

Ovaryum Kanserinde Hücre İçi Kalsiyum Değişimlerinin Ultrayapısal Olarak İncelenmesi

Aysun Ayrım

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Nisan 2016

Ultrastructural Examination of Intracellular Calcium Changes In Ovarian Cancer

Aysun Ayrim

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

April 2016

Ovaryum Kanserinde Hücre İçi Kalsiyum Değişimlerinin Ultrayapısal Olarak İncelenmesi

Aysun Ayrım

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. İlknur Dağ

Bu tez ESOGÜ ve Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birim'leri tarafından
2015-781 ve 1301S011 no'lu projeler çerçevesinde desteklenmiştir.

Nisan 2016

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Aysun Ayrım'ın YÜKSEK LİSANS tezi "Ovaryum kanserinde hücre içi kalsiyum değişimlerinin ultrayapısal olarak incelenmesi" başlıklı bu çalışma jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. İlknur DAĞ

İkinci Danışman: Prof. Dr. Zerrin İNCESU

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Doç. Dr. İlknur DAĞ

Üye: Prof. Dr. Zerrin İNCESU

Üye: Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Üye: Doç. Dr. Pınar ÖZTOPÇU VATAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. İlknur Dağ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Ovaryum kanserinde hücre içi kalsiyum değişimlerinin ultrayapısal olarak incelenmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 13/04/2016

Aysun Ayrım

İmza

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, ovaryum kanseri hücrelerinde (SKOV-3) fibronektine bağlı integrin aktivasyonunun ardından, hücre içi kalsiyum artışı ile ER stresi oluşturulmuş ve sonrasında muhtemel apoptotik etkiler araştırılmıştır. SKOV-3 hücrelerinde Tunikamisin (TN) konsantrasyonları ile hücre içi kalsiyum değişimleri Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM boyaları kullanılarak akım sitometrisiyle ölçülmüştür. Hücrelerin 18 µM TN uygulaması sonrasında oluşturulan ER stresine bağlı apoptotik hücre ölümü Anneksin V / PI yöntemi ile sitokrom c ve Endo G proteinlerinin lokalizasyonu ise floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir. Ayrıca hücrelerdeki morfolojik değişimler geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile tespit edilmiştir.

Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM ile boyanan SKOV-3 hücrelerinin 18 µM TN inkübasyonu sonrasında sırasıyla sitoplazmik ve mitokondriyal Ca^{+2} artışının olduğu gözlenmiştir. Bu artışa bağlı olarak, SKOV-3 hücrelerinde % 11.38 oranında erken apoptoz ve % 10.24 oranında geç apoptoz belirlenmiştir. Mitokondriyal kaynaklı apoptotik proteinler olan sitokrom c ve Endo G'nin 2 saat TN inkübasyonlarında floresan ışımaların kaplamasız hücrelere oranla daha yoğun olduğu görülmüştür. Fibronektine bağlı SKOV-3 hücrelerinde ER stresine bağlı olarak gelişen apoptotik değişimler plazma ve çekirdek zarında bozulmalar, çekirdek kondensasyonu ve nükleusta fragmentasyona bağlı yoğun heterokromatin yapılar olarak belirlemiştir.

Sonuç olarak, metastatik aşamadaki (fibronektine bağlı) ovaryum kanseri hücrelerinde, kalsiyuma bağımlı apoptotik sürecin varlığı kısmen gösterilmiştir. Sonuçlar apoptotik sürecin izlenmesi ve integrin aktivasyonu ile etkilerin karşılaştırılması açısından literatüre katkı sağlayabilir, ayrıca ileri aşamada, ovaryum kanseri hücrelerinde apoptozu uyarıcı ya da hücre döngüsünü baskılayıcı inhibitör ve/veya ilaçların geliştirilmesi için de faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Ovaryum kanseri, İntegrin, Kalsiyum, Elektron Mikroskobu, Apoptoz

SUMMARY

In this thesis, following the fibronectin-coated integrin activation in ovarian cancer cells (SKOV-3), endoplasmic reticulum stress was generated by intracellular calcium increase and then possible apoptotic effects were investigated. Tunicamycin (TN) concentrations and intracellular calcium alterations in SKOV-3 cells were analyzed by flow cytometry using Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM flourescent dyes. Apoptotic cell death dependent to ER stress that generated after the treatment with 18 μM TN were investigated by Anneksin V / PI protocol and the localisations of cytocrome c and EndoG proteins were also imaged by fluorescent microscope. In addition, morphological alterations were determined by transmission electron microscope (TEM).

Following the treatment with 18 μM TN of SKOV-3 cells staining with Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM, cytoplasmic and mitochondrial Ca^{+2} increases were observed, respectively. Correspondingly, early apoptosis percentage was 11.38 % and late apoptosis percentage was 10.24% in SKOV-3 cells. After 2 hours TN incubations of mitochondrial apoptotic proteins cytocrome c and Endo G, flourescent radiations were found as more intense than non-coating cells. Apoptotic changes depending on ER stress in fibronectin coated SKOV-3 cells were determined as plasma and nucleus membrane damages, nucleus condensation and intense heterochromatin structures in nucleus by fragmentation.

As a result, calcium dependent apoptotic process in ovarian cancer cells in metastatic stage were partially shown. The results obtained from this study may contribute to the literature in respect to integrin activation and comparison of effects, moreover, in an advanced stage, it would be useful for apoptosis induced or cell cycle suppressed inhibitors and/or drugs development.

Key Words: Ovarian cancer, Integrin, Calcium, Electron Microscope, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince gösterdikleri yakın ilgiyle, sabırla, anlayışla, değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışman hocalarım Doç. Dr. İlknur DAĞ ve Prof. Dr. Zerrin İNCESU' ya

Bilgi ve tecrübeleriyle önerilerini sunan, sabrı ve anlayışıyla her zaman yanımda olan, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Filiz Özdemir'e

Tezimin deneysel çalışmalarının ilgili kısımlarını gerçekleştirebilmem için laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren ve çalışmalarım süresince hiçbir yardımcı ve desteği esirgemeyen değerli hocalarım, Yrd. Doç. Dr. Zerrin Cantürk ve Arş. Gör. M. Güçlü Özarda'ya

Laboratuvar çalışmalarımda ve tezimde bana yardımcı olan arkadaşlarım Elif Apaydın, Kadri Güleç, Tayfun Şengel, Mesut Şen, Nur İpek Önder Mert, Seda Tarhan, Erman Özer ve Yüksel Öğünç' e

Tüm eğitim hayatımda maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme ve dostlarım Deniz Sultan Çetinmeşe, ve Özge Uluçay'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Yöntemler.....	18
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	22
4.1. Hücre içi kalsiyum değişimlerinin akım sitometrisi ile belirlenmesi.....	22
4.2. Mitokondriyal kalsiyum değişimlerinin akım sitometrisi ile belirlenmesi.....	26
4.3. SKOV-3 hücrelerinde integrin aktivasyonunun ışık mikroskobu ile görüntülenmesi.....	33
4.4. Tunikamisine bağlı apoptozun Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile belirlenmesi....	36
4.5. Tunikamisin Uygulaması Sonrasında Sitokrom c ve Endo G proteinlerinin floresan mikroskobu ile görüntülenmesi	38
4.6. Tunikamisin Uygulaması Sonrasında SKOV-3 hücrelerinde hücre ölümünün geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi.....	42
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR DİZİNİ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Apoptozda kalsiyum iyonunun rolü.....	7
2.2. Metastatik sürecin oluşumu.....	10
2.3. İntegrin ailesi. İntegrinler, bir α altbirim ve bir β altbirim bulunduran heterodimerlerdir.....	11
2.4. Fokal adezyon komplekslerinin moleküler organizasyonu ve Ca^{+2} ile düzenlenmesi.....	13
2.5. İntegrin aktivasyonunda meydana gelen değişimler.....	14
4.1. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 3-6-12-18 ve 24 μ M TN konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....	23
4.2. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 1, 5 ve 10 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....	24
4.3. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine 18 μ M TN ve 5 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....	25
4.4. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 3-6-12-18 ve 24 μ M TN konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....	27
4.5. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 1, 5 ve 10 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından mitokondriyal kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....	28
4.6. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine 18 μ M TN ve 5 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....	29
4.7. Kalsiyumsuz Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 3-6-12-18 ve 24 μ M TN konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....	30
4.8. Kalsiyumsuz Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- 1, 5 ve 10 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından mitokondriyal kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....31
- 4.9. 1 mM CaCl₂ ve kalsiyumsuz Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerinin 10 µM Ru360 ile 1 saat inkübasyon sonrası TN 18 µM konsantrasyonu muamelesi ile mitokondriyal kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi.....32
- 4.10. A) Kaplamasız B) Fibronektin ve C) Poli-L-Lizin proteinlerinin belirlenen konsantrasyonlar ile kaplanmış plakalarda SKOV-3 hücrelerinin 2, 24 ve 48 saat inkübasyonları sonrasında integrin aktivasyonuna bağlı bağlanma ve yayılımlarının ışık mikroskobu ile gösterilmesi.....33
- 4.11. Hücrede Anneksin V ve PI'nın çalışma mekanizması.....36
- 4.12. Kaplamasız plakalarda TN ile 2 saat inkübe edilmiş SKOV-3 hücrelerindeki apoptozun Annexin V-PI yöntemiyle gösterilmesi. a) Kontrol grubu b) TN 18 µM.....37
- 4.13. A) Kaplamasız B) 50 µg/ml Fibronektin ve C) 10 µg/ml Poli-L-Lizin proteinleri ile kaplanmış plakalarda SKOV-3 hücrelerinin Kontrol ve 18 µM TN ile 30-60-120 dakika inkübasyonları sonrası, sitokrom c antikorunun floresan mikroskobu ile gösterilmesi.....39
- 4.14. A) Kaplamasız B) 50 µg/ml Fibronektin ve C) 10 µg/ml Poli-L-Lizin proteinleri ile kaplanmış plakalarda SKOV-3 hücrelerinin Kontrol ve 18 µM TN ile 30-60-120 dakika inkübasyonları sonrası, ENDO G antikorunun floresan mikroskobu ile gösterilmesi.....41
- 4.15. Kaplama yapılmamış SKOV-3 hücrelerinin 18 µM TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri A) Kontrol, 15, 30 ve 45 dakika B) 60, 120, 240 ve 360 dakika genel görünüşleri.....43
- 4.16. Fibronektin kaplı SKOV-3 hücrelerinin 18 µM TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri A) Kontrol ve 15 dakika B) 30 ve 60 dakika C) 120 dakika genel ve yakın görünüşleri.....46
- 4.17. Poli L-lizin kaplı SKOV-3 hücrelerinin 18 µM TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri A) Kontrol ve 15 ve 30 dakika B) 60 ve 120 dakika genel görünüşleri.....50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

Ca ⁺² :	Kalsiyum
µl:	Mikrolitre
µm:	Mikrometre
µM:	Mikromolar
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar

Açıklama**Kısaltmalar**

Endo G:	Endonükleaz G
EDTA:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ER:	Endoplazmik Retikulum
ESM:	Ekstrasellüler Matriks
FAK:	Fokal Adezyon Kinaz
IP ₃ :	İnositol trifosfat
SKOV-3:	Ovaryum kanseri hücre hattı
TEM:	Geçirimli elektron mikroskobu

Açıklama

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, gen mutasyonu sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, apoptotik ve anti-apoptotik mekanizmaların düzensiz işleyişi ve buldukları bölgeden başka bölgelere yayılmasıyla (metastaz) karakterize bir hastalık olup, birçok çeşidi bulunmaktadır (Hanahan ve ark., 2000). Günümüzde kanser, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüme en çok neden olan ikinci hastalık çeşidi olarak bilinmekte ve tüm toplumları etkileyen önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle tanı yöntemleri ve moleküler mekanizmalarının çok iyi anlaşılması gerekmektedir (Oliveira ve ark., 2007).

Karsinom olarak da isimlendirilen kanser, köken aldığı dokuya göre sınıflandırılmakta ve yaklaşık % 85' i epitelyal hücrelerde başlamaktadır (Hanahan ve ark., 2000). Ovaryum dokusu birçok farklı hücreyi barındırır. Bu yüzden ovaryum kanserleri; epitelyal, stromal ve germ hücreler olmak üzere üç farklı hücre tipinden köken alırlar. Epitelyal hücreden meydana gelen ovaryum kanserleri tüm ovaryum kanserlerinin % 90'ından fazlasını oluşturur ve histolojik özelliklerine göre seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, değişici epitel hücreli, farklılaşmamış ve az farklılaşmış gibi alt gruplara ayrılırlar. Bunlar içerisinde de en sık görülen tip ise seröz tiptir (Martin ve ark., 2005).

Son yıllarda hücre yaşamı, migrasyonu ve invazyonunu düzenleyen mekanizmaların açığa kavuşmaya başlamasıyla kanser tedavisinde hücre bağlanma molekülleri (özellikle integrinlerle) ilgili yeni terapötikler geliştirilmeye başlanmıştır (Jin, 2004). Hücre dışı matriks (ESM) proteolitik olarak bozulduğunda ya da mekanik olarak deforme olduğunda, hücreler fizyolojik ve patolojik olayları etkileyen çeşitli değişikliklere uğrarlar (Seguin ve ark., 2014). İntegrinler, bu değişiklikleri algılar ve hücre adezyonunu, göçünü, hücrenin hayatta kalması ve farklılaşmasını etkilerler. Hücresel tepkileri, çift yönlü entegrasyonu sağlamak için hücre içi ve dışı arasında fiziksel bir bağlantı oluşturulmasıyla bir dizi integrin sinyali ile sonuçlanmaktadır. (Seguin ve ark., 2014, Anderson,2014). α ve β alt birimlerden oluşan ve non-kovalent bağlanan integrinler heterodimer transmembran proteinlerdir. İntegrin-ESM bağlantısı ile birçok hücrede sinyal iletim mekanizmasını da uyarırlar (Smith ve ark., 1994).

İntegrin ligasyonu ile ilişkili olarak hücre içi sinyal yollarındaki kalsiyum akışı ve mobilizasyonu etkili bileşenlerden biridir. Serbest hücre içi kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) konsantrasyonundaki değişiklikler, integrinlerin hücre adezyonunu ve migrasyonunu kısmen düzenler (Kwon ve ark., 2000). Kalsiyum (Ca^{+2}) ve az miktarda magnezyum (Mg^{+2}), integrinlerin ESM'lere bağlanma ligandı için katyon gerekliliğini sağlarlar. Bu durumda, Ca^{+2} ve Mg^{+2} α ve β -integrin bağlanma kompleksini dengede tutan, ESM ligasyonu ile integrin aracılı hücre adezyonunun potansiyel fizyolojik düzenleyicileridir. Yani bu iyonlar, kompleks integrinin hem ESM'e bağlanma aktivitesini hem de proteolitik duyarlılığını etkilemektedir (Mizejewski, 1999).

Ayrıca, plazma membranında bulunan Ca^{+2} kanalları aracılığıyla oluşan Ca^{+2} akışı, protein kinazlar, kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz II, fosfolipaz, kalsinörin ve calreticulini içeren işlemler, sarkoplazmik retikulum / endoplazmik retikulum (SR / ER) depolarında hücre içinden Ca^{+2} salınımı aracılı-inositol trifosfat (IP_3) kombinasyonundan kaynaklanan $[Ca^{+2}]_i$ 'nin yükseldiği kabul edilmiştir. Bununla birlikte, integrin aktivasyonun, IP_3 bağımlı Ca^{+2} salınımı ya da Ca^{+2} kanalı aktivasyon ilişkisi tam olarak karakterize edilememiştir (Kwon ve ark. 2000).

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ayrıca apoptoz da çok önemli bir rol oynamaktadır. Hücre ölümü ile ilişkili kalsiyum bağımlı moleküller hakkında yapısal bilginin sınırlı olması, Ca^{+2} ve apoptoz arasındaki ilişkinin detaylı olarak bilinmemesine neden olmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun geçici olarak yükselmesi kasılma, sekresyon, fertilizasyon, proliferasyon, metabolizma, kalp atışı ve hafıza gibi birçok durumda sinyal rolü üstlenmektedir. Ancak Ca^{+2} konsantrasyonunun uzun süreli yükselmesi ($10\mu M$ 'in üzerine çıkması) apoptozu uyarır ve hücre için tehlikelidir. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin tamponlama etkisi ile hücrede yüksek kalsiyuma bağlı olarak ortaya çıkacak zararlı etkiler ortadan kaldırılır (MacLennan, 2000; Tandoğan, 2006).

İntegrin inaktivasyonun tersinir formları bir takım kimyasal faktörleri teşvik eder, bu da kanser tedavisi için antiproliferatif ajanlara potansiyel kaynak sağlayacaktır (Mizejewski, 1999).

Bu tez çalışması kapsamında, metastatik ovaryum kanseri hücrelerinde (SKOV-3) integrin aktivasyonu sonrasında ER stresine bağı olarak sitoplazmik ve mitokondriyal kalsiyum dağılımının ölçülmesi, kalsiyum artışına bağı olarak ER stresi sonrasında apoptoz evrelerinin belirlenmesi, hücre-fibronektin etkileşimine bağı olarak ER stresi sonrasında apoptotik proteinlerin floresan mikroskobu ve apoptozun elektron mikroskobu ile görüntülenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

Canlıda gerçekleşen birçok olayda kalsiyum iyonları $[Ca^{+2}]$ belirleyici rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$, gen transkripsiyonu, kas kasılması ve çok sayıda hücre türlerinde (örneğin, T lenfositler ve oositler) mitoz bölünmeyi tetikleyerek (Pinton ve ark., 2008) hücre çoğalması gibi çok çeşitli hücrel süreçleri kontrol eden önemli bir hücre içi ikincil habercidir (Bootman ve ark. 2001). Kalsiyum bağlayıcı proteinler sinyal iletiminde aracı bir rol üstlenerek, hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Tandoğan ve Ulusu, 2006).

Kalsiyumun hücre içinde sinyal molekülü görevi görebilmesinin nedeni, $[Ca^{+2}]_i$ 'nin, hem hücre dışı ortama, hem de hücre içinde kalsiyum depolayan yapılara göre çok düşük olmasıdır. Hücre dışında kalsiyum yaklaşık olarak 10^{-3} M iken, kalsiyum depolarında, örneğin; endoplazmik retikulumda (ER) 5×10^{-4} M civarlarındadır. $[Ca^{+2}]_i$ ise daha düşük (10^{-7} M) seviyelerindedir. Bu nedenle, hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplazma arasında, çok yüksek bir kalsiyum derişim farkı oluşmaktadır. Bu fark, kalsiyum için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından kalsiyum geçişi, bu kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan gerçekleşir. Bu kanallarda, çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile etkinleşir ve bu sayede Ca^{+2} geçirgenliği sağlanmış olur (Albert ve ark., 2002).

Çoğu hücrede, temel sinyal görevi gören kalsiyum, sitozolik bölgeden artmaktadır. Oradan da mitokondri ve çekirdek gibi organellere nüfuz ettiği bilinmektedir.(Bootman ve ark. 2001). Hücre içindeki kalsiyum konsantrasyonu, sitozolik kalsiyum artış veya azalışına bağlı olarak, birçok eş zamanlı etkileşim ile birlikte düzenlenmektedir. Plazma membranında bulunan kanallardaki "açık" kalsiyum mekanizmaları, ekstraselüler alanda tükenmeyen kalsiyum kaynağı ve sırayla endoplazmik retikulum ve sarkoplazmik retikulum üzerinde bulunan hücre içi sınırlı kalsiyum kanallarıyla düzenlenmektedir.

Çeşitli bir takım "kapalı" mekanizmalar ise kalsiyumun sitoplazmadan uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. ER ve SR dışındaki organeller de kalsiyum homeostazında önemli rol oynayabilir. Örneğin, mitokondrinin, hızla ayrılan kalsiyumu tutarak sitozolik kalsiyumu sınırlandırdığı ve sitoplazmaya daha yavaş geri gönderdiği gösterilmiştir (Bootman ve ark. 2001). $[Ca^{+2}]_i$ artışı, ekstraselüler alandan giriş ve intraselüler kaynaklardan (temel olarak ER'dan) çıkış yoluyla meydana gelmektedir. Bu işlemler hücre içi kalsiyum sinyalini destekleyen çok sayıda düzenleyici sistem tarafından kontrol edilmektedir. (Prevarskaya ve ark., 2011). Normal şartlarda, kalsiyum devamlı olarak endoplazmik retikulum (ER) ile mitokondri arasında yer değiştirir. Kalsiyum ATPaz (SERCA) pompaları vasıtasıyla kalsiyum ER içine pompalanır ve IP_3 -kapılı kanallar (IP_3R) aracılığı ile de salınımı meydana gelir. Kalsiyum mitokondriye ise Ca^{+2} uniport (MCaU) ile girer ve sonrasında Na^+/Ca^{+2} değişim kanallarıyla salınır (Demaurex, 2003; Szalai,1999).

2.2.Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Apoptozdaki Rolü

Hücrel Ca^{+2} miktarındaki aşırı artışın proteaz ve fosfolipazların yoğun aktivasyonuna sebep olarak toksik etki gösterdiği uzun yıllardır bilinmektedir (Pinton ve ark., 2008). Yani kalsiyum hücre canlılığının önemli düzenleyicilerinden biri olmasının yanı sıra, çeşitli hücrel sinyallere tepki olarak hücre ölümüne de katkıda bulunmaktadır. Sitoplazma, ER ve mitokondri başta olmak üzere hücre içi organellerde bulunan Ca^{+2} a duyarlı faktörler, Ca^{+2} 'un pro-apoptotik etkilerine aracılık ederler (Şekil 2.1) (Jeong ve ark., 2008).

Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Avusturyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz genetik olarak düzenlenmiş ve çok hücreli organizmaların embriyogenez, gelişim ve doku homeostazisi aşamalarında büyük öneme sahip olan bir hücre eliminasyon prosesidir. Apoptozdaki bozulma ya da düzensizlik istenmeyen sonuçlara yol açar. İnsanlardaki nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar, kanser ya da AIDS gibi patolojik durumlarda apoptozun patogenetik yolunda hatalar olur. Apoptoz yoluyla hücre ölümüne kromatin kondensasyonu, membran bleblerinin oluşumu, hücre yıkımları ve DNA degradasyonu eşlik etmektedir (Pinton ve ark. 2010). Apoptoz uyarısı ile hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve

büzüşür, kromatini yoğunlaştır, piknotik bir görünüm alır. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur (Bellamy ve Wyllie,1995).

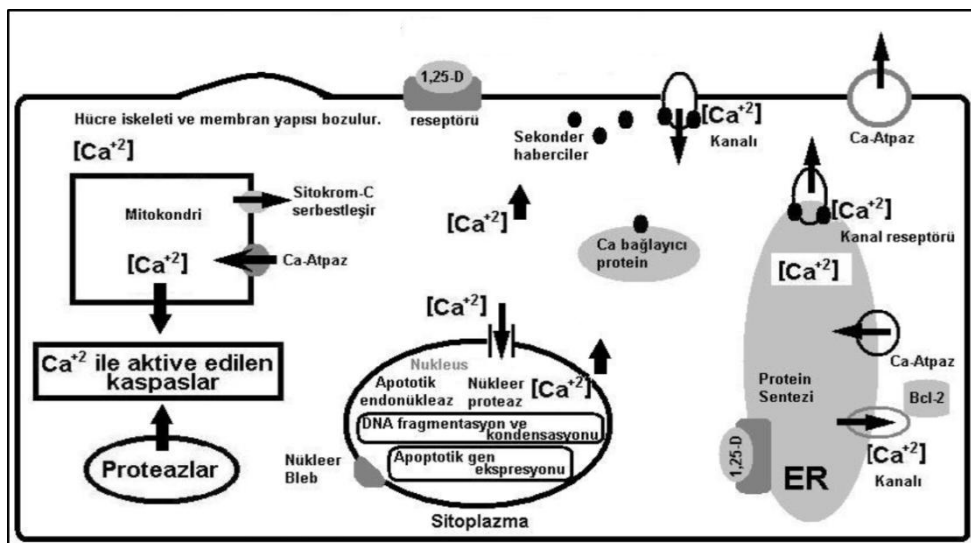
Apoptoz fenotipik olarak başlatma ve yürütme denilen iki evreyi kapsar. Başlatma fazı ekstrinsik yollarla hücre zarı üzerindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile tetiklenebilir ve instrinsik yollar ise mitokondri ve lizozomlar veya ER gibi diğer organelleri içerir. Mitokondriyal hasar apoptozu aktive eder veya reseptör aracılı apoptotik yolları arttırabilir (Apostolva, 2008). Apoptotik kaskadın belirleyici adımlarından biri, mitokondriden sitozole zararlı proteinlerin salınımı ile sonuçlanan mitokondriyal dış zarın geçirgenliğidir. Mitokondri kaspaz kofaktörlerin, prokaspaz 2-3 ve 9, sitokrom c ve SMAC/Diablo, Endonükleaz G (Endo G) ve AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınımı, apoptozom oluşumu ve apoptoz için hücrenin garantilenmesi ile sonuçlanan intrinsik apoptozun kontrol noktasıdır (Lenza ve ark., 2013).

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokromc gibi proteinler ve mitokondriyeler rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen düzenlenmesinde ve hücre iskeleti organizasyonunda rol oynamaktadır (Orrenius ve ark., 2003).

Mitokondri, sağlıklı hücrelerde sayısı ve morfolojisi değişebilen dinamik organellerdendir. Mitokondrinin temel ve esas rolü, enerji üretimi, kalsiyum tamponlama ve apoptozun düzenlenmesi dahil, hücreye sayısız hizmet sağlamaktır. Bu kritik rolüne rağmen, bir hücrede bu farklı fonksiyonları tam olarak nasıl koordine ettiği hala tam olarak bilinmemektedir (Jeong ve ark., 2008). Geçirgen olmayan (geçirimsiz) mitokondriyal iç membran, aerobik ATP sentezinin yürütüldüğü elektrokimyasal protein bir yapıya sahiptir. Yarı geçirgen dış membran ise, yeterli pro-apoptotik sinyaller ulaşana dek hücre ölümünde görevli proteinlerin depo edildiği periplazmik bir alanı kapsar. Bu membranlar intraselüler kalsiyum dengesinin kontrolünde önemlidir (Lenza ve ark., 2013). Belirli koşullar altında, memeli hücrelerindeki mitokondriyeler birbiriyle bağlantı halindedir. Bu mitokondriyal ağ sayesinde bir hücrenin farklı alanları arasında kalsiyum kanalı ya da enerji sağlanabilir (Jeong ve ark., 2008).

Mitokondri, kaspaz aktivasyonu ve kromozom fragmentasyonunun indüklemesine neden olan apoptotik yolağın temelinde yer almaktadır. (Jeong ve ark., 2008). Mitokondri ve ER, hem fiziksel hem de fizyolojik olarak mitokondriyal metabolizma ve karmaşık hücrel süreçleri etkileyen bir bağlantı halindedirler. Mitokondri ve ER ilişkisinin önemli bir yanı da Ca^{+2} sinyalizasyonu ve modülasyonudur (Deniaud, 2008). ER stresine yol açan katlanmamış proteinlerin birikimi veya ER-Golgi transportunun inhibisyonu, ER'nin apoptoz başlatıcı bir organel olmasına neden olabilir. Ca^{+2} -bağımlı uyarılar, mitokondriyal disfonksiyonu, sitokrom c salınımının ve kaspaz aktivasyonu dahil mitokondriyal bir yolak aracılığıyla ER indüklü apoptoz da Bak ve Bax'ı gerektirir. Bcl-2'nin de ER'da lokalize olduğu ortaya çıkmıştır ve hücre ölümü sırasında Ca^{+2} akışını ayarlamaktadır. Aşırı salgılanan Bcl-2, dinlenme durumundaki ER'deki Ca^{+2} konsantrasyonu azaltır ve kapasitif Ca^{+2} girişinin boyutu ER kaynaklı hücre ölümünün kontrolünde Bcl-2'nin spesifik bir rolü olduğuna işaret eder (Şekil 2.1) (Jeong ve ark., 2008).

Çalışmalar göstermiştir ki, sitozolik Ca^{+2} artışı hem erken hem de geç apoptotik yolak evrelerini oluşturmaktadır ve kalsiyum salınımına bağlı aktifleşen Ca^{+2} kanalları aracılığıyla hem ER'den Ca^{+2} salınımı hem de kapasitif Ca^{+2} akışını etkileyerek apoptojenik bir etki gösterir (Pinton ve ark., 2008).



Şekil 2.1. Apoptozda kalsiyum iyonunun rolü (Altunkaynak ve ark. 2008).

Dış uyarıların oluşturduğu kontrolsüz Ca^{+2} akışı aşırı mitokondriyal Ca^{+2} yüklenmesine yol açtığı için hücrede canlılık kaybına meydana gelebilir. Sitozolik Ca^{+2} 'daki artış mitokondriyal kalsiyumda ikincil bir artışa, mitokondriyal geçirgenlikte bozulmaya, sitokrom c salınımına ve ATP'de düşüşe yol açar (Tang ve ark., 2004). Bu kontrol; hücre içi enerji seviyelerinin sürdürülmesi ile (mitokondri işlevsizleşir ve ATP sentezi bozulursa, hücrel Ca^{+2} dengesi hızla etkilenir) ve Ca^{+2} 'un yüksek konsantrasyonda birikiminin aktif olması ile (mitokondriyal matrikste 1mM), esasen bir seçici uniport faaliyeti ile iki farklı düzeyde gerçekleşir (Apostolva, 2008).

Ca^{+2} mitokondride, mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini ve dolayısıyla ATP üretimini düzenler. ER ve/veya sitozolden Ca^{+2} öncelikle VDAC boyunca MOM (mitokondriyal dış membran)'a hareket eder. Mitokondriye Ca^{+2} alımı sitozolik Ca^{+2} sinyali ve birçok Ca^{+2} -bağımlı hücrel süreçlerinin mekânsal-zamansal (spatiotemporal) modelini düzenler (Jeong ve ark., 2008).

2.3. Ovaryum Kanseri ve Metastaz

Ovaryum kanseri, jinekolojik kanserler arasında ölüme en çok neden olan kanser türüdür (Sawada ve ark., 2011). Yine ölüme neden olma açısından genel kanserler içerisinde meme, bağırsak ve akciğer kanserinden sonra dördüncü sırayı almaktadır. Ayrıca endometrium ve serviks kanserinin toplamından daha fazla ölüme sebep olur. Çünkü hastalık ileri evrelere ulaşana kadar herhangi bir belirti vermemektedir. Ovaryum kanseri tüm genital kanserlerin %20-25'ini oluşturur. Ovaryum kanserlerinin % 90'ı epitelyal kökenlidir. Hastalık uzun bir dönem belirti vermeden veya spesifik olmayan semptomlarla seyrettiğinden, hastaların %70-80'i üçüncü ve dördüncü evrede hekime başvurmaktadır. Hastayı hekime götüren şikayet genellikle karın ağrısı ve karın şişliğidir. Ovaryum kanser hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilme yeteneği ovaryum kanser hastaları arasında morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir.

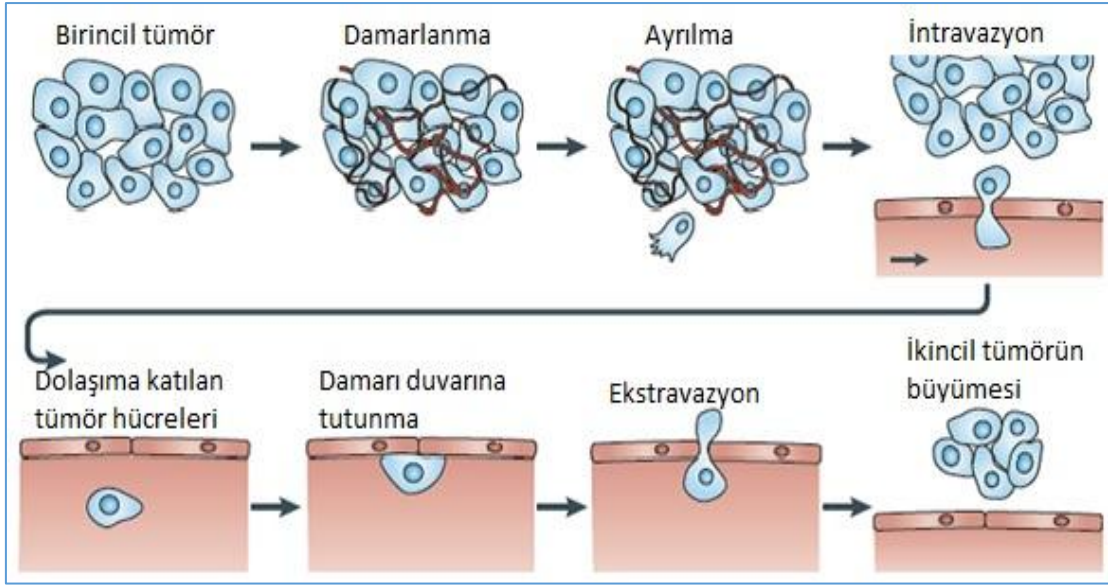
Epitelyal ovaryum tümörleri lenf ve kan yoluyla uzak bölgelere metastaz yapabilese de en sık peritoneal boşluğa bazen de yakın bölgedeki lenf düğümlerine metastaz yapmaktadır (Lengyel,2010). Olguların sadece % 2-3 kadarında akciğer ve karaciğer gibi

uzak bölge metastazları görülmektedir. Evre I' de tanı alanlarda 5 yıllık sağ kalım oranı % 90'dan fazla iken, evre III ve IV' de tanı alanlarda ise bu oran % 25'dir (Bilgen, 2008). Genetik ve etnik farklılıklara ek olarak pek çok üreme ve diyet faktörleri, alkol tüketimi, ovaryum kanseri için risk faktörleri arasında yer almaktadır. Hastaların %70'i, FIGO (Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu) sınıflandırmasına göre ilerlemiş evre olan III ve IV. evrede teşhis edilmektedir. Çünkü uzun süre belirti göstermeyen gizli bir başlangıcı vardır (Mastanabad, 2009).

Metastaz, adezyon reseptörlerinin ve proteazların kontrollü etkileşimleri ile düzenlenmektedir ve geç metastaz, onkogen odaklı mezoteliyal kaplı yüzeylerde tümör nodüllerinin hızla büyümesi ile karakterize edilmektedir (Lengyel,2010).

Ovaryum kanseri, diğer pek çok kanser tipinde bulunan hematöjenöz metastazdan farklı olarak eşsiz bir biyolojik davranış gösterir. Örneğin; meme ve kolon kanseri hücreleri farklı birkaç aşamadan sonra diğer organlara metastaz yaparlar. Ovaryum kanser metastazı biraz daha kolaydır ve kanser hücreleri primer tümörden ayrıldıktan sonra pasif bir mekanizma ile metastaz olurlar. Yani peritoneal sıvının peritona ya da omentuma doğru fizyolojik hareketiyle taşınırlar.

Tümör invazyonunun ve metastazının üç temel aşaması: 1) vasküler endotel ve ekstrasellüler matrikse tutunma, 2) lokal proteoliz ve 3) hareketlilik kazanma olarak sıralanmaktadır. Son iki basamakta birçok proteolitik enzim rol oynamaktadır. Bu enzimler normal organizmada da mevcut olup malignitelerde yüksek plazma seviyelerinin artmış metastaz yeteneği ile birlikteliği gösterilmiştir (Şekil 2.2.) (Curan, 2004).



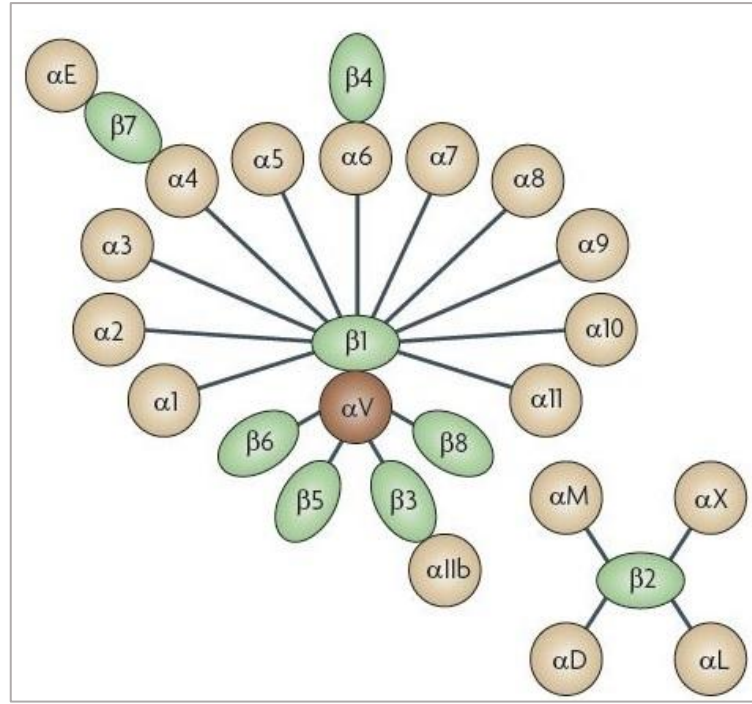
Şekil 2.2. Metastatik sürecin oluşumu (Wirtz ve ark., 2011).

Ovaryum kanserinin metastatik aşamasında ve daha ileri aşamalarında spesifik integrinlerin etkili olduğu bilinmektedir (Sawada ve ark., 2011).

2.4. İntegrinler

Hücrelerarası boşluk ve bazal membranlarda bulunan ESM proteinlerinin hücre adezyonuna aracılık etmesinin yanı sıra, integrinler aynı zamanda hücre göçü ve yaşamını teşvik etmek için de sinyal göndermektedirler (Jin ve ark., 2004). İntegrinler, kalsiyuma bağlı hücre dışı matriks proteinlerinin hücreye bağlanması için önemli bir metazoan reseptörüdür (Hynes ve ark., 2002) ve omurgalılarda hücre-hücre ve hücre-ESM etkileşmesi sağlayan heterodimerik yüzey membran reseptörleridir. Yani, ESM ile intrasellüler ortam arasında integrasyonu sağlayan hücre yüzey glikoproteinleridir. Bu sebeple “integrin ailesi” olarak adlandırılmaktadır.

İntegrinler, α ve β alt birimden oluşan evrimsel bir heterodimerik hücre yüzeyi reseptörleri ile korunmaktadırlar. Memelilerde 18 α - ve 8 β -alt birimlerinden birleştirilerek oluşturulan toplamda 24 farklı reseptör olduğu bilinmektedir (Şekil 2.3.) (Anderson, 2014). Molekülün fonksiyonel aktivitesi için her iki alt ünite de gereklidir ancak bağlanma özgüllüğünün β alt ünitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Yılmaz, 2012).



Şekil 2.3. İntegrin ailesi. İntegrinler, bir α altbirim ve bir β altbirim bulunduran heterodimerlerdir (Cox ve ark., 2010).

Doğal integrin ligandları fibronektin, laminin, vitronektin, kolajenler, thrombospondin, entaktin, fibrinojen gibi ekstrasellüler matriks komponentlerini içerir ve hücrelerarası adezyon molekülü (ICAM) ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ile bağlantı kurarak hücre zarı reseptörleri olarak görev yaparlar (Mizejewski, 1999). Bazı integrinler tek bir ESM protein ligandını seçici olarak tanırken (örneğin, $\alpha 5 \beta 1$ öncelikle fibronektini tanımaktadır), diğerleri birkaç liganda (örneğin, integrin $\alpha v \beta 3$ vitronektin, fibronektin, fibrinojen, denatüre veya proteolize kolajen ve diğer matriks proteinleri) bağlanabilmektedir (Jin, 2004). $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ ve $\alpha v \beta 1$ içeren bir dizi $\beta 1$ integrinlerinin, ESM'nin önemli bir bileşeni olan fibronektin (FN) ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. FN embriyojenez için gereklidir ve diğer birçok biyolojik süreçlere katılmaktadır (Wu ve Fields, 1995).

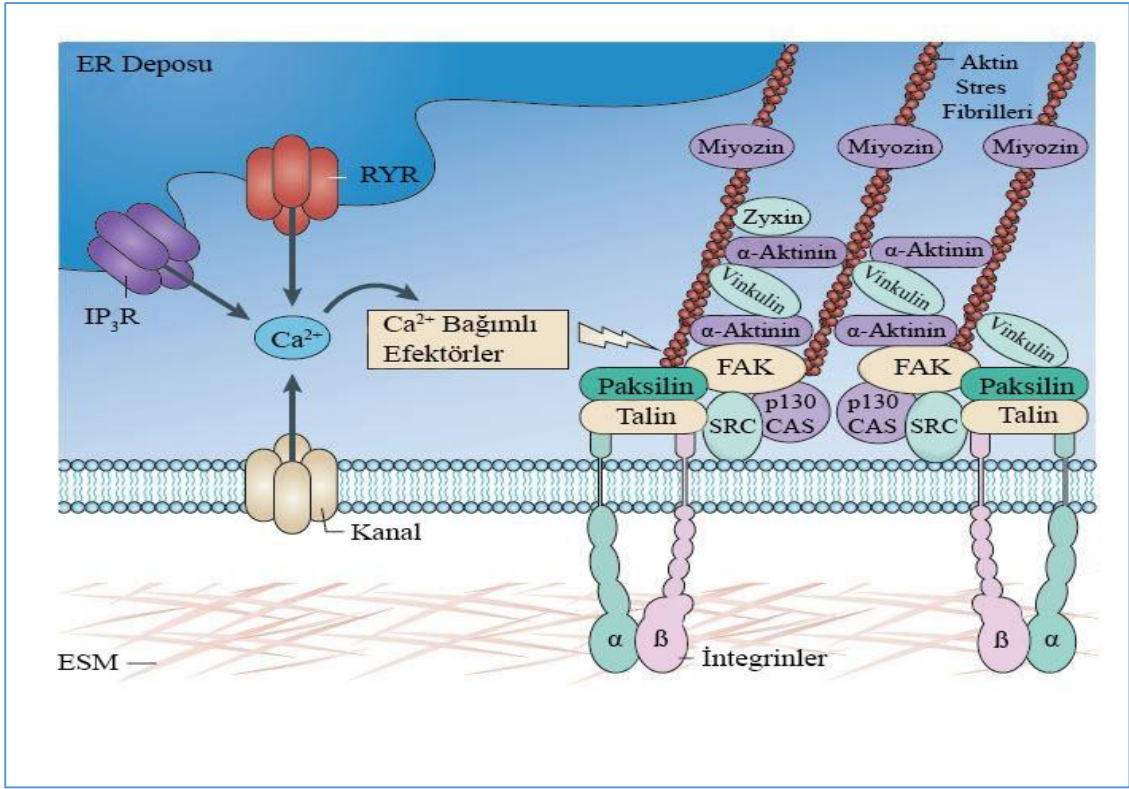
İntegrinlerin çoğu, ligandlarını Arg-Gly-Asp (RGD) ($\alpha 5 \beta 1$) ya da Arg-Glu-Asp-Val (REDV) ($\alpha 4 \beta 1$) gibi kısa aminoasit dizilerini tanıyarak bağlarlar. ESM'ye ligasyon sırasında integrinler kompleks sinyalleri tek başına ya da büyüme faktörü reseptörleriyle birlikte düzenlerler (Mizejewski, 1999). İntegrinler hücrelerarası boşluk ve bazal membranlarda bulunan ESM proteinlerinin hücre adezyonuna aracılık etmelerinin yanı

sıra, migrasyon, invazyon, proliferasyon ya da sağkalımını teşvik etmek için de sinyal göndermektedirler (Jin ve ark., 2004).

