

Tunikamisinin Embriyonik ve Yenidoğan Fare Dalak Dokularına Etkisi ^[1]

Erdal BALCAN *  Özlem ARSLAN * Ayça GÜMÜŞ * Mesut ŞAHİN *

[1] Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir
(Proje no: FEF 2006-110)

* Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı,
Muradiye Kampus, 45047 Manisa - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): 2009/064-A

Özet

Tunikamisin proteinlerdeki asparagin gruplarının N-glikozilasyonunu inhibe etme yeteneği ve endoplazmik retikulum stresini arttırması nedeniyle hücre biyolojisi çalışmalarında yoğun olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Bu çalışmada tunikamisin embriyonik hayatın 17. günü ile 1. ve 3. postnatal günlere ait fare dalak dokularındaki etkileri, 1) glikozaminoglikan moleküllerindeki değişiklikler, 2) apoptozis ve 3) laminin moleküllerindeki değişiklikler olmak üzere 3 yapısal ve fizyolojik parametre ile araştırılmıştır. Alcian blue-periyodik asit-Schiff metodu ile kontrol grubuna ait dalak parankiminin karboksillenmiş glikozaminoglikanları içerdiği, ancak bu moleküllerin tunikamisin uygulanan tüm gruplarda hafifçe azaldığı belirlenmiştir. Öte yandan, tunikamisin uygulanan gruplarda hücreler arası alanların genişlediği görülmüştür. Ek olarak, immunoblotting analizler ile gelişen dalak dokularında laminin moleküllerinin ekspresyonlarının tunikamisin uygulamasıyla azaldığı belirlenmiştir. Tunikamisin apoptotik etkilerini belirlemek için TUNEL yöntemi kullanılmış ve gelişen dalak dokularında apoptotik hücre sayısının tunikamisin uygulaması ile büyük ölçüde arttığı görülmüştür. Bu bulgular, hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerini düzenleyen hücre dışı proteinlerin (örneğin lamininlerin) glikozilasyon durumunun ve ekstrasellüler matriksin glikozaminoglikan içeriğindeki değişimlerin, dalak gelişimi sürecinde hücre fizyolojisini ve morfogenezini belirleyen son derece önemli faktörler olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Tunikamisin, Glikozaminoglikan, Laminin, Apoptozis, Dalak*

The Effect of Tunicamycin on Embryonic and Newborn Murine Spleen Tissues

Summary

Tunicamycin is an antibiotic that widely used in cell biology for its ability to inhibit N-linked glycosylation of asparagine residues on proteins and to induce endoplasmic reticulum stress. In the present study, the effects of tunicamycin on murine splenic tissues at 17th embryonic day and 1st and 3rd postnatal days were evaluated with three structural and physiological parameters: 1) alterations in glycosaminoglycan molecules, 2) apoptosis and 3) alterations in laminin molecules. It was shown that splenic microenvironments of control groups contain carboxylated glycosaminoglycans, but their content slightly decreased in all tunicamycin treated groups by alcian blue-periodic acid-Schiff method. On the other hand, there was an increase in the interstitial space among the cells of tunicamycin treated groups. In addition, it was shown by immunoblotting analyses that expression levels of laminin molecules were decreased by tunicamycin treatment in developing spleen tissues. In order to determine apoptotic effects of tunicamycin, TUNEL assay was performed and it was found that the number of apoptotic cells in developing spleen was strongly increased with tunicamycin treatments. These results suggest that, during the spleen development, the alterations of glycosaminoglycan contents in the extracellular matrix and the glycosylation status of extracellular glycoproteins (e.g. laminins) that mediate cell-extracellular matrix interactions are very important factors that seal the fate of cell physiology and morphogenesis.


Keywords: *Tunicamycin, Glycosaminoglycan, Laminin, Apoptosis, Spleen*

GİRİŞ

Normal morfogenez ve farklılaşma sırasında, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde çok sayıda ekstrasellüler matriks (ECM) bileşeni rol almaktadır ¹. Tüm dokularda kompleks ve dinamik bir

şebeke olarak yer alan ECM, kendisi ile etkileşen hücrelerin morfogenezini dışında, hücre yaşamı, göçü, proliferasyonu ve metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesinde aktif bir rol oynar ²⁻⁴. Bu kompleks şebekenin

 İletişim (Correspondence)

 +90 236 2412151/179-146

 erdal.balcan@gmail.com

moleküler mimarisini adezyon proteinleri, çeşitli glikoproteinler (örn. laminin ve kollajen), büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler ve proteoglikanlar oluşturmaktadır ^{2,5}.

