apoptozun artan fibronektin konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Mast hücrelerinin aktifleşmesi ile salgılanan chymase'in, fibronektinin bozulmasına neden olduğundan kalp düz kas hücrelerinin (24) apoptotik faaliyetlerini uyardığı, integrin-bağlı kinazın (ILK) apoptoz oranını arttırdığı ve fibronektinin ILK'ye bağlanması ile HL60 hücrelerinde apoptozun artan fibronektin konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı (23) gösterilmiştir. Bunun aksine fibronektine bağlanan Oyster hemosit hücreleri (25) ve tiroid hücrelerinin (26) apoptoza gitmediği belirlenmiştir.

Kolajen IV proteine bağlı 5RP7 hücrelerde geç apoptoz tespit edilemezken fibronektine bağlı hücrelerde DNA kırılmaları gözlemlenmiştir bu nedenden çalışmamızın bu aşamasından sonra yalnızca fibronektin proteine bağlı 5RP7 hücreleri kullanılmıştır.



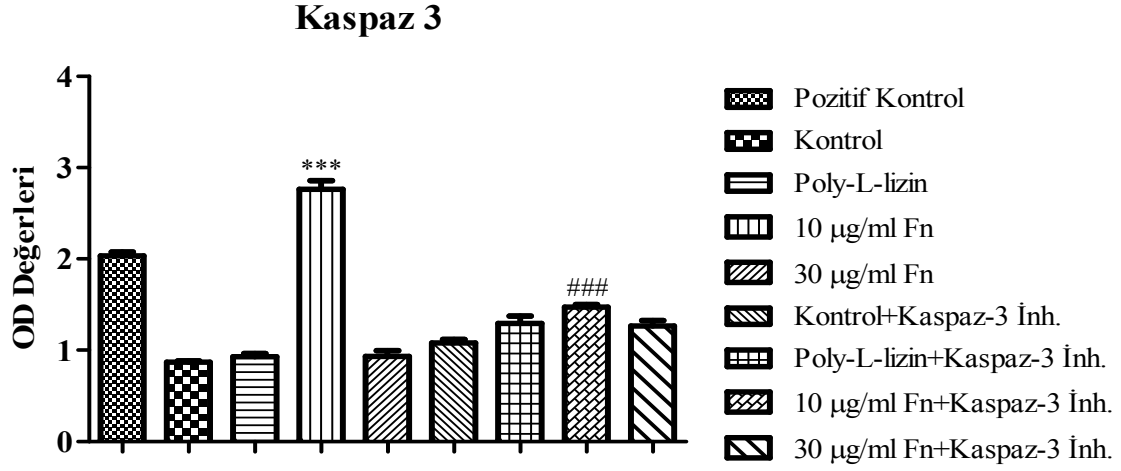
Şekil 2. Fibronektin'e Bağlı 5RP7 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi. Fibronektin (10 µg/ml, 30 µg/ml) ve 5 µg/ml poly-L-lizin kaplı petrilere ekim yapılarak 2 saat inkübe edilen 5RP7 hücrelerinin DNA'ları Apoptotik DNA Ladder Kit prosedürüne uygun olarak izole edilip 1.5 saat 50 V akım ile % 1.2'lik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

Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Enzimlerinin Fibronektine Bağlı 5RP7 Hücre Apoptozu Üzerine Etkileri

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) (Şekil 3) ve 10 µM kaspaz-9 (Z-Leu-Glu (OMe)-His-Asp (OMe)-CH₂F) (Şekil 4) 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.

Pozitif kontrol olarak kullanılan nükleozomal DNA parçalanma oranı % 100 kabul edilerek (O.D. 2.2) fibronektine 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 3). Buna karşı DNA fragmentasyon çalışmasından elde ettiğimiz bulgulara (Şekil 2) benzer şekilde 10 µg/ml fibronektin üzerine bağlanan 5RP7 hücre DNA parçalanma oranı % 127 olarak hesaplanmıştır ki bu oran pozitif kontrolden daha yüksektir (***P*<0,001). Ancak fibronektin konsantrasyonu 30 µg/ml’ye çıkarıldığında ise DNA parçalanma oranı kontrol hücre oranına yakın bulunmuştur (% 40). Bu bulguda, DNA fragmentasyon deneyinde elde ettiğimiz sonuçlarla birebir örtüşmektedir.

5RP7 hücrelerinde fibronektinin uyardığı apoptoz mekanizması üzerinde kaspaz 3 enzim aktivasyonunun etkisini araştırmak üzere fibronektine 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 (###*P*<0,001).