Temel adezyon reseptörleri olarak integrinlerin rolü, plazma zarını her iki yönde de uyarmaktır. İntegrin-bağımlı adezyonlarda, hücre-hücre ve hücre-ESM etkileşimleri aracılığıyla dış çevrenin iç iskelete bağlanması gibi yapısal işlevleri bulunmaktadır. (Anderson, 2014). Bununla beraber, hücre bağlanmasına ek olarak, integrinler hücre iskeletinin transmembran bağlantılarını kurmakta (Hynes, 2002) ve büyüme faktörü reseptörlerinden farklı olarak, bir iç enzimatik aktiviteye sahip olmamasına rağmen, fokal adezyon komplekslerinden kinazlarla ve adaptör proteinleri ile birlikte çalışarak çok sayıda hücre içi sinyal yollarını aktive etmektedirler (Jin ve ark., 2004). Aktif hale geçen bir hücre sitoplazmasından sinyal iletildiğinde, integrinlerin hücre dışında kalan kısmı şekil değiştirerek kendi ligandına olan afinitesini artırır. Bu işleme içeriden dışa sinyal iletimi denir. Bu işlem adezyon molekülleri arasında bir tek integrinlerde görülür. İntegrinlerin ligandına bağlanması ile bu kez dışarıdan içeriye sinyal mekanizması çalışır, bu da hücre içerisinde apoptozdan hücre proliferasyonuna kadar birçok işlevde etkili olmasını sağlar (Güç, 2004).

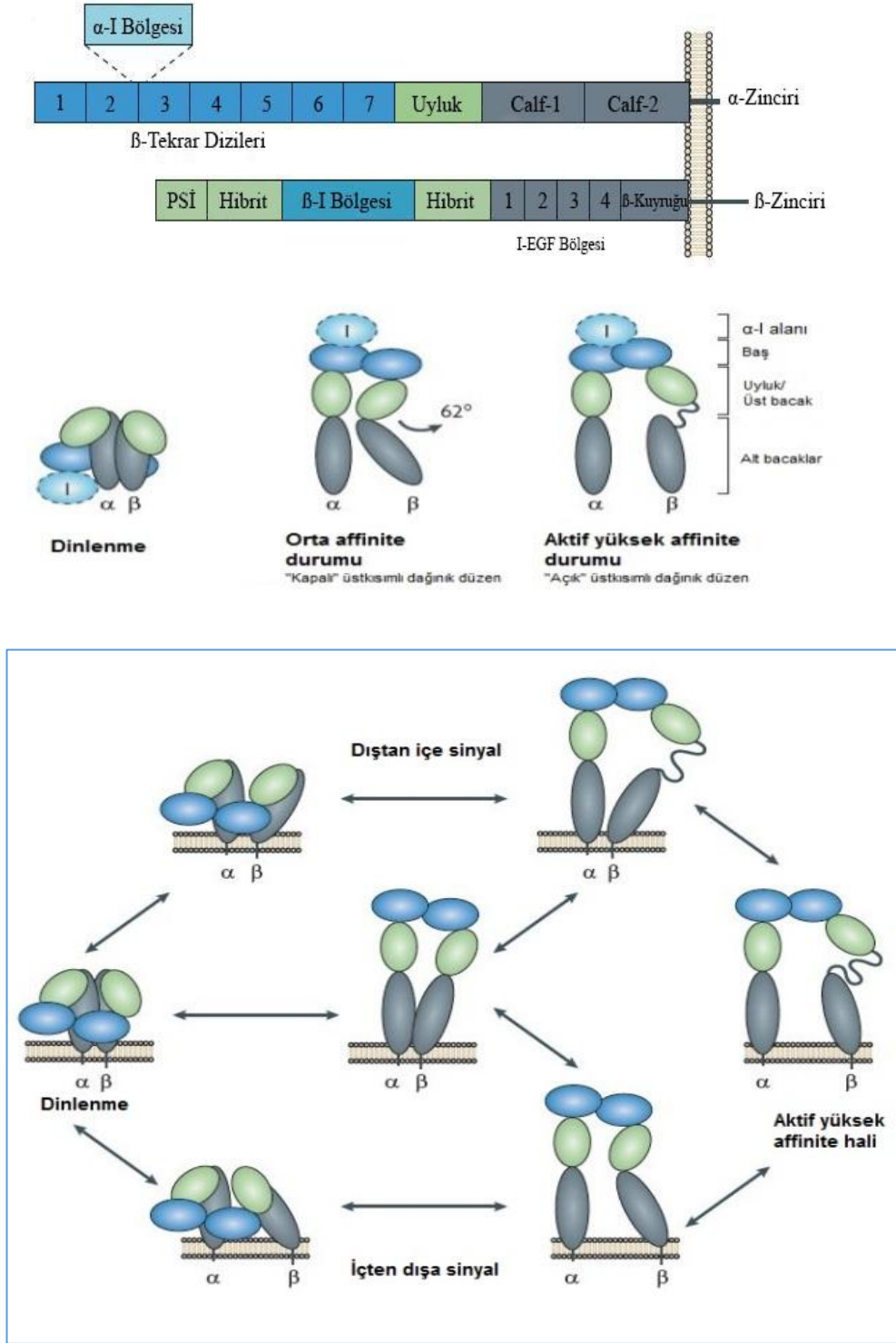
Submikromolar seviyelerde sitozolik Ca^{+2} a duyulan gereksinim, hücre içi sistemdeki depolama ve taşıma yollarının Ca tamponlama proteinleri ile sürdürülmektedir. Bu tamponlama proteinleri kalmodulin, calsequestrin, calponin, kalbindin ve kalretikulini içerebilir. Kalretikülin, hem integrin aracılı kalsiyum adezyon fonksiyonlarının hem de integrin-başlatıcı sinyalizasyonun önemli bir modülatörü olduğunu önceki çalışmalar göstermiştir (Şekil 2.4.) (Mizejewski, 1999).

İntegrinler, β alt biriminin sitoplazmik domaini aracılığıyla hücre iskeletiyle yakından ilişkilidir. Sitoskeletal proteinler ile birlikte, fokal adezyon bölgeleri olarak bilinen supramoleküler sinyal platformları, plazma zarına karşı çift yönlü sinyaller yaymak için integrinler ve fokal adezyon kinaz (FAK), α -aktin, vinkülin, integrin bağımlı kinaz (ILK), Talin, Paksilin, MAP kinaz, çeşitli GTPazlar (RAS, Rho), lipid kinazlar (PI-3 kinaz) ve fosfolipid (fosfolipaz C, A2) ve kalretikulün gibi iki değerlikli katyon bağımlı proteinler gibi sinyal komplekslerini içermektedir (Mizejewski, 1999; Ahmed, 2005; Anderson, 2014).



Şekil 2.4. Fokal adezyon komplekslerinin moleküler organizasyonu ve Ca^{2+} ile düzenlenmesi (Prevarskaya 2011).

Hücre yüzeyi üzerinde bulunan bir integrin, liganda (içten dışa–dıştan içe sinyalizasyon ile) olan affinitenin azalması veya artmasına bağlı olarak hücredeki değişikliklere tepki verebilmektedir. Alternatif olarak, ligandına veya ESM'e bağlanabilen bir integrin, sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonu yol açan konformasyonel bir değişikliğe neden olabilir (Şekil 2.5.) (Ahmed ve ark., 2005).



Şekil 2.5. İntegrin aktivasyonunda meydana gelen değişiklikler (Cox ve ark., 2010).

2.4. Metastatik Ovaryum Kanserinde İntegrinlerin Rolü

Ovaryum kanser hücrelerinin çoğu yumurtalık yüzeyini örten epitelyal hücrelerden türevlenir. Ovaryum kanseri hücreleri bazal membrandan ayrılmadan önce genellikle kanser hücreleri arasındaki intraselüler adezyonların azaldığı epitelyal-mezenşimal bir geçişe (EMT) maruz kalırlar. EMT sıklıkla komşu epitelyal hücreler arasındaki adezyonlar için temel moleküllerden biri olan E-cadherin'in kaybıyla başlar. EMT prosesi süresince kanser hücreleri daha invaziv bir fenotip kazanarak çoğalır ve abdominal kavite boyunca yayılır. Yapılan çalışmalarda, E-cadherin'in bozulmasının bir fibronektin reseptörü olan $\alpha 5\beta 1$ integrinin upregülasyonunu indüklediği belirtilmiştir. $\alpha 5\beta 1$ integrin ise ovaryum kanser hücrelerinin adezyonunu periton gibi ikincil metastaz alanlarına doğru uyarır. Kanser hücreleri primer tümörden bir kere ayrıldıktan sonra serum/asit albumin gradienti içinde tek hücreler ya da çok hücreli sferoidler şeklinde yüzerler. Ovaryum kanser metastazındaki en önemli adım, ovaryum kanser hücrelerinin peritoneal kaviteyi örten mezotelyal hücre tabakası üzerine yapışmasıdır. İntegrinler aynı zamanda ovaryum kanseri ve mezotelyum arasındaki önemli araçlardır (Sawada ve ark., 2012).

İntegrinlerle polivalan ve çapraz bağlantı kuran ESM proteinleri, integrinler ve bağlantılı kofaktörler ile ortaklık içinde çalışarak integrin düzenleyici sinyal yollarının aktifleşmesini sağlamaktadırlar. Örneğin, integrin ligasyonu apoptoz baskılayıcılarını aktifleştirerek ve kaspaz aktivasyonunu inhibe ederek apoptozu baskılamaktadır. İntegrinler ayrıca membrana aktin filamentleri tarafından tutulan Rho ve Rac GTPazlarını aktive ederek hücre göçünü teşvik etmektedir. Bu adezyon proteinleri siklin ekspresyonlarını uyararak hücre döngüsüne katılımını teşvik etmektedirler (Jin, 2004). Bu sebeple integrin ligasyonu, hücre proliferasyonunu, hücrenin hayatta kalmasını ve hücre göçünü teşvik ederek sinyal transdüksiyon kaskadlarını desteklemektedir. Bunun aksine, hücrede integrin-ligand etkileşiminin inhibisyonu, hücre göçünü ve proliferasyonunu inhibe eder ve apoptoza neden olur (Calderwood, 2004).

Ovaryum kanser hücrelerinde farklı α alt üniteleri ile ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ ve $\alpha 6$) $\beta 1$ alt ünitesinin oluşturduğu integrin reseptörlerinin aktif olduğu gösterilmiştir (Cannistra ve ark., 1995), ancak bu tümör tipinde ovaryum kanser hücrelerinde metastaz oluşturma aşamasında $\alpha 4\beta 1$ integrininin aşırı ekspres edildiği ve ileri metastatik ovaryum

hücrelerinde ise $\alpha\beta6$ integrin ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir (Desgrosellier, 2010). $\beta1$ integrinlerinin ESM'e doğru yönelerek ovaryum kanserinin migrasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Aynı integrin ailesinin, ovaryum kanser oluşumunu ve adezyonunu düzenlediği de gösterilmiştir (Ahmed ve ark., 2005). Fibronektine spesifik olarak bağlanan $\alpha5\beta1$ integrinin hedef alındığı bir çalışmada, rekombinant viral proteinin, ovaryum kanserinde GSK-3 β (Glikojen sentaz kinaz 3), PTEN (Fosfataz ve tensin homolog), kaspaz-3 ve PARP'ın parçalanmasını aktive ettiği, FAK, Akt ve MMP-2 (matriks metalloproteinaz-2)'nin downregülasyonu ile ilişkili olarak integrine bağımlı bir şekilde DNA fragmentasyonunu ve apoptozu indüklediği ve hücre metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Peng ve ark., 2011). Bir başka çalışmada ise, osteoprotegerin muamelesinin, FAK/integrin'e bağımlı bir biçimde Akt'yi aktive ederek ve PI3K/Akt (fosfotidilinositol 3-kinaz)' in kimyasal inhibitörlerini önemli derecede inhibe ederek TRAIL (TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand) indüklü apoptozun ovaryum kanser hücrelerinde azalmasına neden olduğu bulunmuştur (Lane ve ark., 2013).

Çeşitli kanser hücrelerinde kollajen bağlayıcı integrinlerin bir araya gelmesiyle ($\alpha2\beta1$ - ve $\alpha3\beta1$ -integrin), E-kadherin dış-alandan kopar, hücre-hücre adezyonunun kaybı oluşur ve tek olan hücrelerin veya sferoidlerin asit içine dökülmesine izin vererek matriks metalloproteinaz (MMP) -9 indüklendiği bilinmektedir. Ovaryum kanser hücreleri, mezotelyale bağlandıkları zaman kanser hücreleri, MMP-2'yi upregüle ederken, ardından hücre dışı matriks proteinleri fibronektin ve vitronektini küçük fragmentlere ayırmaktadır. Daha sonra kanser hücreleri fibronektin ($\alpha5\beta1$ -integrini) ve vitronektin ($\alpha\beta3$ -integrin) reseptörlerini kullanarak daha küçük bu parçalara çok daha güçlü bir şekilde bağlanır ve bu nedenle integrinlerin, mezotelyoma ovaryum karsinom metastazının önemli araçları olduğu tespit edilmiştir (Lengyel, 2010).

Bloke olmuş integrin bağlantısı ESM'in hücre bağlantısını engelleyebilir ve böylece göçü önler, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, antagonize integrinlerin hücre migrasyonuna yol açan sinyal transdüksiyonunu etkin şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. İntegrin antagonistleri primer ve transforme edilmiş hücrelerin hücre göçünü ve yayılmasını baskılamakta ve aynı zamanda primer hücrelerin apoptozunu uyarmaktadır, aynı zamanda tümör anjiyogenezini ve tümör metastazını da bloke etmektedirler (Jin, 2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre hattı

İnsan ovaryum hücre dizisi (SKOV-3) İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği öğretim üyesi Prof. Dr. Volga Bulmuş'un laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Fibronektin (Sigma, Aldrich-ABD), Tunikamisin (Sigma, Aldrich-ABD), EGTA (Sigma, Aldrich-ABD); dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem-Almanya); Etil alkol (Sigma, Aldrich-ABD), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom-Germany); penisilin-streptomisin solüsyonu (Gibco-ABD), MEM non EAA (Gibco-ABD), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck- Almanya), Tripsin (Biochrom-Almanya); Fluo-3 AM (Sigma, Aldrich-ABD); Rhod-2 AM (Santa Cruz-ABD), Ru360 (Santa Cruz-ABD); Bovine Serum Albümin (Sigma, Aldrich-ABD); Pluronic F127 (Sigma, Aldrich-ABD); HEPES (Sigma, Aldrich-ABD); Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Tech., Gibco-ABD); Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Merck-ABD); Potasyum klorür (KCl) (Santa Cruz-ABD); Magnezyum klorür (MgCl_2) (Sigma-ABD); Kalsiyum klorür (CaCl_2) (Bereket Kimya,Türkiye); Glukoz (Doğa ilaç Türkiye); Bovine Albumin Serum (Sigma-ABD); Glutaraldehit (EMS-ABD); Osmium Tetroksit (EMS-ABD); Uranil asetat (EMS-ABD); Propilen oksit (Merck-A.B.D.); AralditCY212 (Agar Scientific-İngiltere); Sodyum sitrat (Merck-ABD); Kurşun nitrat (Merck-ABD); Etanol (Sigma, Aldrich-ABD); Glass knife strip (EMS-ABD); Agar (Sigma, Aldrich-ABD).

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Azot Tankı (Taylor Wharton-Almanya); buzdolabı (Arçelik- Türkiye); karbondioksitli (CO_2 'li) etüv (Hera Cell 240 Thermo Scientific-Almanya); derin dondurucu (-20°C) (Arçelik No Frost-Türkiye); distile su cihazı (Nüve- Türkiye); etüv (Nüve- Türkiye);

hassas terazi (Ohaus-İsviçre); floresan mikroskop (Leica-Almanya); laminar kabin (Steril Kabin) (Heal Force-Çin); otoklav (ALP-Japonya); santrifüj (Hettich- Almanya); sterilizatör (Nüve FN 500-Türkiye); su banyosu (Nüve BM 302- Türkiye); vorteks (Yellowline-Belçika); Glass Knife Boat (TedPella, ABD); Rotator (TedPella, ABD); Ultramikrotom (Leica-Almanya); Trim cihazı (Leica-Almanya); Knifemaker (Leica-Almanya).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

İnsan ovaryum hücre dizisi (SKOV-3) (HPA culture collections-10032308) ve % 90 1:1 oranında DMEM, % 20 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve 2 mM Glutamine, 2 mM sodyum piruvat besi yeri içerisinde % 5 CO₂ iç atmosfere sahip 37°C inkübatörde tutulur ve her 3 günde bir hücreler tripsin / EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürlerle ayrılır.

3.2.2. Hücre içi kalsiyum analizi

Hücre içi kalsiyum analizi için akım sitometrisi yöntemi gerçekleştirilmiştir. Tripsin enzimi ile süspanse edilen hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 1×10^6 hücre/ml sayılarak Krebs-Ringer tamponu (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM Hepes, 10 mM glukoz ve 0.01 BSA) içerisine alınmıştır. Final konsantrasyonu 4 µM olan Fluo-3 AM, % 1'lik Pluoronic F127 ve % 0,1'lik BSA boya karışımı ile hücreler 37°C'de, % 5 CO₂ içeren etüvde 30 dakika inkübe edilmişlerdir (Kumar, 2014). İnkübasyon sonrasında 1 kez PBS ile yıkama yapılmıştır ve her biri 1'er ml olan hücre çözeltileri farklı eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra BD Accuri Flow Cytometer cihazıyla analiz edilmiştir. 1 veya 2 dakikalık kontrol ölçümler alındıktan sonra, Tunikamisinin 3-6-12-18 ve 24 µM konsantrasyonları tüplere eklenmiş ve ölçüm yapılmıştır.

EGTA (etilen glikol bis (β-aminoetil eter)- N,N,N',N'-tetraasetik asit)), 1,5 ve 10 mM konsantrasyonlarda aynı şekilde ölçüm yapılmıştır.

3.2.3. Mitokondriyal kalsiyum analizi

Mitokondriyal kalsiyum analizi için akım sitometrisi yöntemi gerçekleştirilmiştir. Tripsin enzimi ile süspansiyon edilen hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 1×10^6 hücre/ml sayılarak PBS içerisine alınmıştır. Final konsantrasyonu $5 \mu\text{M}$ Rhod-2 AM, % 0.02'lik Pluoronic F127 ve % 0,1'lik BSA boya karışımı ile hücreler 37°C 'de, % 5 CO_2 içeren 30 dakika etüvde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında 1 kez PBS ile yıkama yapılmıştır ve Krebs-Ringer tamponu (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 10 mM glukoz ve % 0.01 BSA) içerisine alınmıştır (Kumar, 2014). İnkübasyon sonrasında 1 kez PBS ile yıkama yapılmıştır ve her biri 1'er ml olan hücre çözeltileri farklı eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra BD Accuri Flow Cytometer cihazıyla analiz edilmiştir. 1 veya 2 dakikalık kontrol ölçümler alındıktan sonra Tunikamisinin 3-6-12-18 ve $24 \mu\text{M}$ konsantrasyonları tüplere eklenmiş ve ölçüm yapılmıştır.

EGTA (etilen glikol bis (β -aminoetil eter)- N,N,N',N'-tetraasetik asit)), 1,5 ve 10 mM konsantrasyonları aynı şekilde ölçüm yapılmıştır.

$10 \mu\text{M}$ Ru360 hücrelerle 1saat inkübe edildikten sonra tunikamisin $18 \mu\text{M}$ ile hücreler muamele edilerek ölçüm yapılmıştır.

1mM CaCl_2 içermeyen Krebs- Ringer tamponu hazırlanarak aynı konsantrasyonlardaki ölçümler kalsiyumsuz tampon içerisinde de gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Anneksin V-FITC / PI (propidyum iyodür) ile apoptoz belirleme yöntemi

Kaplamasız plakalara 1×10^6 hücre/ml ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunmaları için 2 saat % 5 CO_2 37°C 'de etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler serumsuz besiyeri içerisinde 2 saat $18 \mu\text{M}$ TN ile muamele edildikten sonra tripsin ile ortamdan kaldırılarak 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. FITC Anneksin V Apoptoz Tanıma Kiti II (BD Pharmingen 556570) prosedürü uygulanmıştır. $1 \times$ soğuk PBS ile 2 kez yıkanmışlardır ve 1×10^6 hücre/ml de olacak şekilde $1 \times$ Anneksin-V bağlanma çözeltisinde süspansiyon edilirdikten sonra hücre solüsyonundan 100 μl alınarak tüplere aktarılmıştır. Daha sonra her bir tüpe, 5 μl Anneksin-V/FITC ve 5 μl propidyum iyodür çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 μl $1 \times$ Anneksin-V bağlanma çözeltisi ilave

edilmiş ve hücreler 1 saatlik boyama süresi içerisinde akım sitometrisi (BD C6 Accuri) ile analiz edilmiştir.

3.2.5. Sitokrom c ve Endo G'nin immünofloresan boyama ile görüntülemesi

24 kuyucuklu plaka örnek sayısına göre konsantrasyonu 50 µg/ml fibronektin ve 10 µg/ml Poli-L-lizin proteinlerle kaplanmıştır. Plaka 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 3 kez PBS ile yıkamalar yapılmıştır. Yıkamaların ardından kaplamasız ve protein kaplı plakalara 1×10^6 hücre/ml her bir kuyucuğa ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunmaları için 2 saat % 5 CO₂ 37° C'de etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelere 2 kez PBS ile yıkamalar yapılmıştır. Yıkamaların hemen sonrası hücreler % 3.7'lik paraformaldehit ile 15 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir. PBS ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Buz üzerinde % 0,1 PBS içerisinde Tween 20 ile 15 dakika permeabilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 3 kez soğuk PBS ile yıkama yapılmıştır. Örnekler % 1'lik BSA ile 1 saat oda sıcaklığında tutulmuştur. 1 saatin sonunda birincil antikolar belirlenen oranlarda hazırlanmış ve bir gece boyunca +4° C'de bekletilmişlerdir. İnkübasyonun ardından hücrelere 2 kez PBS ile yıkamalar yapılmıştır. Yıkamaların ardından ikincil antikolar 1 saat +4° C' de inkübe edilmişlerdir. Sonrasında Leica DMI 4000B floresan mikroskopunda 40X objektif ile görüntüleme yapılmıştır.