Lamininler, bazal lamina gibi özelleşmiş ECM'lerin organizasyonunda rol alan önemli bir glikoprotein ailesidir ⁶. Farklı doku ekspresyonları gösterebilen laminin, yapısal olarak 3 farklı polipeptid zincirinin (α , β , γ) disülfid bağları ile bağlanması sonucu oluşan, glikozillenmiş bir moleküldür ^{7,8}. Bu protein ailesi, hücre adezyonu, göçü ve farklılaşması gibi çeşitli hücre davranışlarında rol alırlar ^{9,10}. Lamininler, bu rollerini başta integrinler olmak üzere, tip IV kollajen, heparan sülfat ve entaktin gibi çeşitli ECM bileşenleri ile etkileşerek gerçekleştirir ⁸⁻¹⁰.

ECM'nin bir diğer ana bileşeni olan proteoglikanlar, glikozaminoglikan (GAG) molekülleri ile kovalent olarak bağ yapan ve çok sayıda protein ile etkileşerek matriks organizasyonunda, hücre göçünde, hücreler arası etkileşimlerde ve hücre ölümünde rol alan kompleks moleküllerdir ¹¹⁻¹⁶. Bu moleküller, ECM dışında, hücre içi salgı granüllerinde, hücre yüzeylerinde ve bazal membranlarda da bulunabilir ^{12,17-20}.

GAG'lar tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşmuş dallanma göstermeyen polisakkarit dizileridir. GAG yapısında yer alan tekrarlayan disakkarit ünitelerinden bir tanesi çoğunlukla sülfatlanmış olan bir amino şekerdir (N-asetilglukozamin ya da N-asetilgalaktozamin). İkinci şeker ise genellikle bir üronik (glukronik ya da iduronik) asittir. GAG zincirlerinin temel şeker omurgasında önemsiz farklar bulunurken, daha sonra gerçekleşen sülfatlanma, deasetilasyon ve epimerizasyon modifikasyonları GAG zincirlerinin farklılaşmasını sağlar. Bu olaylar GAG zincirlerinin özel aktivitesi için önemlidir. Yapılarındaki şeker moleküllerinde sülfat ve karboksil grupları bulunduğu için GAG'lar, negatif yüklü moleküllerdir ^{21,22}. GAG'lar yapısal olarak hyaluronik asit, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat, heparin ve heparan sülfat ve keratan sülfat olmak üzere 4 gruba ayrılır ²³. Hyaluronik asit, diğer GAG'ların tersine proteoglikan yapısındaki kor proteinine bağlanmaz ve morfogenez sırasında doku oluşumu ve düzenlenmesi gibi görevler üstlenir ^{24,25}.

Tunikamisinler, çeşitli Streptomyces türlerinden üretilen bir nükleotid antibiyotik grubudur. Bu antibiyotikler kompleks karbohidratların sentezinde rol alan lipid bağlı şeker ara ürünlerinin oluşumunu inhibe ederler ²⁶. Ökaryotik hücrelerde tunikamisin, oligosakkarit zincirlerinin proteinlerdeki asparagin

gruplarına bağlanmasında gerekli olan dolichyl N-acetylglucosamine disülfid sentezini inhibe ederek proteinlerin N-glikozilasyonunu engeller ²⁷⁻³⁰.

Bu çalışmada, ECM içeriği bakımından zengin olan ve hücre göçü ile hücreler arası etkileşimlerin önemli roller oynadığı dalak dokusunun gelişimsel sürecinde bir glikozilasyon inhibitörü olan tunikamisinin glikozaminoglikan moleküllerine, laminin glikoproteinlerine ve apoptotik sürece etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Dokuların Elde Edilmesi