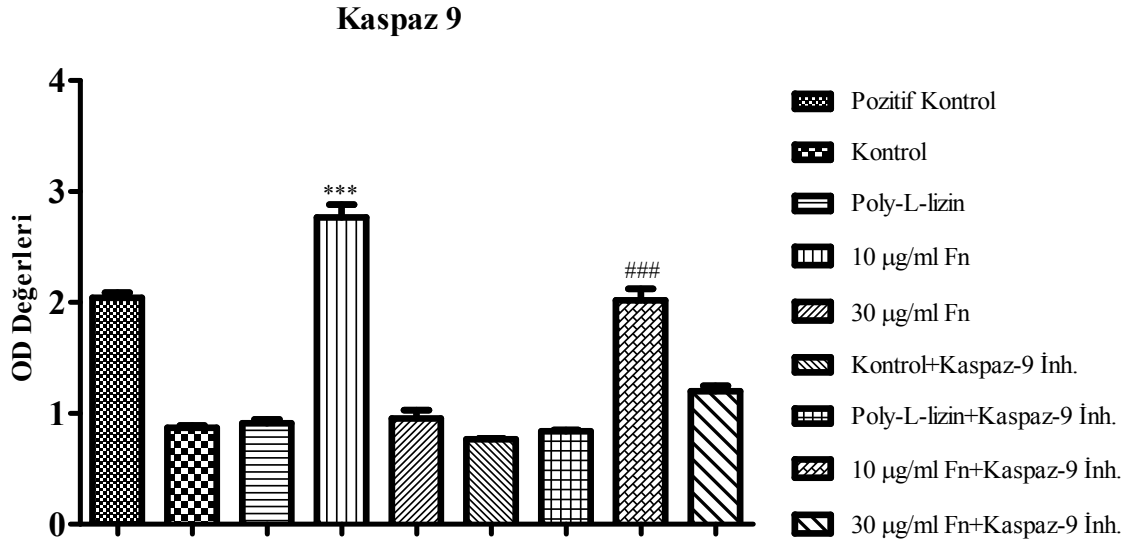
Şekil 3. Kaspaz-3 İnhibitörü Varlığında Çeşitli Konsantrasyonlardaki Fibronektin'in 5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi. Deney 3 kez tekrarlanmış olup her bir deneyde 3 bağımsız kuyucuğun ortalaması alınmıştır. n= 9 olarak verilmiştir.

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 kullanılması ile başlayan apoptotik mekanizmada kaspaz-3 ve -9'un aktivasyonu gözlenmiştir, inhibisyon çalışması sonrasında apoptotik oranın azaldığı belirlenmiştir (27). İnsan bronşiyal epitelyum hücrelerinde (BEAS-2B ve 16-HBE) ise, fibronektin proteini kaspaz-3 ve -7 aktivitelerini engelleyerek DNA parçalanmasının azalmasına ve buna bağlı olarak apoptozun inhibisyonuna neden olmuştur (28). Aynı şekilde, retina perisit kültür hücrelerinde modifiye edilen fibronektin'in kaspaz-3 aktivitesi ve apoptoz da artış gözlenmiştir (29).

5RP7 hücre integrinlerinin fibronektine bağlanarak hücre içine gönderdikleri sinyal ya ölüm reseptörlerinin aktivasyonu sonucunda olduğu gibi kaspaz 8 ve kaspaz 3'ün aktivasyonu ile DNA fragmenasyonuna 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 (30). $\alpha\beta5$ ve $\alpha6\beta1$ integrinlerinin CCN1 substratına bağlanması ile kaspaz 8/10 aktive ettiği ve daha sonra bax proteininin düzenlediği bir mekanizma ile mitokondrilerden sitokrom c'nin salınımının gerçekleşmesi ile kaspaz 9 ve 3'ün aktivasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir (31).

Bu nedenle fibronektine bağlı 5RP7 hücrelerinde mitokondrial yolun son basamağı olan kaspaz-9 aktivasyonunun rolü inhibitör varlığında incelenmiştir (Şekil 4). 10 µg/ml fibronektine bağlı 5RP7 hücrelerinde DNA kırılması pozitif kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir ($***P<0,001$). 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 rağmen 10 µg/ml fibronektine bağlanan 5RP7 hücre DNA parçalanma oranı % 120 iken, kaspaz 9 inhibitörünün eklenmesi ile bu oran % 86'ya düşmüştür ($###P<0,001$). Kaspaz 9 enziminin fibronektine bağlı 5RP7 hücre apoptozunda etkili olduğu düşünülmektedir.