3.2.6. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Hücre kültürü uygulamasına tabi tutulmamış petri kapları, 50 µg/ml fibronektin ile 4°C'de bir gece inkübasyona bırakılarak protein kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde fibronektin kaplı petrilere, % 0.1 BSA ile 1 saat 37° C'de inkübe edilerek spesifik olmayan bağlanma önlenmiştir. 1×10^6 hücre/ml tripsin ile kültür ortamından toplanarak fibronektin-kaplı petrilere aktarılmış ve integrin aktivasyonu için, % 5 CO₂ 37° C'de tunikamisine ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tripsinle ortamdan kaldırılan 5×10^6 hücre/ml ilk önce 3 kez tampon ile yıkanmış ve 0.1 M fosfat tamponlu % 2.5'lik glutaraldehitte bütün gece boyunca 4 °C bekletilmişlerdir (0.1 M, pH 7.2). Tespit süresi bitiminde tampon ile 3 kez PBS ile yıkanan hücreler 1 saat %1 lik osmiyum tetraoksida ile etkin bırakılarak ikincil fiksasyonları yapılmıştır ve % 5'lik agara

gömülmüştür. % 1'lik uranil asetat ile 15 dakika blok boyama yapıldıktan sonra dereceli alkol olarak;

% 30 etil alkol 10 dakika

% 50 etil alkol 10 dakika

% 70 etil alkol 10 dakika

% 90 etil alkol 10 dakika

% 90 etil alkol 10 dakika

alkol serilerinden geçirilmiştir ve dehidre edilmeleri sağlanmıştır.

Son olarak propilen oksite alınan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyaline gömülerek bloklar hazırlanmıştır. 60° C'lik etüvde 48 saat süre ile polimerize edildikten sonra trimlenen bloklardan 60 nm kalınlığında tam ince kesitler alınmıştır (Leica Ultracut R). Gidler uranil asetat-kurşun sitrat boyası ile tekrar boyandıktan sonra TEM (Jeol JEM 1220) altında incelemeleri yapılmıştır (Harhaji,2009).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Hücre İçi Kalsiyum Değişimlerinin Akım Sitometrisi İle Belirlenmesi

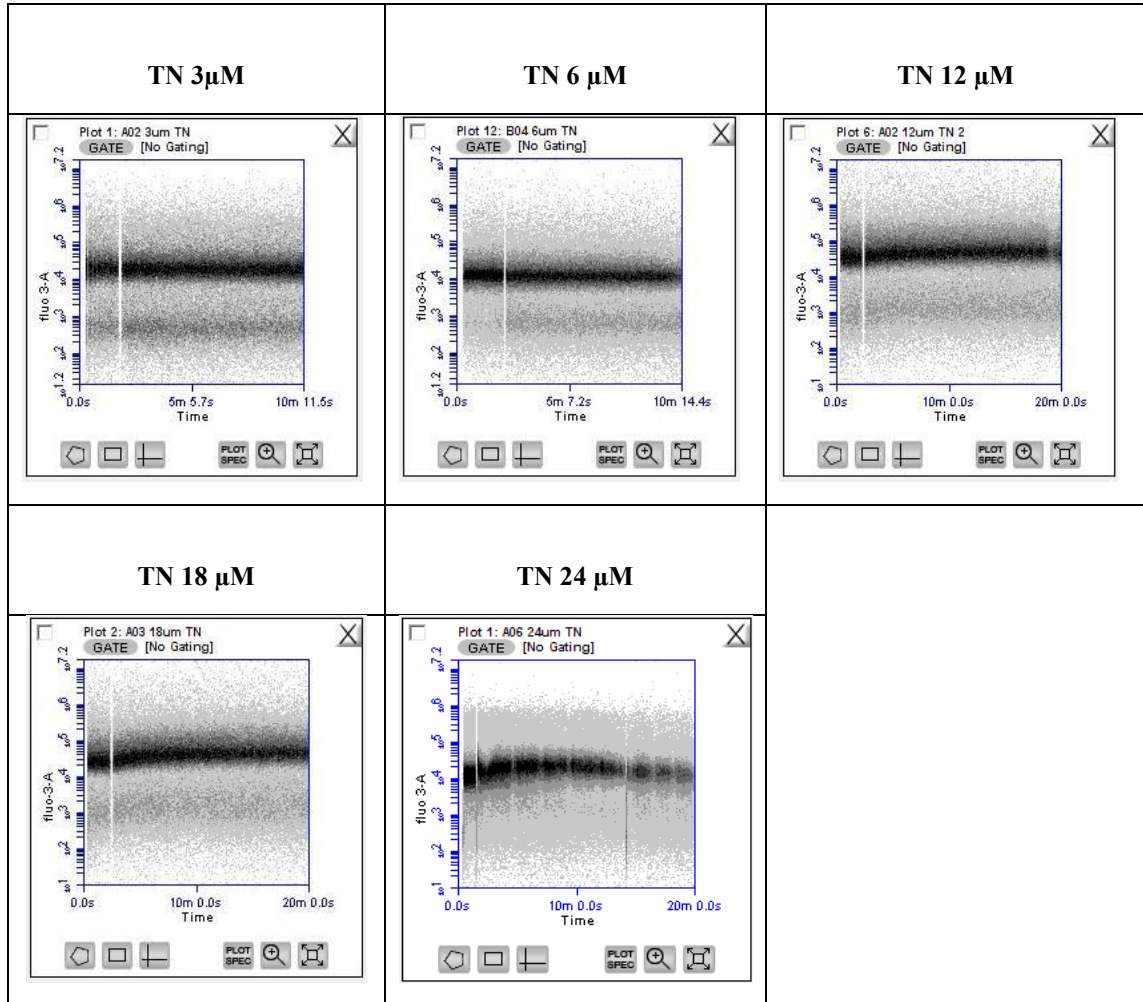
Ca^{+2} indikatörleri arasında en yaygın kullanılanlar kimyasal floresan problardır, çünkü diğer Ca^{+2} indikatörleri ile karşılaştırıldığında bu indikatörlerin $[Ca^{+2}]_i$ sinyali (ışık) değişimi oldukça büyüktür. Fluo-3 boyası, Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu (CLSM) ve akım sitometri yöntemleri için en uygun Ca^{+2} indikatörlerinden biridir (Takahashi ve Camacho, 1999).

Hücre içinde esterazlar, hücre geçirgenliği olmayan indikatörün kapalı probunun AM (asetoksimetil) grubunu parçalayarak indikatörün AM formunun hücre membranlarına pasif olarak yayılmasını sağlar (Takahashi ve Camacho, 1999). Kalsiyum ölçümü için gerekli boya karışımında bulunan, Pluronic F-127, fizyolojik ortamda büyük boya moleküllerinin çözünmesine yardımcı olan ve iyonik olmayan dağıtıcı bir maddedir. Uzun yüklenme sürelerinin gerekli olmasından dolayı uygun osmolaliteyi koruması için BSA (Takahashi ve Camacho, 1999) tampona ilave edilmiştir.

SKOV-3 hücrelerinin, Ca^{+2} indikatörü Fluo-3 AM boyasıyla inkübasyonun ardından, tunikamisin 3-6-12-18 ve 24 μM konsantrasyonlarına bağlı hücre içi kalsiyumdaki değişimleri akım sitometrisi yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 4.1.). Tunikamisin (TN), protein glikozilasyonunun bir inhibitörü olup, UDP-N-asetilglukozamin dolikol fosfatlanmasını inhibe ederek N-bağlı protein glikozilasyonunu bloke etmektedir. Hücre içi Ca^{+2} depolarını harekete geçirerek plazma membranından Ca^{+2} akışını artırmaktadır (Buckley ve ark.,1997).

Çeşitli ovaryum kanseri hücre hatlarında (COLO316, PEO14 ve OAW42) yapılan bir çalışmada, Fluo-3 AM boyası kullanılarak 2 μM TN ile 48 saat muameleye bağlı hücre içi kalsiyum değişimi akım sitometrisi yöntemiyle görüntülenmiş ve kalsiyum değişimlerinde (artışlar) hücreler arasında farklılıklar gözlenmiştir (Lei ve Henderson, 2014). Bir diğer çalışmada ise, aortik düz kas hücrelerinde 10 $\mu g/ml$ TN'e bağlı ER/SR stresi oluşturularak

Fluo- 4 AM boyasıyla sitozolik kalsiyumun floresan yoğunluğunda saniyeler içerisinde hızlı bir yükseliş olduğu gösterilmiştir (Ziomek, 2014).



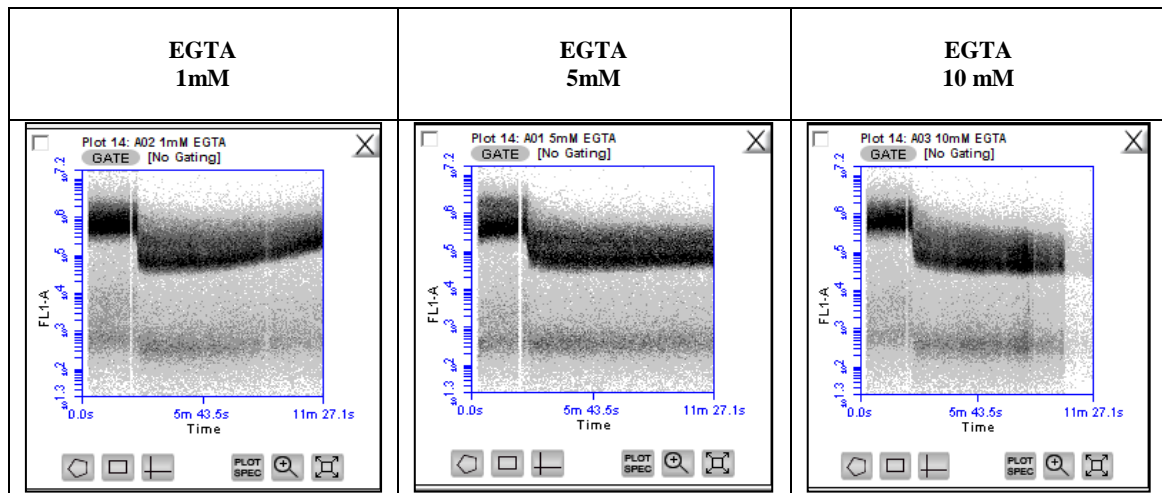
Şekil 4.1. 1mM Ca⁺² içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 3-6-12-18 ve 24 μ M TN konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi

Elde ettiğimiz sonuçlarda, yaklaşık 2 dakikalık kontrol ölçümlerinin ardından, Tunikamisinin 3 ve 6 μ M konsantrasyonlarına bağlı floresan yoğunluğunda herhangi bir değişim gözlenmemişken, 12, 18 ve 24 μ M konsantrasyonlarının floresan yoğunluğu düzeylerinde zamana bağlı artış görülmüştür. 18 ve 24 μ M konsantrasyonları, 12 μ M'e göre daha etkili ve kısa süre içerisinde floresan yoğunluk değişimleri ölçülmüştür. 18 μ M TN konsantrasyonunun ise düzenli bir sitozolik kalsiyum artışına sebep olduğu görülmektedir (Şekil 4.1).

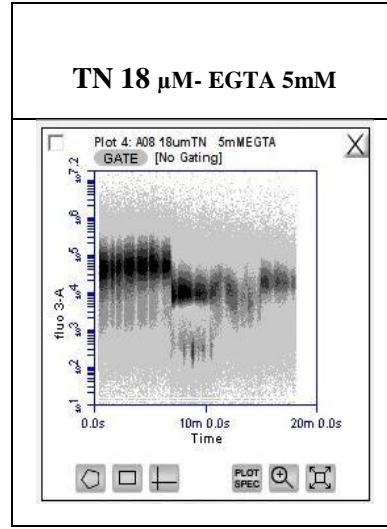
Ca^{+2} şelatörü olan EGTA hücre içi kalsiyum sinyalini zayıflatmaya neden olmaktadır. EGTA, asit formunu serbest bırakarak hücre içi esterazlar tarafından parçalanan asetoksimetil esterler ile hücrelere girerler ve serbest halde bulunan kalsiyuma bağlanırlar (Hajnoczky, 2006).

1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarındaki EGTA ile yaptığımız ölçümler sonucunda, Fluo-3 AM ile boyanan hücrelerde, 1 mM'da kalsiyuma bağlı floresan yoğunluğunda ilk başta etkili bir düşüş olmasına rağmen belli bir zaman sonrasında konsantrasyona bağlı olarak sitozolik kalsiyumda tekrar bir artış görülmüştür. 5 mM EGTA konsantrasyonunda ise düzenli sitozolik kalsiyumda azalış uzun süreli devam etmiştir. Ancak diğer konsantrasyonlara göre 10 mM EGTA'da etki çok daha kısa sürmüştür ve yaklaşık 6-7 dakika içerisinde hücrelerde ışımının olmadığı analiz ile gösterilmiştir (Şekil 4.2.).

1 mM CaCl_2 içeren tampon solüsyonundaki SKOV-3 hücrelerinde kontrol ölçümünün ardından 18 μM TN ilave edilmiştir ve yaklaşık 5 dakika boyunca sitozolik kalsiyum artışı ölçülmüştür. 5 dakikanın sonunda 5 mM EGTA eklenmiştir ve kalsiyum sinyalinin inhibe edildiği görülmüştür (Şekil 4.3.).



Şekil 4.2. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 1, 5 ve 10 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi



Şekil 4.3. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine 18 μ M TN ve 5 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi

Hücre dışı kalsiyumun hücre içi kalsiyum üzerindeki etkisi, bovin aortik endotel hücrelerinde sitozolik kalsiyum indikatörü Fura-2 ile spektrofloreometre yöntemi kullanılarak kalsiyum içeren tamponda ölçülmüş ve 12 μ g/ml TN ve 1 mM EGTA konsantrasyonları kullanılmıştır. Kalsiyumlu tamponda TN etkisinin uzun süre devam ettiği ve EGTA ilavesinin ardından yoğunlukta hızlı bir düşüşün gerçekleştiği grafikte gösterilmiştir (Buckley, 1997).

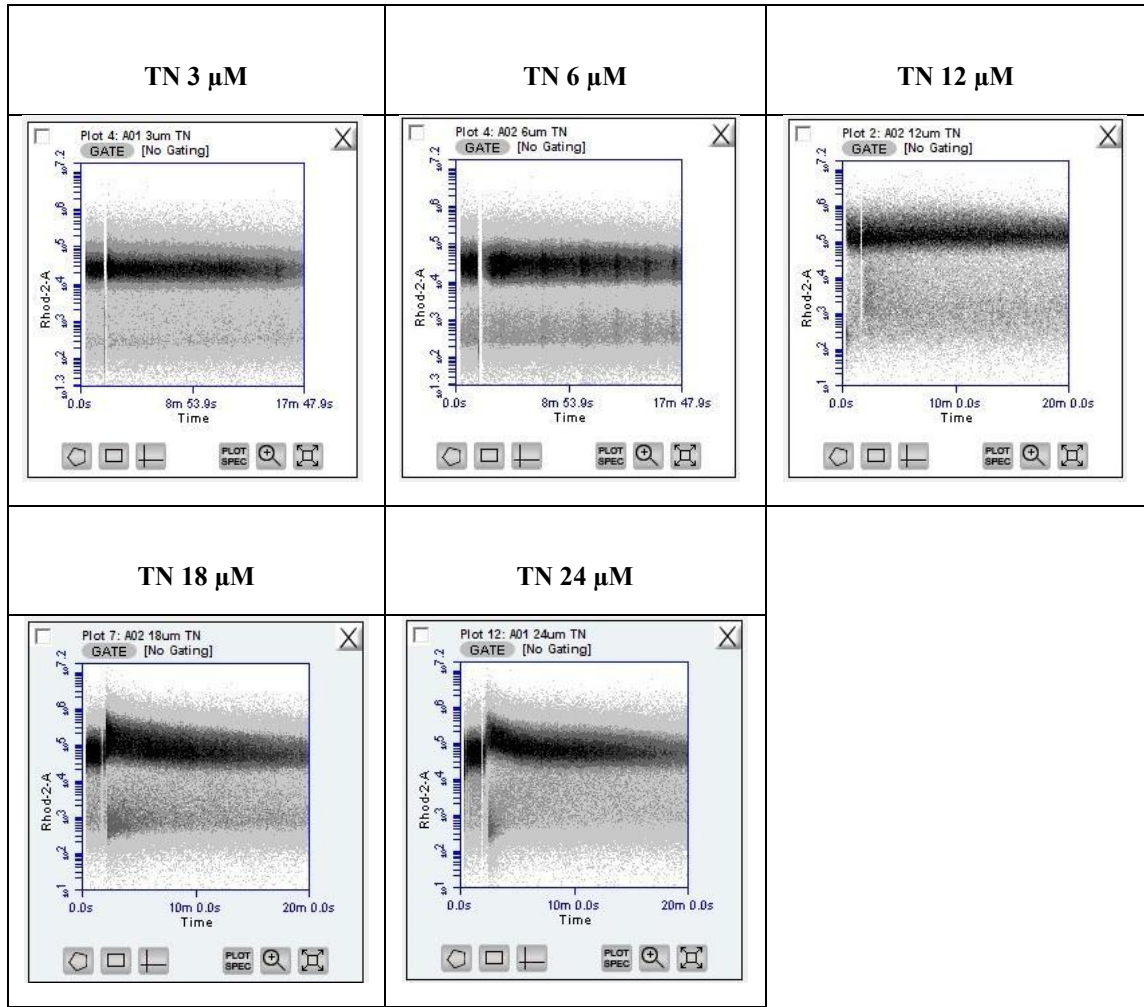
4.2. Mitokondriyal Kalsiyum Değişimlerinin Akım Sitometrisi İle Belirlenmesi

Mitokondrideki metabolik süreçlerin etkisi mitokondriyal matriksteki serbest kalsiyum konsantrasyonunu etkilemektedir. Mitokondriyal kalsiyumun giriş-çıkışı, elektroforetik bir mekanizma ile kontrol edilmektedir (Molina ve ark., 1990). Ca^{+2} mitokondride, mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini ve dolayısıyla ATP üretimini düzenler. ER ve/veya sitozolden Ca^{+2} öncelikle VDAC boyunca MOM' a hareket eder. Mitokondriye Ca^{+2} girişi, sitozolik Ca^{+2} sinyalini ve birçok Ca^{+2} -bağımlı hücrel süreçleri düzenler (Jeong ve ark., 2008).

Mitokondriyal kalsiyumdaki değişimler, SKOV-3 hücrelerinde tunikamisin konsantrasyonlarına bağlı Fluo-3 AM ile benzer çalışma prensibine sahip floresan membran geçirgen florokromu olan Rhod-2 AM boyası kullanılarak akım sitometrisi yöntemi ile analiz edilmiştir.

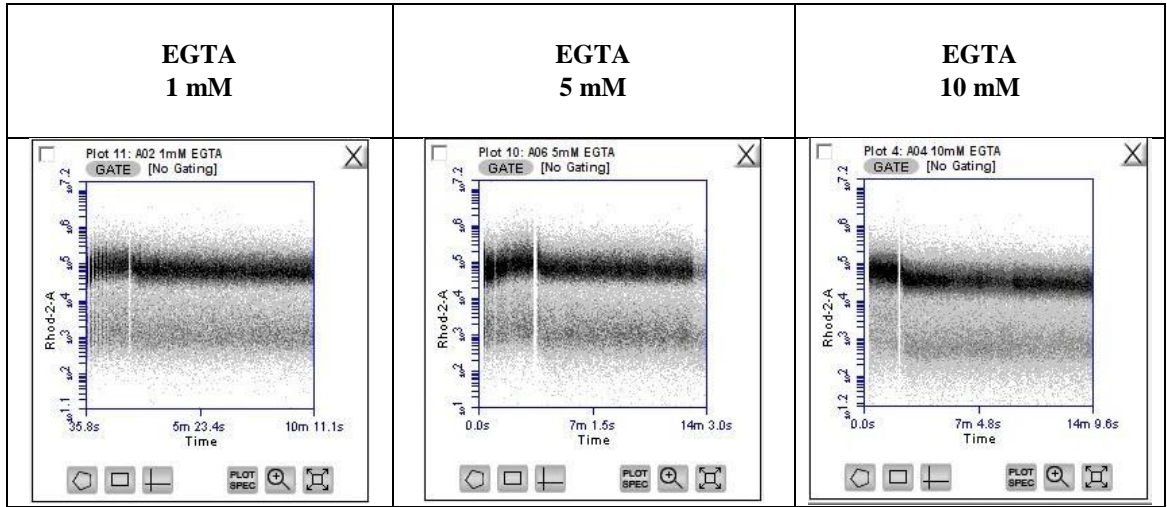
Deniaud ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada serviks (HeLa) ve kolon (HCT116) kanseri hücrelerinde ER stresi ajanları ile floresan mikroskopta Rhod-2 AM boyası kullanarak 6.25 $\mu\text{g/ml}$ TN konsantrasyonuna bağlı mitokondriyal kalsiyum artışının kısa sürede (~10 dakikadan önce) gerçekleştiği gösterilmiştir.

1 mM $CaCl_2$ içeren tampon ile yapılan ölçümlerde, 3 ve 6 μM TN konsantrasyonlarının mitokondriyal kalsiyuma bağlı floresan yoğunluğunda değişim görülmemiştir. 12, 18 ve 24 μM TN konsantrasyonlarındaki mitokondriyal kalsiyum değişimindeki floresan yoğunluğu sitozolik kalsiyumdaki değişimlere oranla daha yüksek ölçülmüştür. 18 ve 24 μM TN'de çok kısa sürede ve etkili bir artış görülmüştür (Şekil 4.4.).