Bu çalışmada Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun izini (Protokol no: 2006/0038) çerçevesinde Balb/c tipi fareler kullanıldı. Vajinal yaymalarında kornifiye epitel hücre görülen dişi fareler östrus evresinde olarak değerlendirilip erkek farelerle çiftleştirildi. Ertesi gün, vajinal plak belirlenen fareler hamileliğin 0. günü olarak değerlendirildi. Hamileliğin 16. gününde ve doğumdan 24 saat önce tunikamisin (Sigma) 150 mM dekstroza 0.05 mg/ml şeklinde süspanse edilerek tek doz (1µg/g vücut ağırlığı olacak şekilde) intraperitoneal olarak verildi. Kontrol amaçlı olarak hamilelere aynı oranda ve şekilde dekstrozu uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarına ait üçer adet 17 günlük hamile fare ile 1 ve 3 günlük dörder adet yeni doğan fare servikal dislokasyon ile öldürülerek embriyonik ve yenidoğan dalak dokuları çıkarıldı. Çıkarılan dokuların bir kısmı %10 nötral formalin ile tespit edildi. Dokular 1 gün fiksasyon sıvısında bekletildikten sonra %70'lik alkole alınarak parafine gömülünceye kadar 4°C'de bekletildi. Diğer bir kısım doku ise total protein ekstraksiyonu ve immunoblotting uygulamaları için tartılarak -86°C'lik derin dondurucuya alındı. 4°C'de bekletilen dokular artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı ve ksilol ile şeffaflandırılarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom aracılığı ile alınan 5 µm'luk kesitler polilizin kaplı lamlara (Surgipath) yayıldı.

Kritik Elektrolit Konsantrasyonlarında ve Farklı pH'larda Alcian Blue (AB) Boyamaları

Alcian blue (AB), glukokonjugatlara özgü katyonik bir boyadır. Bu boya dokular içindeki karboksil, fosfat ve sülfat gruplarına elektrostatik olarak bağlanır. GAG'lar polianyon özellikteki sülfat esterleri ve karboksilik asit içerdiklerinden AB ile boyanırlar. Bağlanma kapasitesi substratın yük kapasitesi ile boya solüsyonu içerisinde yer

alan diğer bir katyonun (Mg^{++}) konsantrasyonu ve pH'sına göre değişir. Boya solusyonu içerisindeki elektrolit konsantrasyonu değiştirilerek (kritik elektrolit konsantrasyonları oluşturularak) glikozaminoglikanlar gibi polianyonik bileşikler belirlenir (Tablo 1)³¹.

Tablo 1. AB-PAS'ın farklı pH ve elektrolit konsantrasyonlarındaki boyama özellikleri

Table 1. Staining patterns of AB-PAS sequences at different electrolyte concentrations and pH values

Uygulama	Reaksiyon	Spesifite	Referans
AB pH 5.7 0.025 M $MgCl_2$	Mavi	Sülfatlanmış GP'ler, Karboksillenmiş ve Sülfatlanmış GAG'lar	31
AB pH 5.7 0.3 M $MgCl_2$	Mavi	Sülfatlanmış GAG'lar	31
AB pH 2.5	Turkuaz	Asidik ve nötral GC'lar	32-34

GP: glikoprotein, GC: glukokonjugat
GP: glycoprotein, GC: glycoconjugate

Deney ve kontrol gruplarına ait dalak dokularındaki glukokonjugatları belirlemek için, AB'nun (Alcian Blue 8GX, Fluka) pH 2.5'deki %1'lik konsantrasyonu ve sodyum asetat ile tamponlanmış pH 5.7'deki $MgCl_2$ 'ün 2 farklı konsantrasyonu (%0.1 AB 0.025M $MgCl_2$ ve 0.3M $MgCl_2$) kullanıldı. Zit boya olarak ise periyodik asit Schiff kompleksi (PAS) uygulandı (Tablo 1)³¹⁻³⁴. Kısaca, rehidratasyon işlemi uygulandıktan sonra kesitlerin bir kısmı AB'nun pH 5.7 deki 0.025M ve 0.3M $MgCl_2$ konsantrasyonlarında 18 saat, diğer kısmı ise pH 2.5'deki konsantrasyonu ile 30 dak boyandı. Her iki boyama işleminden sonra kesitler 5 dak periyodik asit ve karşıt boyama içinde 30 dak Schiff's solusyonunda bekletildi. Ardından kesitler yükselen alkol serilerinden geçirilip, ksilol aşamasından sonra uygun bir kapatma malzemesiyle (Entellan®, Merck) kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