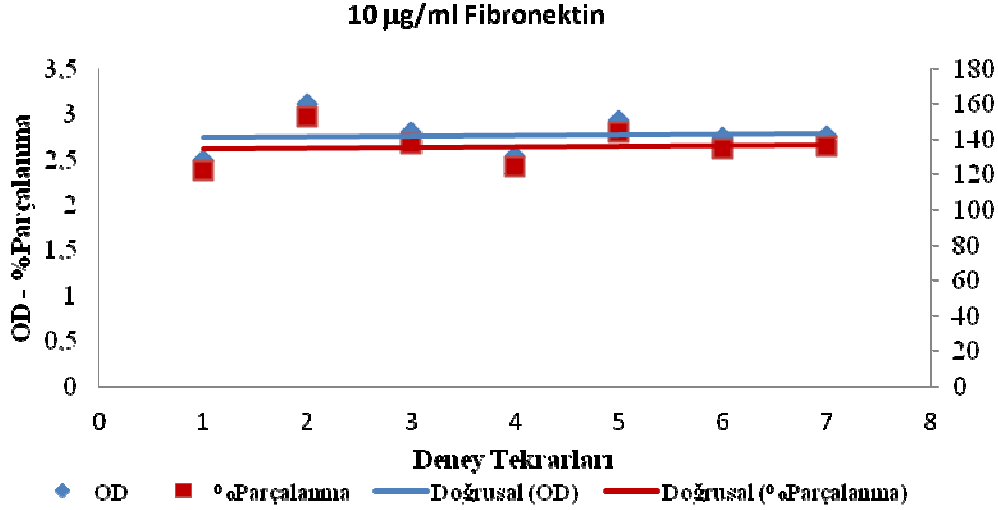


Şekil 4. Kaspaz-9 İnhibitörü Varlığında Çeşitli Konsantrasyonlardaki Fibronektin'in 5RP7 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi. Deney 3 kez tekrarlanmış olup her bir deneyde 3 bağımsız kuyucuğun ortalaması alınmıştır. n= 9 olarak verilmiştir.

zLEHD'nin başlattığı kaspaz-9 inhibisyonunun, süspansiyon insan lösemi (HL60) hücresinin aksine fibronektinle bağlı hücrelerde kaspaz aktivasyonunun baskılanamadığı belirtilmiştir (23). Hepatik stellat hücrelerinde ise fibronektine bağlanma hücre yaşam süresini uzatırken kaspaz-3 ve -9 aktivitelerini azalttığı gözlenmiştir (32). Bunun aksine, fibronektinle bağlı kalp düz kas hücrelerinde kaspaz-8 ve -9 (33) ve insan beyin kanser hücrelerinde ise kaspaz-3 ve -9 aktivitelerinde artış olduğu bulunmuştur (34).

ELISA ölçümünde doğrusal aralığı geçmiş olan 10µg/ml fibronektin uygulanmış deney tekrarlarının, optik dansite değerleri ve pozitif kontrole göre parçalanma yüzdelerinin lineer

grafikleri çizilerek değişkenler arasındaki doğrusal ilişkinin yönüne bakıldığında; optik dansite değerleri ile parçalanma yüzdelerinin korelasyon katsayılarının eşit olduğu gözlenmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. 10 µg/ml fibronectin uygulanmış deney düzlemindeki OD ve % parçalanma arasındaki ilişki.

KAYNAKLAR

1. Flierman, R. Daha, M.R. "The clearance of apoptotic cells by complement" *Immunobio.*, 212, 363-370 (2007).
2. Wyllie, A.H. "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation" *Nature*, 284, 555-556 (1980).
3. Dual, E., Wyllie, A.H. "Death and the cell" *Immunol. Today*, 7, 115-119 (1986).
4. Arends, M.J., Wyllie, A.H. "Apoptosis: mechanisms and roles in pathology" *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 32, 223-254 (1991).
5. Meyn, M.S., Strasfeld, L., Allen, C. "Testing the role p53 in the expression of genetic instability and apoptosis in ataxia-telangiectasia" *Int. J. Radiation Biol*, 66, 141-149 (1994).
6. Walker, P.R., Sikorska, M. "Endonuclease activates, Chromatin structure and DNA degradation in apoptosis" *Biochem. Cell Biol.*, 72, 615-623 (1994).
7. Kauffmann, Z.A., Rodriguez-Viciano, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. and Evan, G. "Suppression of c-myc-induced apoptosis by ras signaling through PI(3)K and PKB" *Nature*, 385, 544-548 (1997).