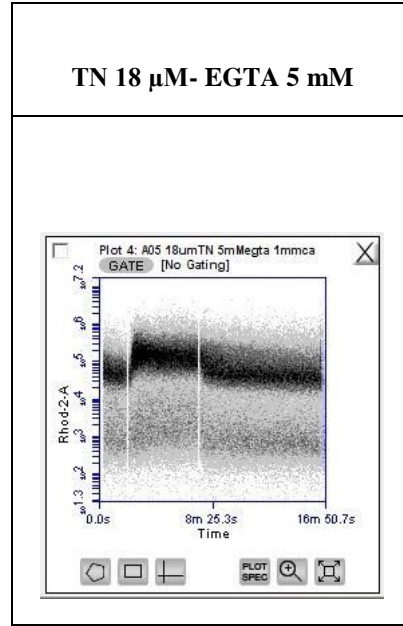
Şekil 4.4. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs- Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 3-6-12-18 ve 24 μM TN konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi

Mitokondriyal kalsiyum 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarındaki EGTA ile 1 mM CaCl_2 içeren tampon içerisinde ölçülmüş, Rhod-2 AM ile boyanan hücrelerde, mitokondriyal kalsiyum sinyalindeki floresan yoğunluğundaki düşüş, sitozolik kalsiyum kadar etkili olmamıştır. 5 mM yaklaşık 12. dakikadan sonra ışığa kalmamışken, 10 mM konsantrasyonu ile muamelenin sonrasında 5 ila 10 dakika arasında ışımada düzensizlikler görülmüştür (Şekil 4.5.).



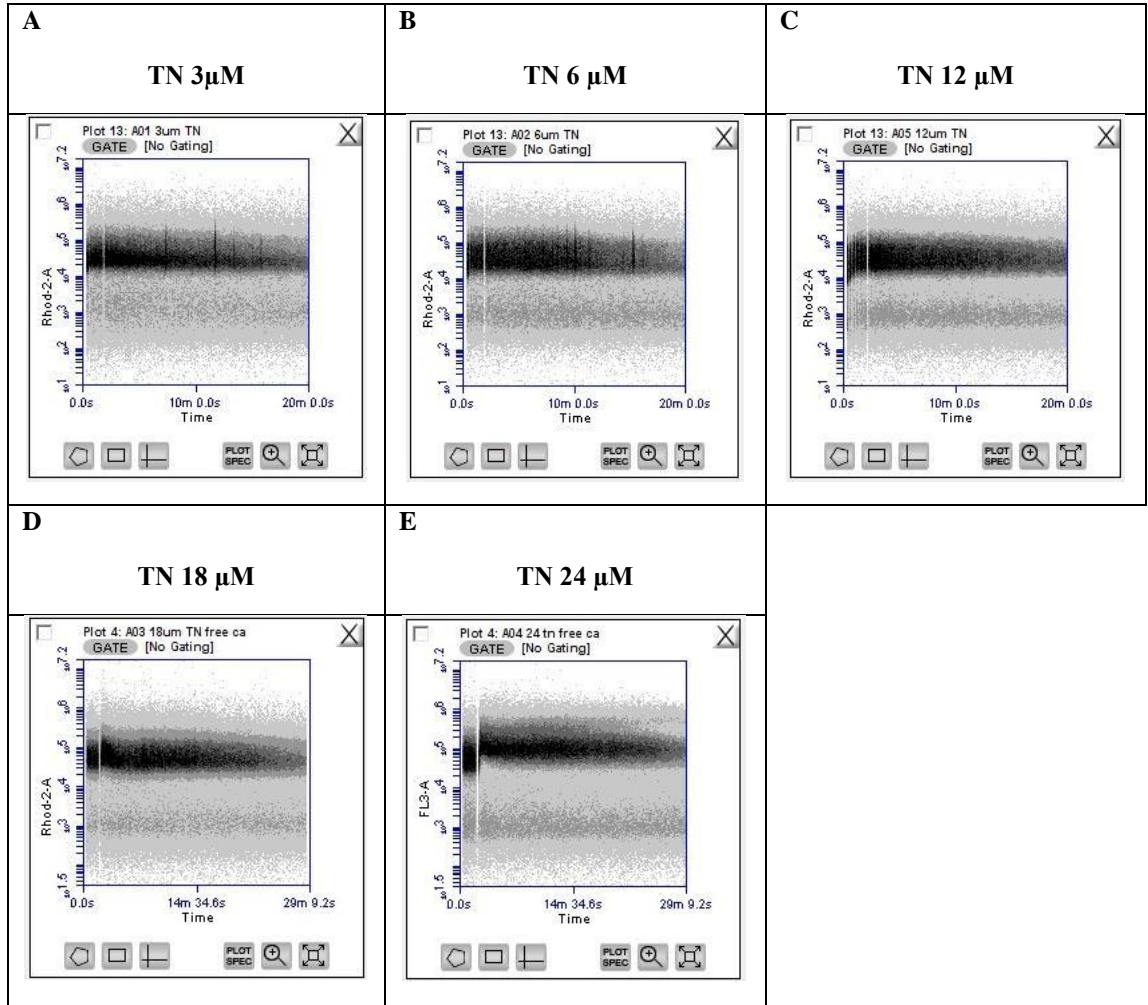
Şekil 4.5. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 1, 5 ve 10 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından mitokondriyal kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi

1 mM CaCl_2 içeren tampon solüsyonundaki SKOV-3 hücrelerinde kontrol ölçümünün ardından 18 μM TN ilave edilmiştir ve yaklaşık 5 dakika boyunca mitokondriyal kalsiyumda hızlı ve etkili artış ölçülmüştür. 5 dakikanın sonunda 5 mM EGTA eklendi ve EGTA'nın TN ile indüklenmiş kalsiyum akışındaki artışı bloke ettiği görülmüştür (Şekil 4.6.).



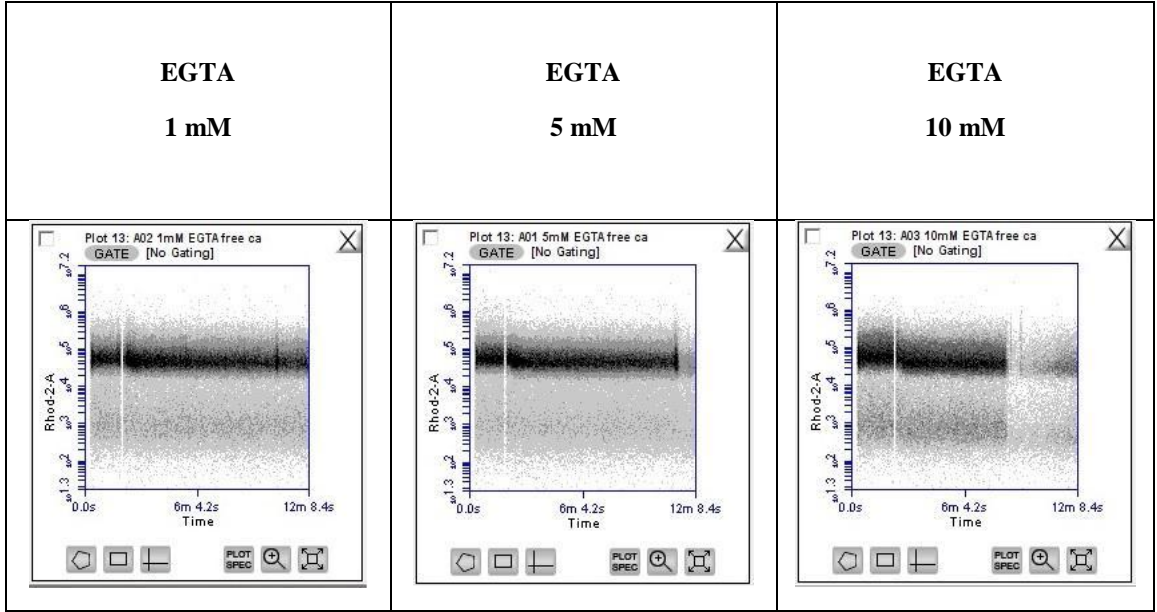
Şekil 4.6. 1 mM Ca^{+2} içeren Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine 18 μM TN ve 5 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından sitozolik kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi

Kalsiyum içermeyen tampon ile yapılan ölçümlerde, konsantrasyonların hepsinde 20 dakikadan önce floresan ışımının kaybolduğu görülmüştür 3, 6 ve 12 μM ' de mitokondriyal kalsiyuma bağlı floresan yoğunluğunda herhangi bir artış olmazken, 18 ve 24 μM TN konsantrasyonlarındaki mitokondriyal kalsiyumun floresan yoğunluk artışı kalsiyum içerikli tampondakine göre daha az olarak ölçülmüştür. Ortamda kalsiyum bulunmamasının mitokondrideki kalsiyum artışını etkilediği görülmüştür (Şekil 4.7.).

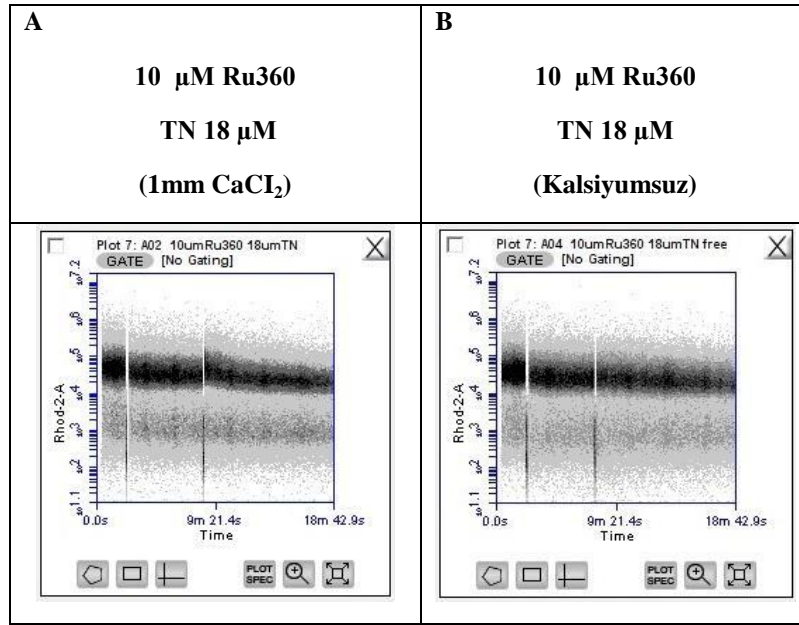


Şekil 4.7. Kalsiyumsuz Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 3-6-12-18 ve 24 μM TN konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi

Mitokondriyal kalsiyumdaki değişim 1, 5 ve 10 mM EGTA konsantrasyonları kalsiyum içermeyen tampon içerisinde bulunan hücrelerde analiz edilmiştir. Rhod-2 AM ile boyanan hücrelerde, mitokondriyal kalsiyum sinyalindeki floresan yoğunluğundaki düşüş çok belirgin olmamakla beraber ortamdaki kalsiyum olmamasından kaynaklı etkinin 5 ve 10 mM'da kısa sürdüğü ve hücrelerde ışımının kaybolduğu görülmüştür (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Kalsiyumsuz Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerine sırasıyla 1, 5 ve 10 mM EGTA konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından mitokondriyal kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi



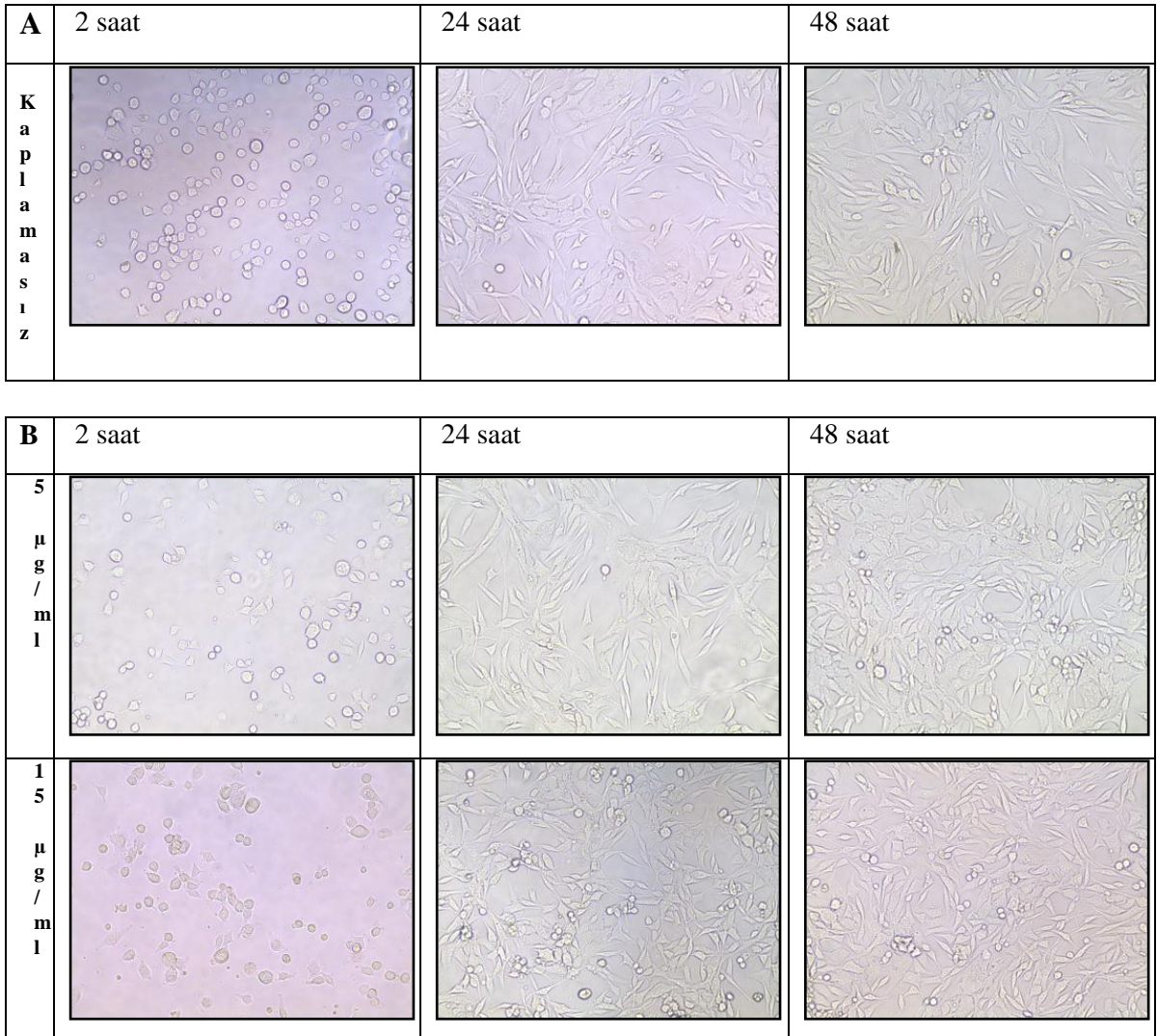
Şekil 4.9. 1 mm CaCl₂ ve kalsiyumsuz Krebs-Ringer tamponu içerisindeki SKOV-3 hücrelerinin 10 μ M Ru360 ile 1 saat inkübasyon sonrası TN 18 μ M konsantrasyonu muamelesi ile mitokondriyal kalsiyum dağılımının akım sitometri cihazı ile görüntülenmesi

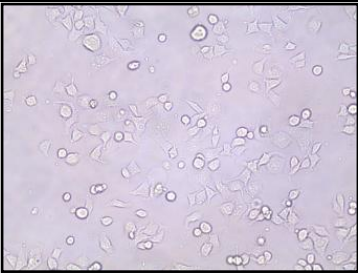
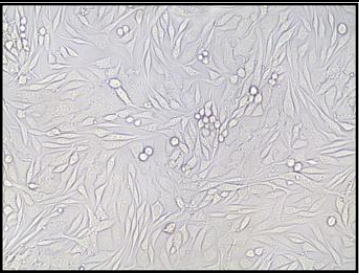
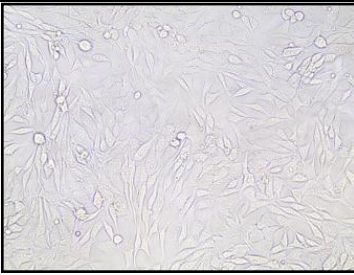
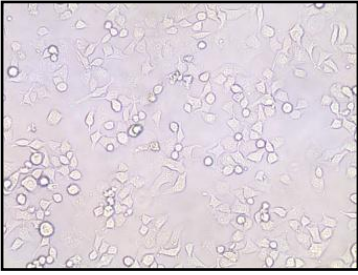
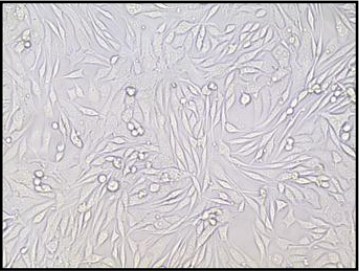
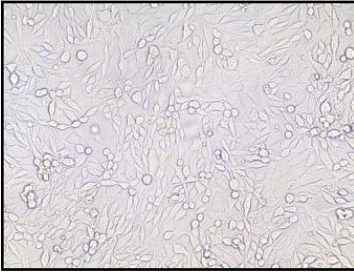
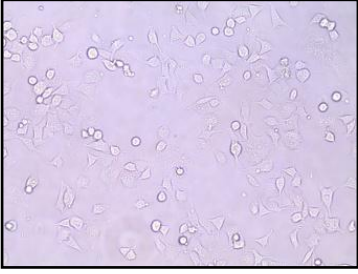
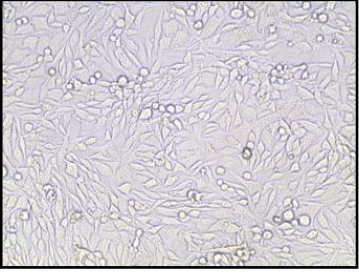
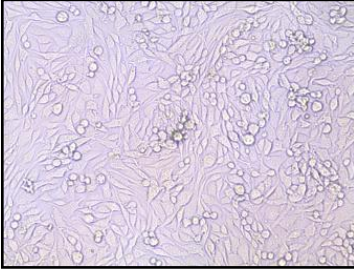
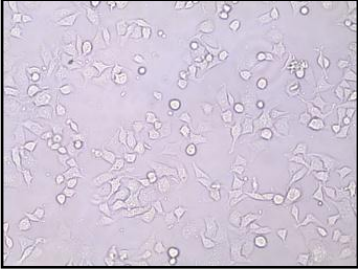
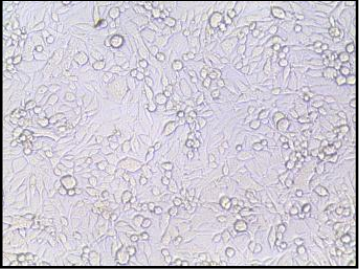
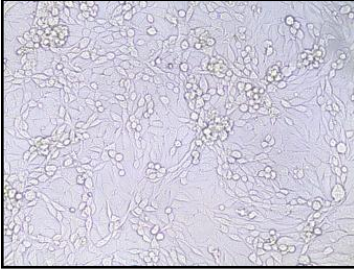
Rutenyum kırmızısı türevi olan Ru360, mitokondriyal kalsiyum uniporter (MCAU) inhibitörü olarak görev yapan spesifik ve güçlü bir polikasyonik boyadır (Vanderluit ve ark., 2003; Garcia-Rivas ve ark., 2005).

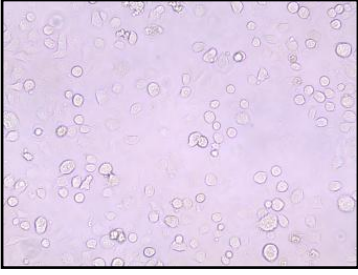
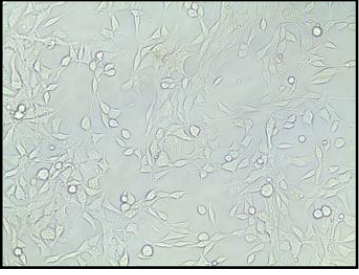
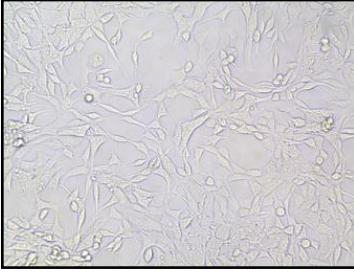
Bu çalışmada sonucunda Ru360, kalsiyumun mitokondriye geçişini bloke ederek mitokondriyal Ca⁺² artışını inhibe etmiştir. SKOV-3 hücreleri, Ru360 ile inkübasyonun ardından Rhod-2 AM ile boyanarak analiz edilmiştir. Ru360 ile muamele edilmemiş hücrelerle kontrol ölçüm yapılmıştır. Kontrol ölçüm sonrası mitokondriyal kalsiyum kanallarını inhibisyonuna bağlı olarak floresan yoğunluğundaki düşüş gerçekleşmiştir ve yaklaşık 5 dakika sonra 18 μ M TN ilavesi edilen hücrelerde Ru360 ile ön muamelesinden kaynaklı floresan yoğunluğunun 18 μ M TN tek başına uygulanmasına göre daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.9.).