Dalak Dokularından Total Protein Ekstraksiyonu

Kontrol ve deney gruplarına ait dalak proteinlerinin elektroforezi için daha önceden disekte edilerek -86°C'de tutulan dokular 3 ml/g olacak şekilde RIPA Buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, %1 Nonidet P40 (NP40, Roche Applied Science Cat # 11754599001), %0.5 Na-deoxycholate (Sigma), %1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Fluka)] içine alındı ve homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra, proteolitik enzimleri bloke etmek amacıyla her bir gram dokuya 30 µl olacak şekilde 10 mg/ml fenilmetilsulfonyl florid (PMSF, Sigma) ve 30 µl proteaz inhibitör kokteyli (Sigma, Cat # P8340) eklendi ve buz üzerinde 1 saat bekletildi. İnkübasyon işleminden

sonra dokular 8.000 g'de ve 4°C'de 20 dak santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant tekrar aynı hızda ve sıcaklıkta santrifüjlendi. Proteinleri içeren ikinci süpernatant 20'şer µl'lik hacimlerde -86°C'lik derin dondurucuya kondu.

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, Mini-Protean III elektroforez sistemi (Bio-Rad, Cat #165-3301) kullanılarak Laemmli³⁵ yöntemine göre yapıldı. %4'lük üst (stacking) ve %7.5'lük alt (resolving-separating) jel içeren kasetlere [10.1 cm (G) x 7.3 cm (Y)] her bir örnekten 15 µl total protein ekstraktı yüklendi. Jeller 90 V ve 15 mA'de 2 saat 5 dak yürütüldü ve protein bantlarının ayrıştırılması sağlandı. Elektroforez sonrasında protein bantlarının yerlerini tespit etmek için jeller, %0.25'lik Coomassie Brilliant Blue G (CBB) (Sigma) ile boyandı.

İmmunoblotting

Standart prosedüre³⁶ uygun olarak proteinler, blotting ünitesi (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) yardımı ile 0.2 µm'lik poliviniliden diflorid (PVDF) membranlara (Immun-Blot®, Bio-Rad) 100 V 350 mA'de 2 saat transfer edildi. Transferden sonra, blotlanan proteinleri belirlemek için membran %0.1'lik Ponceau-S (Sigma) ile boyandı. Daha sonra membran Tris tamponlu tuz çözeltisi-Tween 20 (TBST) taponunda %5'lik non-fat dried milk (NFDM, Sigma) ile 30 dak bloklandı. Oda sıcaklığında iki kez TBST ile yıkanan membranlar TBST ile 1:1000 oranında dilüe edilmiş anti-laminin tavşan poliklonal antikor (Abcam, Cat # 30320) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve 3 kez 10'ar dak TBST ile yıkandı. Ardından TBST ile 1:1000 oranında seyreltilmiş biyotinlenmiş keçi anti-tavşan polivalan sekonder antikorla (LabVision, Cat # TP-125-BN) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Üç kez 10'ar dak TBST ile yıkanan membranlar TBST ile 1:500 oranında dilüe edilmiş streptavidin peroksidaz (LabVision, Cat # TP-125-HR) ile yarım saat oda sıcaklığında muamele edildi ve yaklaşık 15 dak diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) substrat (Roche Applied Science, Cat # 11718096001) ile inkübe edilerek reaksiyonun görünür hale gelmesi sağlandı. Bant oluşumu gözlemdikten sonra reaksiyon ultra saf su ile durduruldu ve membranlar tarayıcı ile tarandı.

Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Uygulaması

TUNEL, apoptotik süreçte endonukleazların aktivasyonu sonucu meydana gelen yaklaşık 180-200 baz