8. **Salvesen, G.S., Dixit V.M.** “Caspase activation: the induced-proximity model” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10964-10967 (1999).
9. **Cohen, G.M.** “Caspases: the executioners of apoptosis” *Biochem. J.* 326, 1-16 (1997).
10. **Bao, Q., Shi, Y.** “Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases” *Cell Death Differ.* 14, 56-62 (2006).
11. **Kumar, S.** “Caspase function in programmed cell death” *Cell Death Differ.* 14, 32-43 (2006).
12. **Cheresh, D.A., Stupack, D.G.** “Regulation of angiogenesis: apoptotic cues from the ECM” *Oncogene*, 27, 6285-6298 (2008).
13. **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-E1a” *Cancer Res.* 47, 1523-1528 (1987).
14. **Lebbe, C., Font, J., Bonavanture, J., Pichon, J., Wantyghem, J., Rossi, M., Haentjens, G., Cohen-Solal, L. and Aubery, M.** “Altered collagen of human pathological fibroblasts impairs the synthesis of fibronectin” *Matrix Biology*, 15, 503-507 (1997).
15. **Franco, E., Vazquez-Prado, J., Meza, I.** “Fibronectin-derived fragments as inducers of adhesion and Chemotaxis of entamoeba histolytica trophozoites” *J. Invest. Dermatol.*, 176, 1597-1602 (1997).
16. **Kimura, K., Kawamoto, K., Teranishi, S. Nishida, T.** The role of Rac1 in fibronectin-induced adhesion and motility of human corneal epithelial cells, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 47, 4323-4329 (2006).
17. **Przybylo, M., Litynska, A., Pohec, E.** “Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urethelial and T24 Bladder cancer cells: role of glycosylation” *Biochimie*, 87, 133-142 (2005).
18. **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 trilavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- integrin monoclonal antibody” *Biochim. Biophys. Acta*, 1336, 445-454 (1997).
19. **Casey, R.C., Burleson, K.M., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.F., Oegema Jr, T.R., Ruff, L.R., Skubitz, A.M.** “ β 1-Integrins Regulate the Formation and Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids” *The American J. Pathology*, 159, 2071-2080 (2001).

20. **Tzinia, A.K., Kitsiou, P.V., Talamagas, A.A., Georgopoulos, A. and Tsilibary, E.C.** “Effects of Collagen IV on Neuroblastoma Cell Matrix-Related Functions” *Exp. Cell Res.*, 274, 169-177 (2002).
21. **Vollmers, H.P., Imhof, B.A., Braun, S., Waller, C.A., Schirmacher, V. and Birchmeier, W.** “Monoclonal antibodies which prevent experimental lung metastases: Interference with the adhesion of tumour cells to laminin” *FEBS Letters*, 172, 17-21 (1984).
22. **Re, F., Zanetti, A., Siron, M., Polentarutti, N., Lanfrancone, L., Dejana, E. and Colotta, F.** “Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells” *J. Cell Biol*, 127, 537-546 (1994).
23. **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).
24. **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, 238-243 (2003).
25. **Terahara, K., Takahashi, K.G., Moria, K.** “Pacific oyster hemocytes undergo apoptosis following cell-adhesion mediated by integrin-like molecules” *Biochem. Physiol*, 141, 215-222 (2005).
26. **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. Metabolism*, 83, 3673-3680 (1998).
27. **Natal, C., Oses-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).
28. **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).
29. **Bingfen, L., Bhat, M., Padival, A.K., Smith, D.G., Nagaraj, R.H.** “Effect of dicarbonyl modification of fibronectin on retinal capillary pericytes” *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 45, 1983-1995 (2004).

30. **Clermont, F., Adam, E., Dumont, J.E. and Robaye, B.** “Survival pathways regulating the apoptosis induced by tumor necrosis factor- α in primary cultured bovine endothelial cells” *Cellular Signalling*, 15, 539-546 (2003).
31. **Chen, C.C., Young, J.L., Monzon, R.I., Chen, N., Todorovic, V. and Lau, L.F.** “Cytotoxicity of TNF- α is regulated by integrin-mediated matrix signaling” *EMBO J.*, 26, 1257-1267 (2007).
32. **Rodriguez-Juan, C., Torre, P., Garcia-Ruiz, I., Diaz-Sanjuan, T., Munoz-Yague, T., Gomez-Izquierdo, E., Solis-Munoz, P. and 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).
33. **Leskinen, M.J., Heikkila, H.M., Speer, M.Y., Hakala, M., Kovanen, P.T. and 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).
34. **Ezhilarasan, R., Jadhav, U., Mohanam, I., Rao, J., Gujrati, M. and 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).

Received= 13.02.2012

Accepted= 28.06.2012