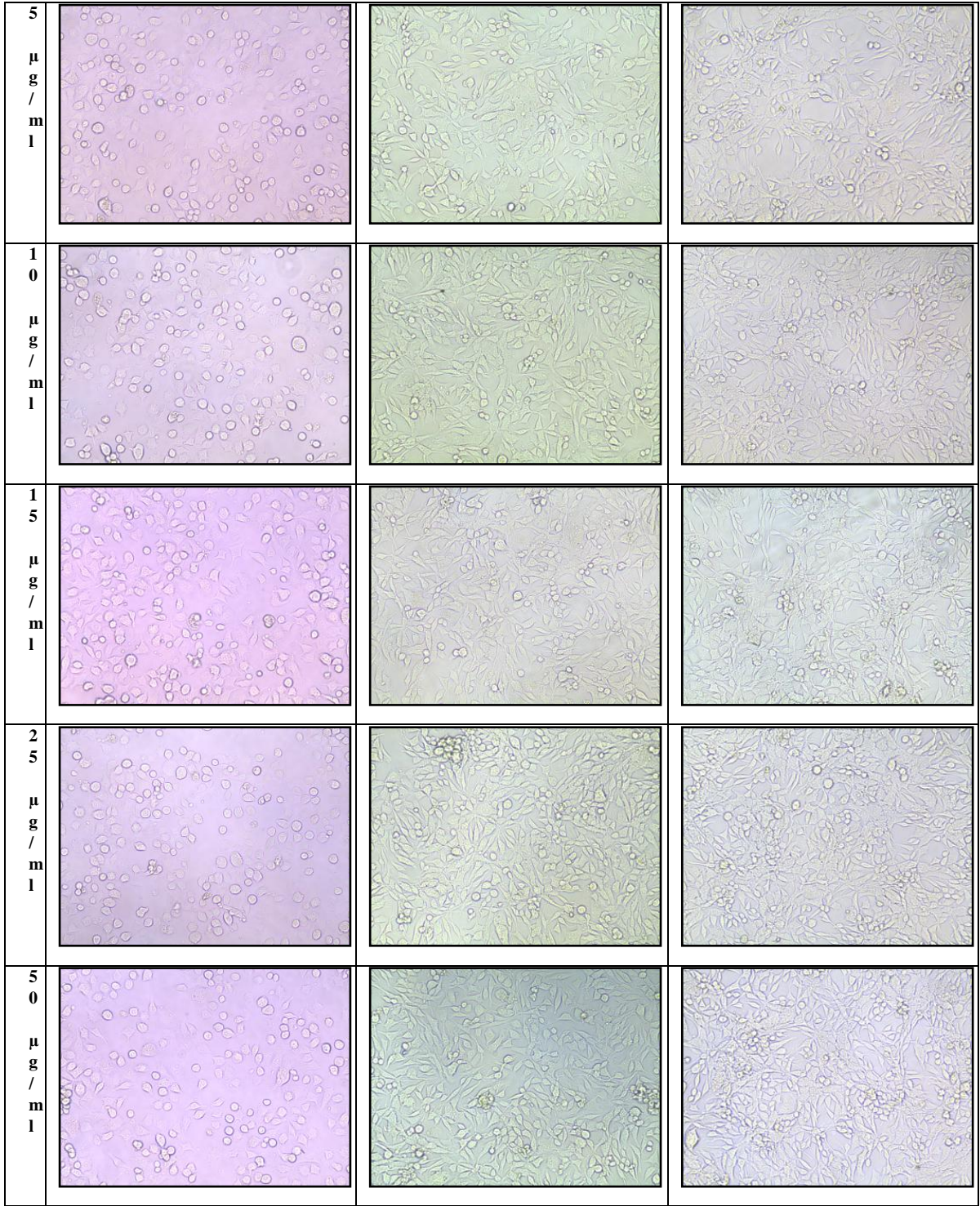
4.3. SKOV-3 Hücrelerinde İntegrin Aktivasyonunun Işık Mikroskobu İle Görüntülenmesi

Ovaryum kanseri hücre hatları, ESM proteinleri olan fibronektin, kollajen, laminin ve vitronektine bağlanarak çok sayıda integrinlerin ekspresyonuna izin vermektedir (Ahmed ve ark., 2005). SKOV-3 hücrelerinin, kaplanmamış ve protein kaplı plakalardaki bağlanma ve yayılma yetenekleri ışık mikroskobu altında gözlenmiştir. Kaplamasız, Fibronektin ve integrin uyarılması için negatif kontrol olarak etkisiz ligand olan Poli-L-lizin'in (İmanishi, 2007) belirlenen konsantrasyon aralığında hücreler 2-24-48 saatlik inkübasyon sonrasında görüntülenmiştir. Hücrelerin bağlanma ve yayılma yeteneklerini mikroskopik olarak incelediğimizde, fibronektin 50 $\mu\text{g/ml}$ ve poli-L-lizin 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları bir sonraki deneysel aşamalarda kullanılmak üzere uygun görülmüştür (Şekil 4.10.).



25 $\mu\text{g}/\text{ml}$			
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$			
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$			
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$			

C	2 saat	24 saat	48 saat
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$			

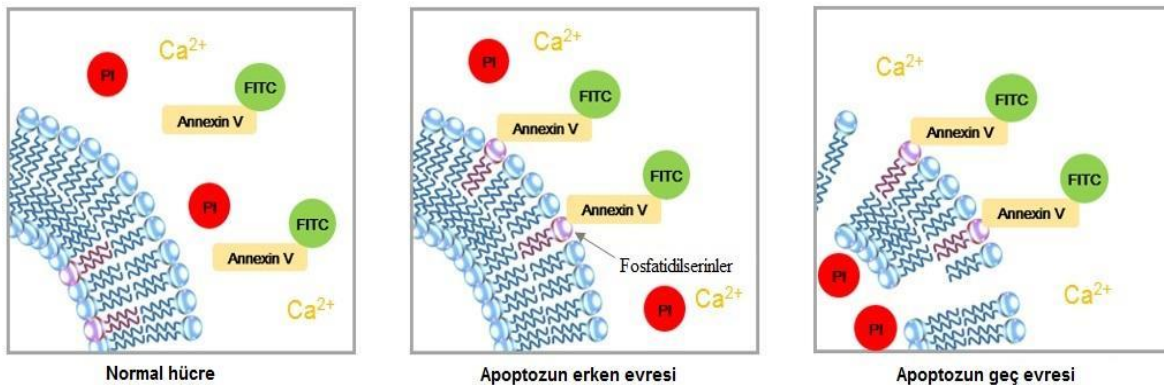


Şekil 4.10. A) Kaplamasız B) Fibronektin ve C) Poli-L-Lizin proteinlerinin belirlenen konsantrasyonlar ile kaplanmış plakalarda, SKOV-3 hücrelerinin 2, 24 ve 48 saat inkübasyonları sonrasında integrin aktivasyonuna bağlı bağlanma ve yayılımlarının ışık mikroskobu ile gösterilmesi.

4.4. Tunikamisine Bağlı Apoptozun Anneksin V-FITC/PI Yöntemi İle Belirlenmesi

Propidium iyodür (PI), plazma zarı bütünlüğü ve geçirgenlik farklılıkları yoluyla hücrelerin apoptotik ya da nekrotik olup olmadığını belirlemek için yaygın olarak Anneksin V ile bağlantılı olarak kullanılır (Rieger, 2011). Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidil-serin (PS) hücre apoptoza gittiğinde, normalde iç yüzeyde yerleşmiş olan bu moleküller hücre zarının dış yüzeyine transloke olurlar. Dış yüzeyde transloke olan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler ve böylece apoptotik hücreler saptanmış olur.

PI'un bir hücreye girmesi zarın geçirgenliğine bağlıdır; bu yüzden sağlam bir plazma zarının varlığında PI canlı ya da erken apoptotik hücreleri boyamaz (Rieger, 2011) (Şekil 4.11).



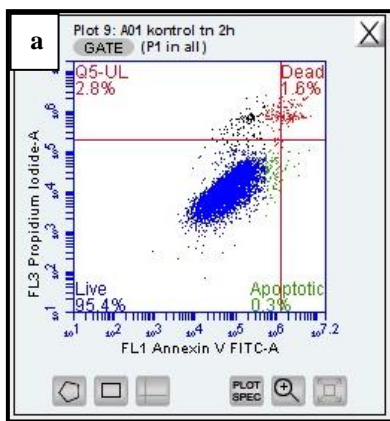
Şekil 4.11. Hücrede Anneksin V ve PI'nın çalışma mekanizması

Tunikamisin düşük dozda N-glikolazasyonunu etkilerken, daha yüksek dozlarda ise hem N-glikolazasyonunu hem de kalsiyum homeostazını etkilemektedir. Bu nedenle, TN, ER stresine sebep olarak kanser hücrelerinde ölümcül etkisi olan güçlü bir pro-apoptotik madde olabilmektedir (Deniaud ve ark. 2008).

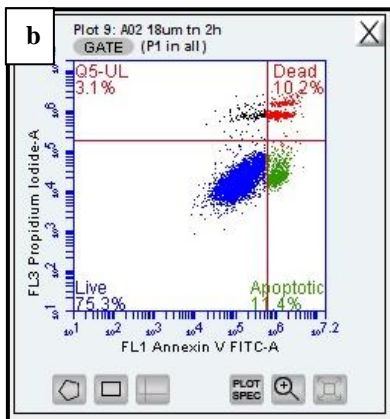
Kaplamasız plakalarda ekim sonrası SKOV-3 hücre hatlarında ER-stresine bağlı TN-indüklü apoptotik etkinin incelenmesi ile kontrol grubu hücrelerinin canlılık oranının % 95.36, erken apoptozun % 0.28 geç apoptozun % 1.60 ve nekrotik ölümün % 2.75 olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.12).

18 μM TN ile 2 saat inkübasyonun sonrasında ise hücrelerin canlılık oranının % 75.26'ya düştüğü, erken apoptozun % 11.38, geç apoptozun % 10.24 ve nekrotik ölümün % 3.12 olduğu Şekil 4.12. b'de sunulmuştur.

Zhang (2013), H9c2 fare kardiyak hücrelerinin Annexin V / PI sonuçlarında, kontrolde erken apoptoz oranı % 3.75 iken, 24 saat 5 $\mu\text{g/ml}$ TN ile inkübasyonu sonrası bu oranı % 34.0' yükselmiştir.



Plot 9: A01 kontrol tn 2h Gated on (P1 in all)	Count	Volume (μL)	% of This Plot
This Plot	6,320	7	100.00%
Q5-UL	174	7	2.75%
Dead	101	7	1.60%
Live	6,027	7	95.36%
Apoptotic	18	7	0.28%



Plot 9: A02 18um tn 2h Gated on (P1 in all)	Count	Volume (μL)	% of This Plot
This Plot	5,263	9	100.00%
Q5-UL	164	9	3.12%
Dead	539	9	10.24%
Live	3,961	9	75.26%
Apoptotic	599	9	11.38%

Şekil 4.12. Kaplamasız plakalarda TN ile 2 saat inkübe edilmiş SKOV-3 hücrelerindeki apoptozun AnneksinV-PI yöntemiyle gösterilmesi. a) Kontrol grubu b) TN 18 μM

4.5. Tunikamisin Uygulaması Sonrasında Sitokrom c ve Endo G Proteinlerinin Floresan Mikroskobu İle Görüntülenmesi

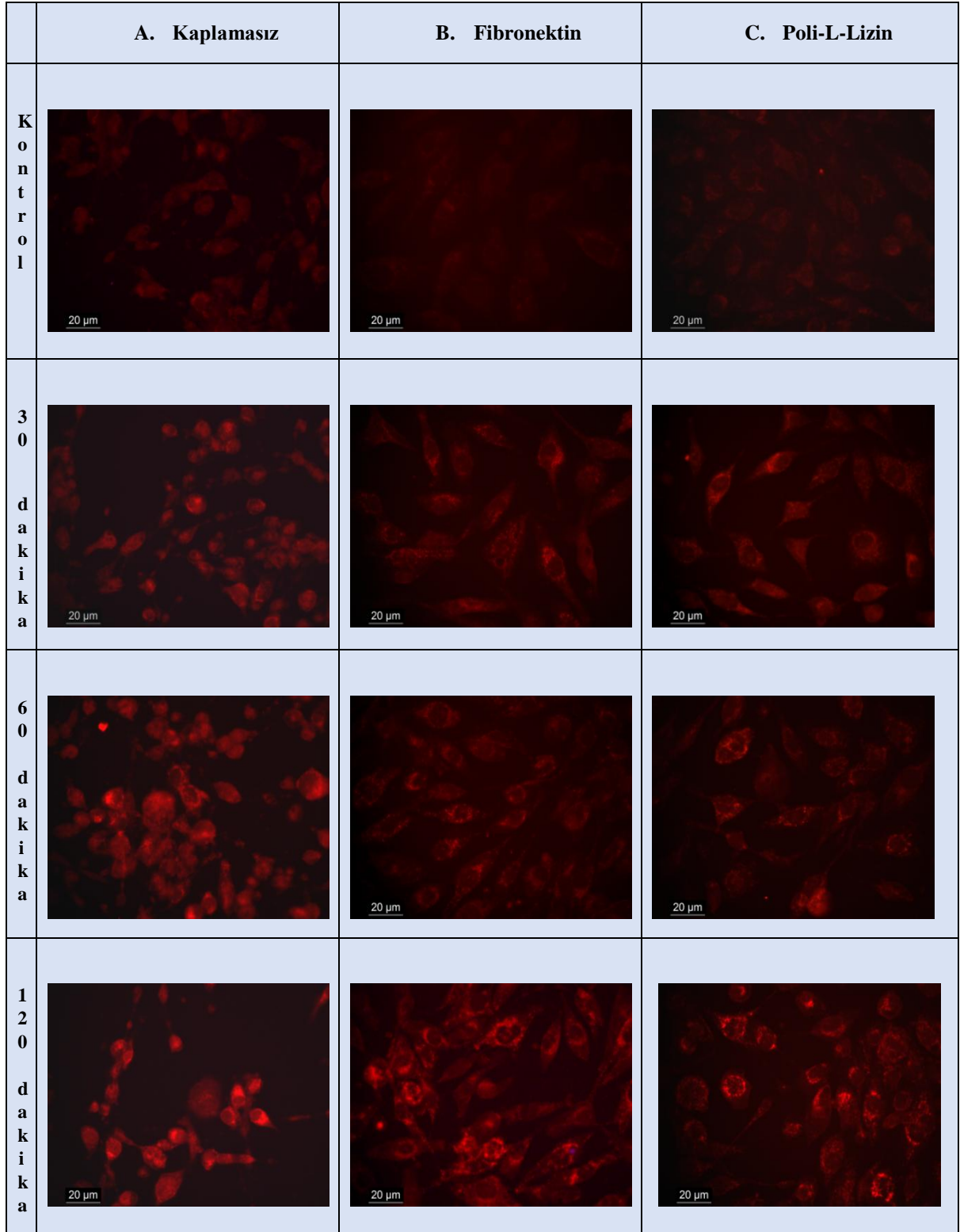
Mitokondriden sitokrom c salınımı, apoptotik süreçte önemli bir adım olarak kabul edilmektedir. Sitokrom c salınımı, Ca^{+2} -bağımlı ve Ca^{+2} -bağımsız olan ayrı mekanizmalar tarafından gerçekleştirilir. İlk durumda, mitokondriyal Ca^{+2} 'un aşırı olması ile geçirgenlik por açıklığı teşvik edilir. İç mitokondriyal zarın bu artan geçirgenliği, matriksin şişmesine, dış mitokondriyal zarın bozulmasına ve sitokrom c'nin salınmasına yol açar. Ca^{+2} -bağımsız sitokrom c salınımı ise Bcl-2 proteinleri ailesinin farklı üyeleri tarafından yönetildiği düşünülmektedir (Ott ve Robertson, 2001).

Kaplamasız, fibronektin (50 μ g/ml) ve poli-L-lizin (10 μ g/ml) ile kaplı plakalarda SKOV-3 hücreleri 30- 60 ve 120 dakika 18 μ M TN ile muamele edildikten sonra sitokrom c antikoru / mouse-FITC ile işaretlenerek floresan mikroskobu altında incelenmiştir. İncelemelerde kontrol grubunda maksimum inkübasyon süresi (120 dakika) göz önünde bulundurulmuştur. Sitozole, sitokrom c salınımı gerçekleşmemesinden dolayı kaplamasız, fibronektin ve poli-L-lizine ait kontrol grubu hücrelerinde floresan ışımaya görülmemiştir (Şekil 4.13.).

30. dakikada sitokrom c'nin sitozoldeki lokalizasyona bağlı floresan ışımaya fibronektin ve poli-L-lizinde hemen hemen aynı iken, kaplamasız grubun hücrelerinde ışımaya daha az olduğu görülmüştür.

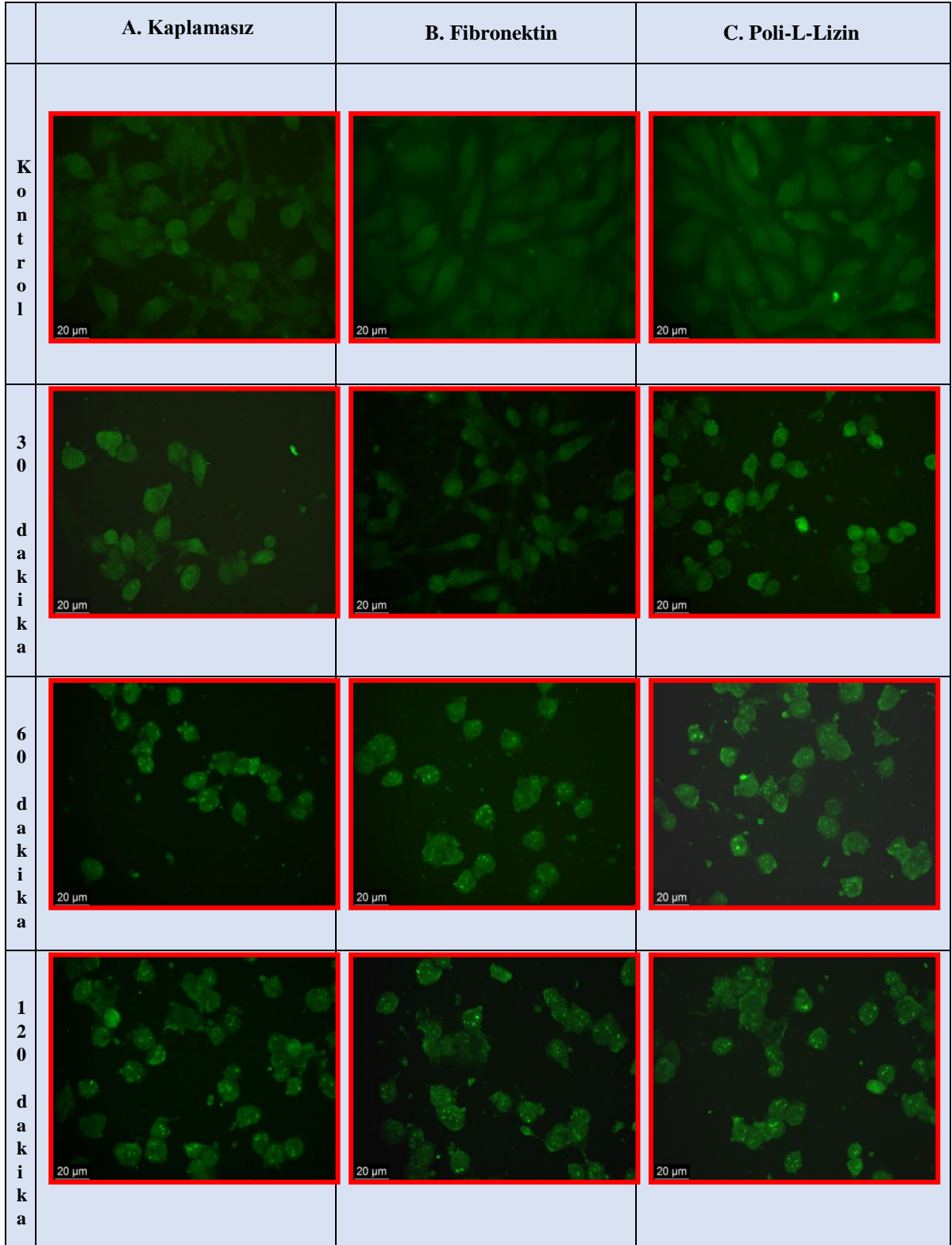
60. dakikada tüm hücre gruplarında floresan ışımaya çok daha yoğunlaşmış ve 120. dakikada fibronektin grubunda diğer gruplara göre sitozolde sitokrom c salınımının aşırı gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.13.).

Yapılan bir çalışmada, 24 saat tunikamisin (1 μ g/ml) ile inkübasyonuna bağlı olarak ER stresi oluşturulan fare embriyonik fibroblast hücrelerinde sitokrom c'nin sitozolik lokalizasyona bağlı floresan yoğunluğundaki artış immüno-histokimyasal yöntemle gösterilmiştir (Shiraishi, 2006).



Şekil 4.13. A) Kaplamasız B) 50 µg/ml Fibronektin ve C) 10 µg/ml Poli-L-Lizin proteinleri ile kaplanmış plakalarda SKOV-3 hücrelerinin kontrol ve 18 µM TN ile 30-60-120 dakika inkübasyonları sonrası, sitokrom c antikorunun floresan mikroskobu ile gösterilmesi. 40X'lik objektifle çekilmiş genel görünümü verilmektedir

DNA'nın nükleozomal parçalanması, apoptozun ayırıcı bir özelliğidir ve apoptoza giden hücrelerde bu durum nükleazların aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Endo G, mitokondriye özgü bir nükleaz olup, apoptoz sırasında çekirdeğe doğru yer değiştirir. Endo G mitokondriden salındıktan sonra (Li ve Luo, 2001) kromozomal DNA'nın fragmentasyonuna neden olarak kaspaz bağımlı ya da bağımsız hücre ölümüne yol açar (Shiraishi, 2006).



Şekil 4.14. A) Kaplamasız B) 50 $\mu\text{g/ml}$ Fibronektin ve C) 10 $\mu\text{g/ml}$ Poli-L-Lizin proteinleri ile kaplanmış plakalarda SKOV-3 hücrelerinin kontrol ve 18 μM TN ile 30-60-120 dakika inkübasyonları sonrası, Endo G antikorunun floresan mikroskobu ile gösterilmesi. 40X'lik objektifle çekilmiş genel görünümü verilmektedir.

Endo G'nin sitoplazmaya geçtikten sonra nokta şeklinde kümeler oluşturarak ışımaya vermiştir. 30. dakikada Endo G'nin sitozoldeki lokalizasyona bağlı varlığında her üç grupta da belirgin bir fark görülmemiştir (Şekil 4.14).

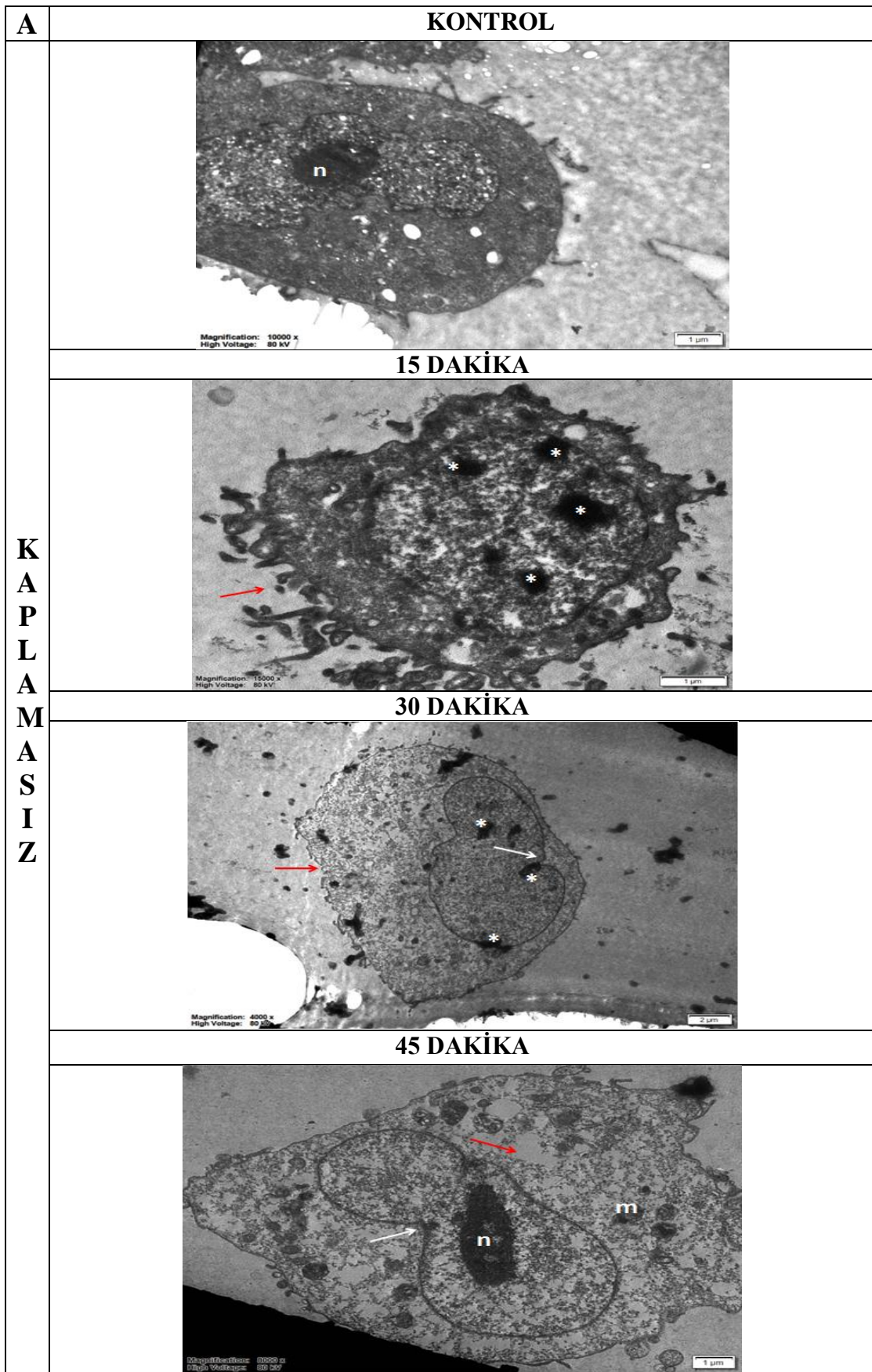
60. ve 120. dakikada tüm hücre gruplarında floresan ışımının daha yoğun olduğu ve Endo G'nin zamana bağlı olarak geçişinde artış görülmüştür.

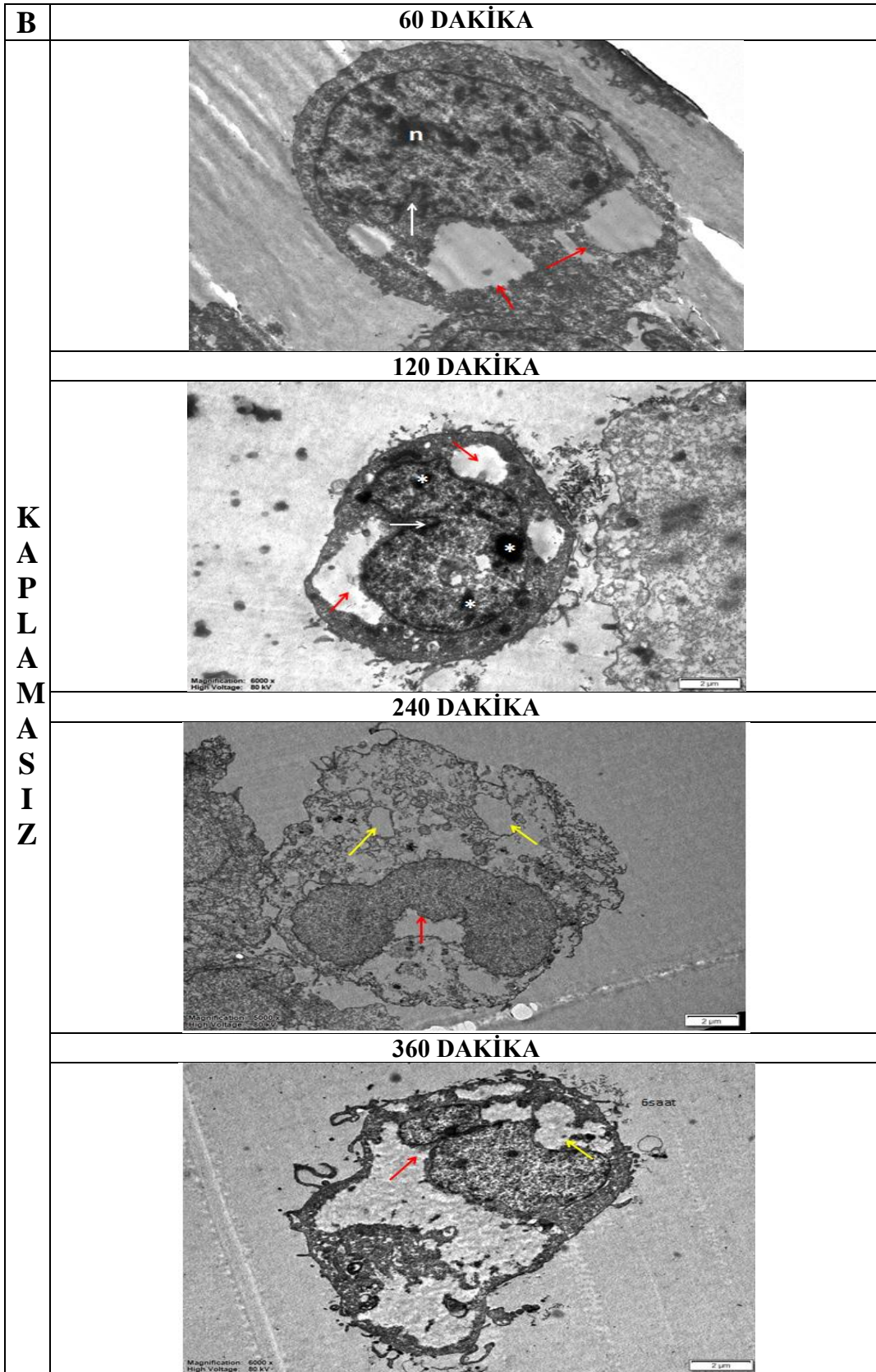
4.6.Tunikamisin Uygulaması Sonrasında SKOV-3 hücrelerinde hücre ölümünün geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) apoptozun belirlenmesinde altın standart bir metod olarak düşünülmektedir (Morse ve ark., 2005). TEM ile hücre içinden 2 ve 3 boyutlu görüntüler alınması hücrelerin, morfolojik ve moleküler düzeyde işleyiş ve ilişkilerini anlamaya imkân sağlar (Elmore, 2007). Eğer hücre ultrastrüktürel morfolojik özelliklere sahipse onun apoptotik karakterizasyonunun belirlenmesi kaçınılmazdır. Bu özellikler arasında: (1) erken fazda çekirdek yoğunlaşması; (2) nükleer fragmentasyon; (3) geç fazda hücre membran bütünlüğünün bozulması; (4) sitoplazmik organellerin dağılması; (5) belirgin büyük vakuollerin ve; (6) hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşması bulunmaktadır (Krysko ve Berghe, 2008). Bu özelliklere bağlı olarak TEM görüntüleri ile apoptotik hücre ayırt edilebilmektedir.

Çalışmamız sonucunda kaplamasız, fibronektin ve poli-L-lizin kaplı plakalarda TN uygulaması ile elektron kaplama yapılmamış SKOV-3 hücrelerinin 18 μ M TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri Şekil 4.15'te sunulmuştur. Kontrol grubunda hücre ve çekirdek membran bütünlüğü gözlenmiş ve belirgin çekirdekle birlikte normal homojenöz yapıda sitoplazma yapısı tespit edilmiştir. Çekirdekçik (*) merkezi yerleşimli ve normal görünümündedir. 18 μ M TN ile muamele edilen hücrelerde 15. dakikadan itibaren ise ultrayapısal bozulmalar saptanmıştır.

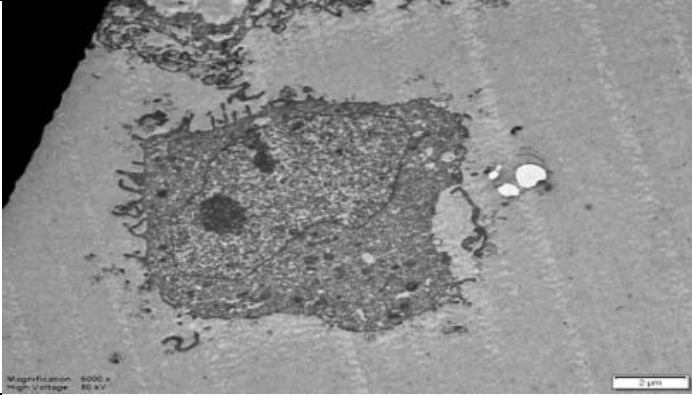
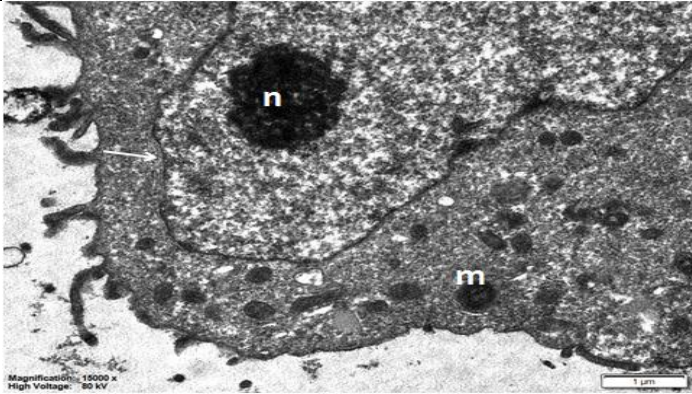
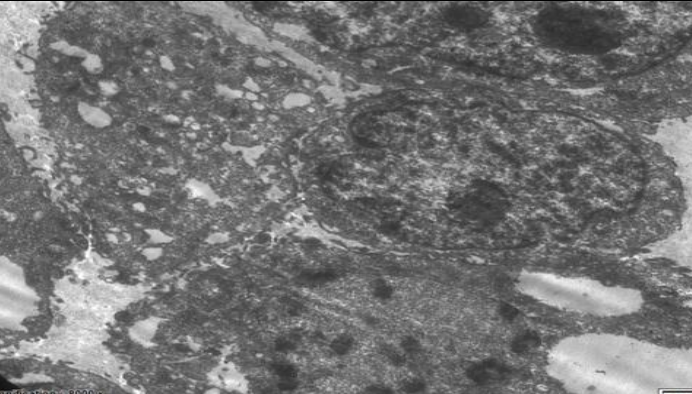
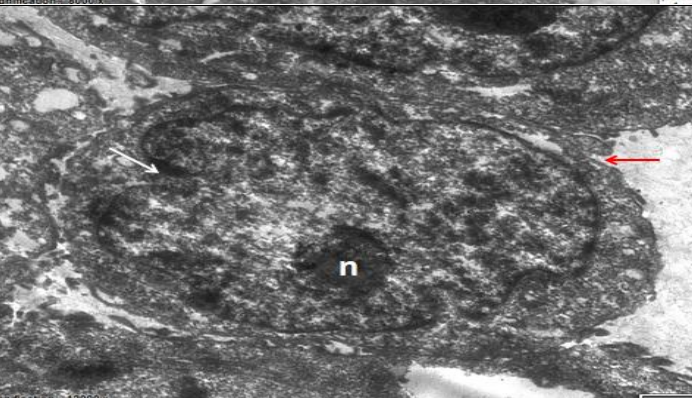
İnsan nöroblastoma hücreleri SHSY5Y hücre hatlarında 10 μ g/mL tunikamisin ile 24 saat inkübasyon sonrası ER stresine bağlı apoptoza bakılmış olup, sonuçlarda hücrelerin morfolojik değişimleri TEM ile görüntülenmiştir. Görüntülere bağlı erken ve geç evrelerde apoptotik belirtilerin olduğu gözlenmiştir (Wu ve Wang, 2012).

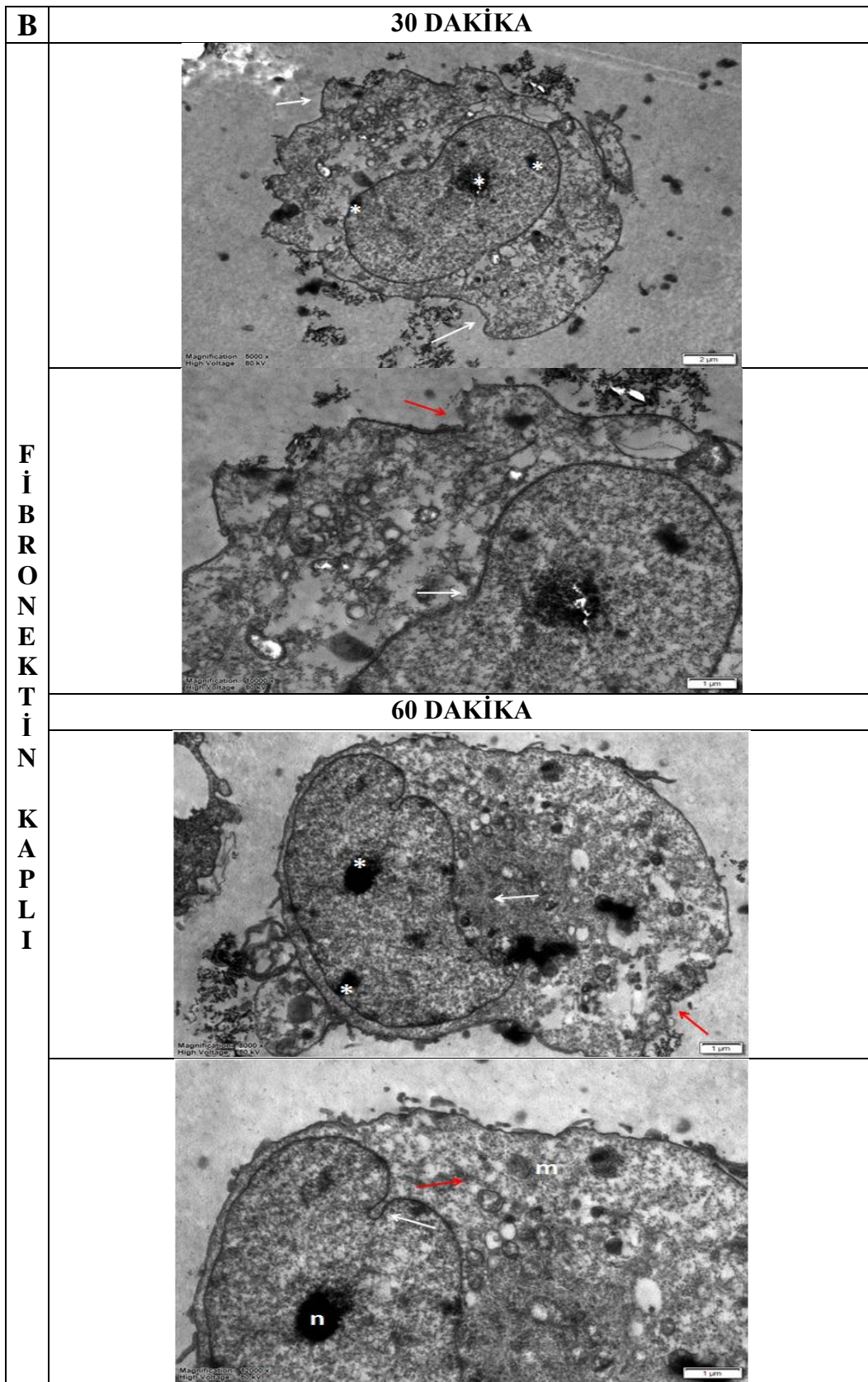


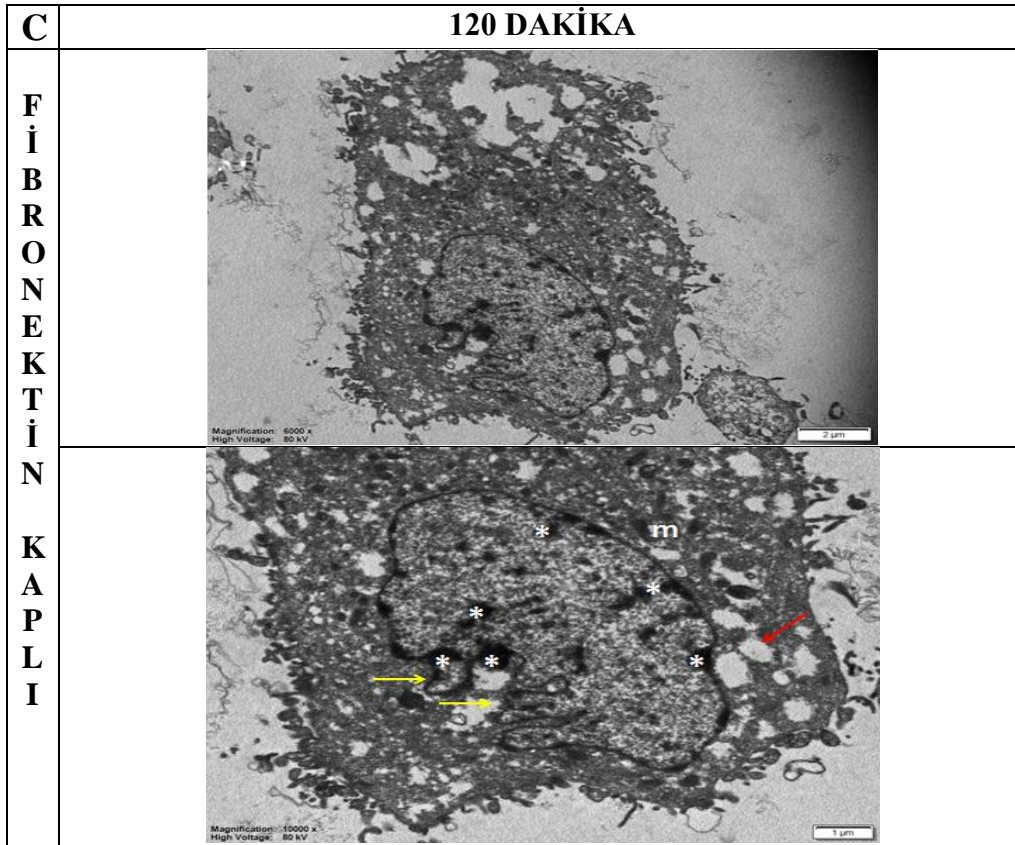


Şekil 4.15. Kaplama yapılmamış SKOV-3 hücrelerinin 18 μ M TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri A) Kontrol, 15, 30 ve 45 dakika B) 60, 120, 240 ve 360 dakika genel görünümüleri

30 dakika muamele edilen hücrelerde çekirdeğin kenara itildiği ve sitoplazma membranına yakın yerleştiği gözlenmiş; çekirdekçiğin parçalandığı izlenmiştir. Sitoplazmada yer yer erimeler izlenmekle beraber hücrenin kompakt ve konsantre yapısını kaybetmeye başladığı saptanmıştır. 45 dakika muamele sonrası çekirdeğin parçalı bir yapıya dönük olduğu (beyaz ok) gözlenmiş ve mitokondrilerin daha yoğun ve şişmiş olduğu tespit edilmiştir. Sitoplazmik erimelere hücrenin her yerinde rastlanmaya başlamıştır. 60 dakika muamele sonucu hücrelerde özellikle çekirdek etrafında sitoplazmik erimeler (kırmızı ok) gözlenmiş; ancak hücre ve çekirdek bütünlüğü korunmuştur. Çekirdek merkezi konumda olmakla birlikte çekirdekçik kenara itilmiştir ve 120. dakika muamelelerinde de aynı hasarlı bulguların gözlendiği tespit edilmiştir. 240. dakikada özellikle çekirdek parçalı bir görünümde ve sitoplazmada kofullar (sarı ok) ve erimeler tespit edilmiştir. Organeller silinmeleri ile beraber sitoplazma membranında da yapısal bozulmalar izlenmiştir. 360. dakika muamelesinde ise hücrenin normal sağlıklı görünümünü tamamen kaybettiği, sitoplazmanın büyük bir kısmının eridiği, çekirdeğin parçalı bir görünüm alarak hücrenin kenarına itildiği ve boyutlarının küçüldüğü belirlenmiştir.

A	KONTROL	
F I B R O N E K T I N K A P L I		
		
	15 DAKİKA	
		
		

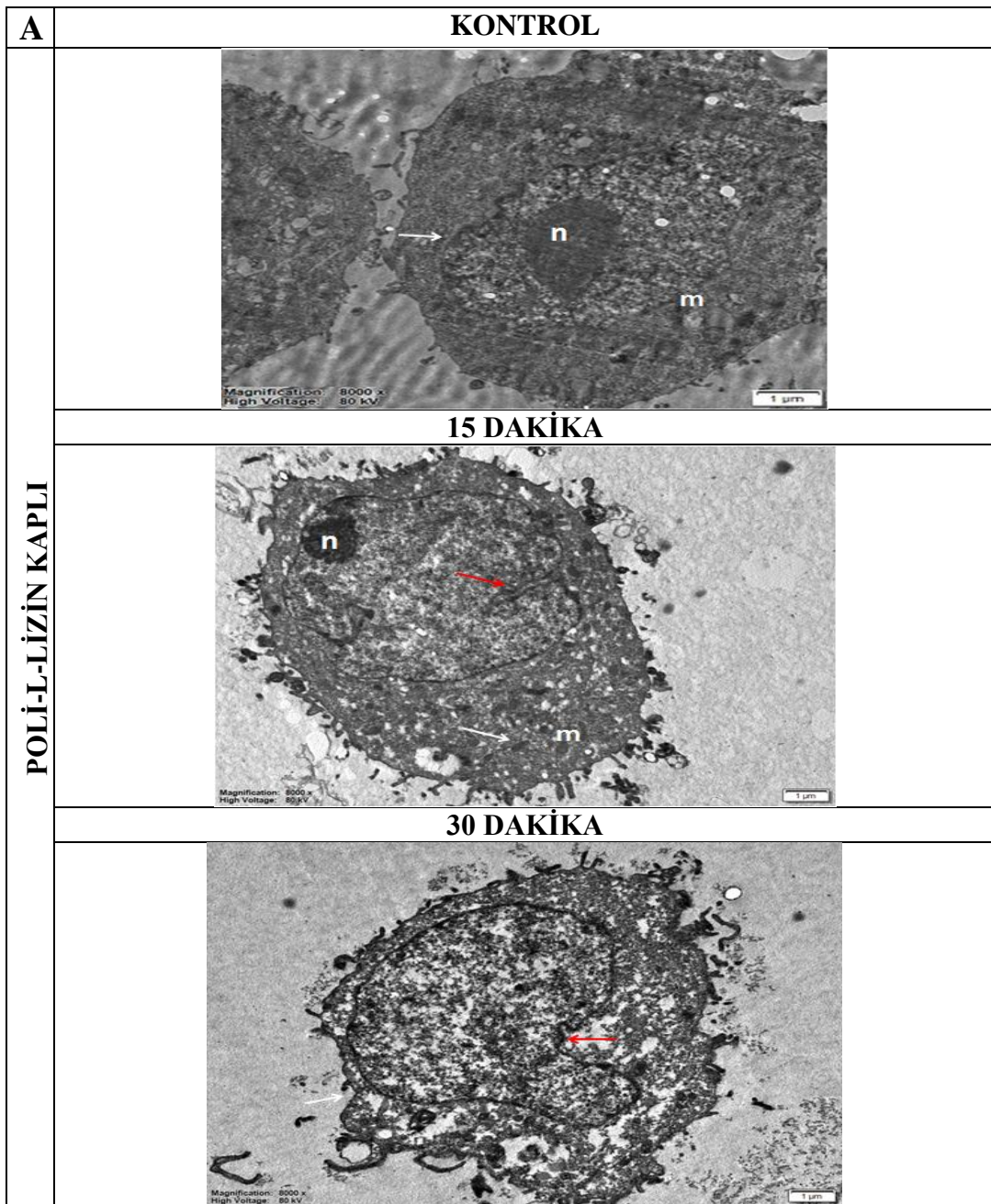


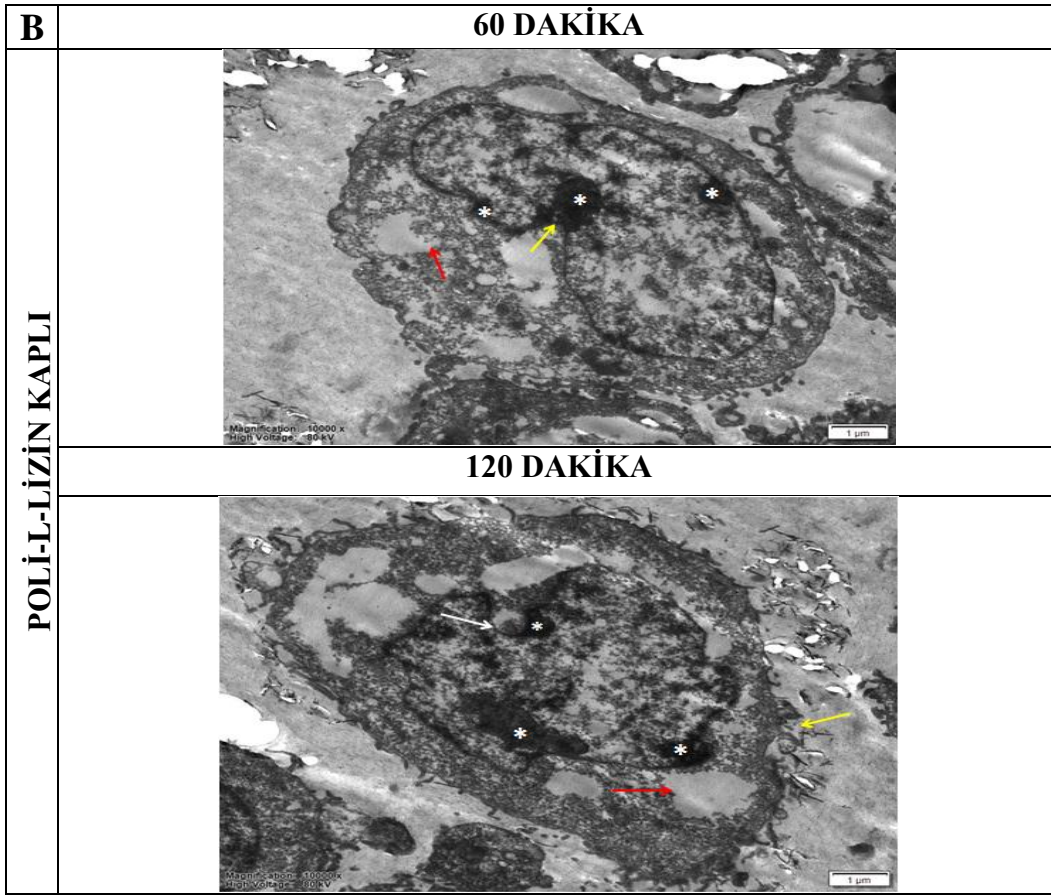


Şekil 4.16. Fibronektin kaplı SKOV-3 hücrelerinin 18 μ M TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri A) Kontrol ve 15 dakika B) 30 ve 60 dakika C) 120 dakika genel ve yakın görünümü

Fibronektin kaplı SKOV-3 hücrelerinin integrin aktivasyonu sonrası 18 μ M TN uygulaması ile elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri Şekil 4.16.'da verilmiştir. Kontrol grubu hücreleri normal sağlıklı görünümünde, çekirdek merkezi yerleşimli ve ökromatin yapıda; çekirdekçik normal, hücre ve çekirdek membranı ise bütün yapısını korumaktadır. Sitoplazmada bol miktarda mitokondri (m) bulunmaktadır. 30 dakika muamele sonrası elde edilen TEM görüntülerinde çekirdek aktif ve hücrenin büyük bölümünü kaplamakta ancak çekirdekçik kenara itilmiş durumda tespit edilmiştir. Çekirdeğin parçalı bir yapı oluşturmaya başladığı tespit edilmiştir. 60 dakika muameleye uğrayan hücrelerde çekirdek merkezi konumda olmakla beraber çekirdekçik parçalanmış; hücrenin tamamında daha önceki yoğun ve kompakt yapının azaldığı izlenmiştir. Sitoplazma ve organellerde erimeler, yer yer kofullar tespit edilirken, sitoplazma membranının yapısal bozulması da dikkat çekici bir bulgu olarak belirmiştir. 60. dakikada çekirdek sitoplazmaya itilmiş ve çekirdekçik parçalanmıştır.

Çekirdek atipik bir yapıya dönüşmeye başlamış ve sitoplazmada erimeler izlenmiştir. Mitokondrilerde şişme, kofullar ve otofagozomlar tespit edilmiştir. Sitoplazma membranı düzgün yapısını kaybetmiştir. 120 dakika muamele edilen hücrelerde ise sitoplazma membranı bütünlüğünü tamamen kaybetmiş, çekirdek küçülmüş ve atipik parçalı bir yapıda, çekirdekçik parçalanmış, sitoplazmada bol miktarda koful ve sitoplazmik erimeler gözlenmiştir. Ayrıca bu gruptaki hücrelerde mitokondriyal yoğunlaşma tespit edilmiştir.





Şekil 4.17. Poli L-lizin kaplı SKOV-3 hücrelerinin 18 μ M TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri A) Kontrol ve 15 ve 30 dakika B) 60 ve 120 dakika genel görünüşleri

Şekil 4.17.' te Poli L-lizin kaplı SKOV-3 hücrelerinin 18 μ M TN uygulaması sonrası elde edilen geçirimli elektron mikroskop görüntülerini göstermektedir. Kontrol grubu hücrelerinde tam hücre ve çekirdek membranı gözlenmekte, çekirdek ve çekirdekçik merkezi konumda ve yoğun olarak gözlenmektedir. Mitokondriler normal görünümündedir. 15 dakika muamele sonrası elde edilen hücrelerde çekirdek ve çekirdekçik kenara itilmiş ve çekirdek membranı bozulmuş; çok kompakt, konsantre ve parçalanmış olarak izlenmiştir. Sitoplazmada bol miktarda koful ve erimeler izlenmiştir. Sitoplazmik membran yapısında da bozulmalar başlamıştır. 30. dakikada da çekirdek hasarı gözlenmekle beraber sitoplazmik erimeler önemli derecede artmıştır. Organel silinmeleri ile birlikte sitoplazmik membran hasarı iyice artmış şekilde tespit edilmiştir.

60. ve 120. dakika muamele sonuçları benzerlik göstermekle birlikte, atipik çekirdek ve parçalanmış çekirdekçik yapısı ve sitoplazmik erimeler gözlenmiştir. Bu erimeler 120 dakika muamele edilen SKOV-3 hücrelerinde çok daha ileri düzeyde belirmiştir.

TEM görüntüleri sonucunda, TN uygulaması sonrası ER stresi oluşturulan kaplamasız ve protein (fibronectin/poli-L-lizin) kaplı SKOV-3 hücrelerinde apoptotik belirtilerin olduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, fibronektine bağlı SKOV-3 hücrelerinin ER stresi sonrasında apoptotik süreci morfolojik değişimler ve mitokondriyal proteinlerin lokalizasyonu esas alınarak araştırılmıştır. SKOV-3 hücrelerinde ER stresi farklı konsantrasyonlarda TN kullanılarak oluşturulmuştur. Hücrelerin 18 μM TN ile muamelesi sonrasında sitoplazmik ve mitokondriyal Ca^{+2} değişimleri sırasıyla, Fluo-3 AM ve Rhod-2 AM floresan boyaları kullanılarak tespit edilmiştir ve hem sitoplazma da hem de mitokondride belirgin kalsiyum artışlarının olduğu gösterilmiştir. Yine aynı şekilde, sitoplazmik kalsiyum artışının (ya da ER stresinin) SKOV-3 hücrelerinde erken apoptozu tetiklediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TEM görüntüleri ile de desteklenmiştir. TN ile muamele edilen SKOV-3 hücrelerinde, kromatin kondensasyonu, sitoplazmik degradasyon ve hücre zarında bozulmalar gibi apoptotik değişimler görülmüştür. Bununla birlikte hem mitokondri hem de ER yapılarında bozulmalar tespit edilmiştir. Sitokrom c ve Endo G gibi mitokondriyal proteinlerinin de lokalizasyonu fibronektine bağlı SKOV-3 hücrelerinde artış göstermiştir.

Sonuç olarak, fibronektine bağlı yüksek metastatik aktiviteye sahip SKOV-3 hücrelerinde kalsiyum iyon artışına bağlı olarak gerçekleştirilen ER stresi, mitokondriyal yolağa bağlı apoptotik sürecin tetiklenmesine neden olmuştur. Bu apoptotik süreçte, doku tipine bağlı olarak etki gösteren fibronektine spesifik integrin reseptörlerinin ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ gibi) rol oynadığı düşünülmektedir. Bu integrinlerin hücre tipine ya da hücrenin bulunduğu ortama göre metastatik ya da non-metastatik cevap oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Yapılan çalışmalar, özellikle $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ integrinlerin ovaryum hücrelerinde metastatik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, TN ile SKOV-3 hücrelerinde oluşturulan ER stresi sonrasında metastatik özelliğe sahip bu integrinlerin aktivasyonlarını yani metastatik özelliklerini kısmen ya da tamamen yitirdiklerini düşünmekteyiz. ER stresi oluşturulan fibronektine bağlı SKOV-3 hücrelerinde apoptotik sürecin integrin ekspresyonunun baskılanması sonrasında incelenmesi gerekmektedir. Bu çalışma apoptotik sürecin hangi integrine bağımlı çalıştığı ve bu süreçte integrinlerin rolünü ortaya koyacaktır. Ayrıca, TEM görüntülerinde ER stresine bağlı kesin olmasa bile otofajik oluşumların olduğu görüntülenmiştir. Tez kapsamına dahil edilmeyen bu bulgularında

detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Fibronektine bağımlı SKOV-3 hücrelerinin ölüm şeklinin mekanizmasının tam olarak aydınlatılması, hedef moleküllerin belirlenmesinde ve bu hedef moleküllerine karşı ilaç geliştirmede katkı sağlayacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, N., Riley, C., Rice, G., & Quinn, M. (2005). Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clinical and Experimental Metastasis*, 22(5), 391–402.
- Anderson, L. R., Owens, T. W., & Naylor, M. J. (2014). Integrins in development and cancer. *Biophysical Reviews*, 6(2), 191–202.
- Apostolova, N. (2008). Mitochondrial role of apoptosis-inducing factor (AIF) : oxidative phosphorylation and reactive oxygen species. Doktora Tezi, Valencia Üniversitesi, Tıp ve Diş Hekimliği Fakültesi, Valencia.
- Bilgen, T., (2008). Malign epitelyal over tümörlerinde metastaz supresör genlerlerin düzeylerinin belirlenmesi ve MDR1 geninin ilaç dirençliliği üzerine etkisinin araştırılması, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Bellamy, C. O., Malcomson, R. D., Harrison, D. J., & Wyllie, a H. (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*, 6(1), 3–16.
- Bootman, M. D. (2006). Calcium Signalling and Regulation of Cell Function. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 32(2), 1–7.
- Buckley, B. J., & Whorton, a. R. (1997). Tunicamycin increases intracellular calcium levels in bovine aortic endothelial cells. *Am.J.Physiol*, 273, C1298–C1305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9357774>
- Calderwood, D. a. (2004). Integrin activation. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 5), 657–666.
- Cannistra, S. A., Ottensmeier, C., Niloff, J., Orta, B., & DiCarlo, J. (1995). Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*.
- Cox, D., Brennan, M., & Moran, N. (2010). Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(10), 804–820.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Curran S, Dundas S. R, Buxton J, Leeman M. F, Ramsay R, ve Murray G. I., (2004). Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clinical Cancer Research* Vol: 10 8229-8234.
- Demaurex N ve Distelhorst C. (2003). “Apoptosis-the calcium connection” *Science*, 300: 65-67.
- Deniaud, a, Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., & Brenner, C. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, 27(3), 285–299.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Gao, L.-L., Li, F.-R., Jiao, P., Yao, S.-T., Sang, H., & Si, Y.-H. (2011). Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells Induced by Paris Chinensis Dioscin via a Ca²⁺-Mediated Mitochondrion Pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 12(5), 1361–1366.
- Garcia-Rivas, G. D. J., Guerrero-Hernandez, A., Guerrero-Serna, G., Rodriguez-Zavala, J. S., & Zazueta, C. (2005). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in postischemic rat heart. *FEBS Journal*, 272(13), 3477–3488.
- Güç, D. (2004). Adezyon moleküller, 18(Ek 2), 158–163.
- Hajnoczky, G., Csordas, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S., & Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 40(5-6), 553–560.
- Harhaji-Trajkovic, L., Vilimanovich, U., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., & Trajkovic, V. (2009). AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9 B), 3644–3654.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Imanishi, Y., Hu, B., Jarzynka, M. J., Guo, P., Elishaev, E., Bar-Joseph, I., & Cheng, S. Y. (2007). Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated pathway. *Cancer Research*, 67(9), 4254–4263.
- Jin, H., & Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer*, 90(3), 561–565.
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D’Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205–221.
- Kumar, S., Kain, V., & Sitasawad, S. L. (2012). High glucose-induced Ca^{2+} overload and oxidative stress contribute to apoptosis of cardiac cells through mitochondrial dependent and independent pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(7), 907–920.
- Kwon, M. S., Park, C. S., Choi, K., Ahn, J., Kim, J. I., Eom, S. H., ... Song, W. K. (2000). Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4), 1433–43.
- Lane, D., Matte, I., Laplante, C., Garde-Granger, P., Rancourt, C., & Piché, A. (2013). Osteoprotegerin (OPG) activates integrin, focal adhesion kinase (FAK), and Akt signaling in ovarian cancer cells to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Ovarian Research*, 6(1), 82.
- Leanza, L., Biasutto, L., Managò, A., Gulbins, E., Zoratti, M., & Szabò, I. (2013). Intracellular ion channels and cancer. *Frontiers in Physiology*, 1–7.
- Lei, Y., Henderson, B. R., Emmanuel, C., Harnett, P. R., & Defazio, a. (2014). Inhibition of ANKRD1 sensitizes human ovarian cancer cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 34(4), 485–495.
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1053–64.
- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95–99.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mastanabad, M- V., (2008). *Kaspaz promotör bölge polimorfizmleri ve ovaryum kanseri arasındaki ilişki*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- MacLennan, DH., (2000). Ca^{2+} signalling muscle disease. *Eur J Biochem.* 267 (17), 5291,7.
- Mizejewski, G. J. (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 222(2), 124–138.
- Morse, D. L., Gray, H., Payne, C. M., & Gillies, R. J. (2005). Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(10), 1495–1504.
- Oliveira, P. a., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P., L. F., & Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 79(4), 593–616.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 552–565.
- Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1259–63.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27(50), 6407–18.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature Reviews. Cancer*, 11(8), 609–618.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (50), 37–40.
- Saavedra-molina, A., & Devlin, T. M. (1990). Pages 148-153, *167(1)*, 148–153.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sawada, K., Ohyagi-Hara, C., Kimura, T., & Morishige, K. I. (2012). Integrin inhibitors as a therapeutic agent for ovarian cancer. *Journal of Oncology*, 2012, 1–7.
- Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2015). Integrins and cancer: Regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in Cell Biology*, 25(4), 234–240.
- Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A., & Yoshida, H. (2006). ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 19), 3958–3966.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., Hajnoczky, G., (1999) “Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals” *EMBO J.* 18, 6349.
- Takahashi, a, Camacho, P., Lechleiter, J. D., & Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews*, 79(4), 1089–1125.
- Tandoğan, B., & Ulusu, N. (2006). Derleme Makale [Review Article] Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler. *Journal of Biochemistry*, 31(1), 36–40.
- Tang, S. Y., Whiteman, M., Jenner, A., Peng, Z. F., & Halliwell, B. (2004). Mechanism of cell death induced by an antioxidant extract of *Cratogeomys cochinchinense* (YCT) in Jurkat T cells: The role of reactive oxygen species and calcium. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(12), 1588–1611.
- Vanderluit, J. L., McPhail, L. T., Fernandes, K. J. L., Kobayashi, N. R., & Tetzlaff, W. (2003). In vivo application of mitochondrial pore inhibitors blocks the induction of apoptosis in axotomized neonatal facial motoneurons. *Cell Death and Differentiation*, 10(9), 969–76.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., & Searson, P. C. (2011). The physics of cancer : the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 11, 512-522.
- Wu, C. Y., Fields, A. J., Kapteijn, B. A. E., & McDonald, J. A. (1995). The Role of Alpha(4)Beta(1) Integrin in Cell Motility and Fibronectin Matrix Assembly. *Journal of Cell Science*, 108, 821–829.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, D., Wang, P., ve Wang, S., (2012). Low levels of Bax inhibitor-1 gene expression increase tunicamycin-induced apoptosis in human neuroblastoma SY5Y cells *Neural Regen Res.* 15; 7(17): 1331–1337.
- Zhang, Q., Li, H., Wang, S., Liu, M., Feng, Y., & Wang, X. (2013). Icariin protects rat cardiac H9c2 cells from apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17845–17860.
- Ziomek, G., Cheraghi Zanjani, P., Arman, D., Van Breemen, C., & Esfandiarei, M. (2014). Calcium regulation in aortic smooth muscle cells during the initial phase of tunicamycin-induced endo/sarcoplasmic reticulum stress. *European Journal of Pharmacology*, 735(1), 86–96.