çiftlik DNA kırıklarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik için In situ Cell Death Detection Kit (POD Roche Applied Science, Cat # 11684817910) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Deney ve kontrol gruplarından hazırlanarak polilizinli lamlara alınan kesitler parafinden kurtarmak için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 2 kez 30'ar dak ksilol ile yıkandı. Azalan etanol serileri ve rehidratasyondan sonra kesitler 2 kez 5 dak fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Enzim ve işaretli nükleotidlerin DNA kırıklarına ulaşmasını kolaylaştırmak için kesitler oda sıcaklığında proteinaz K (Roche Applied Science, Cat # 03115836001) ile 20 dak inkübe edildi ve PBS ile yıkandı. Ardından, kesitler TUNEL reaksiyon karışımı [işaretleme solüsyonu + terminal deoksikükleotidil transferaz (TdT) enzim solüsyonu] (Roche Applied Science, Cat # 03115836001) 37°C'de 1 saat nem odasında inkübe edildi ve PBS ile iki kez yıkandı. Negatif kontrol amaçlı olarak bazı kesitler sadece işaretleme solüsyonu ile muamele edildi. Bu aşamadan sonra tüm kesitler converter-POD (Roche Applied Science, Cat # 03115836001) ile 37°C'de 30 dak inkübe edildi ve PBS ile iki kez yıkandı. Ardından kesitler DAB substrat (Roche Applied Science, Cat # 11718096001) ile reaksiyon görülünceye kadar oda sıcaklığında muamele edildi ve PBS ile iki kez yıkandı. Karşıt boyama olarak kesitler %0.5'lik metil yeşili (Sigma) ile 10 dak boyandı, distile su ile yıkandı ve n-butanol (Riedel de Haen) ile 30 saniye inkübe edilerek ksilolden geçirildi. Daha sonra kesitler uygun bir kapatma malzemesi (Entellan® Merck) ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelenmeye alındı.

BULGULAR

pH 5.7 0.025 M MgCl₂'de Alcian Blue Boyamaları

AB'nin pH 5.7'deki 0.025 M MgCl₂ konsantrasyonunda 17 günlük embriyoların kontrol gruplarına ait dalak dokularındaki kırmızı ve beyaz pulpa, sinuzoid duvarları ve merkezi arterlerde yoğun bir boyanma görülmüştür (Tablo 2, Şekil 1 a). Yeni doğanlara ait kontrol gruplarında dalak parankiması benzer şekilde yoğun olarak boyanırken sinuzoid duvarlarında boyanma yoğunluğu kısmen azalmıştır (Tablo 2, Şekil 1 b, c). Uygulama gruplarında ise hem embriyonik dönemde hem de yeni doğan gruplarında (özellikle sinuzoid duvarlarında ve merkezi arterlerde), reaksiyon hafif bir şekilde azalmıştır (Tablo 2, Şekil 1 d-f).

pH 5.7 0.3 M MgCl₂'de Alcian Blue Boyamaları

Kontrol gruplarına ait dalak dokuları AB'nin pH

5.7'deki 0.3 M MgCl₂ konsantrasyonunda zayıf bir boyanma gösterirken PAS reaktivitesinde (özellikle merkezi arter ve sinuzoid duvarlarında) belirgin bir artış gözlenmiştir (Tablo 2, Şekil 1 g-i). Uygulama gruplarında ise embriyonik ve yenidoğan dalak dokuları AB ile bir reaksiyon vermemiştir (Tablo 2, Şekil 1 j-l). Bunun yanında, bu gruplarda görülen PAS reaksiyonu da kontrol grubuna göre azalmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait embriyonik ve yeni doğan dalak dokularında, kırmızı pulpada AB'nin bu konsantrasyonuyla yoğun olarak boyanan mast hücrelerine rastlanmış (Şekil 1 g-l) ve bu hücrelerin sayısının gelişimsel süreç ile birlikte arttığı belirlenmiştir. Bu hücreler histolojik olarak 17 günlük gruplarda küçük baloncuklar şeklinde yeni doğan gruplarda granüllü yapılar şeklinde görünmektedir.

pH 2.5'da Alcian Blue Boyamaları

AB'nin pH 2.5'teki konsantrasyonu, kontrol gruplarına ait embriyonik ve yeni doğan dalaklarında oldukça azalmış bir boyanma görülürken (Tablo 2, Şekil 1 m-o) uygulama gruplarında bir reaksiyona rastlanmamıştır. Buna karşın, sinuzoid duvarları ve merkezi arterler PAS ile yoğun bir reaksiyon vermiştir (Tablo 2, Şekil 1 p-s). Boyanın bu konsantrasyonunda mast hücrelerinin boyanmadığı (ya da çok az boyandığı) da belirlenmiştir.

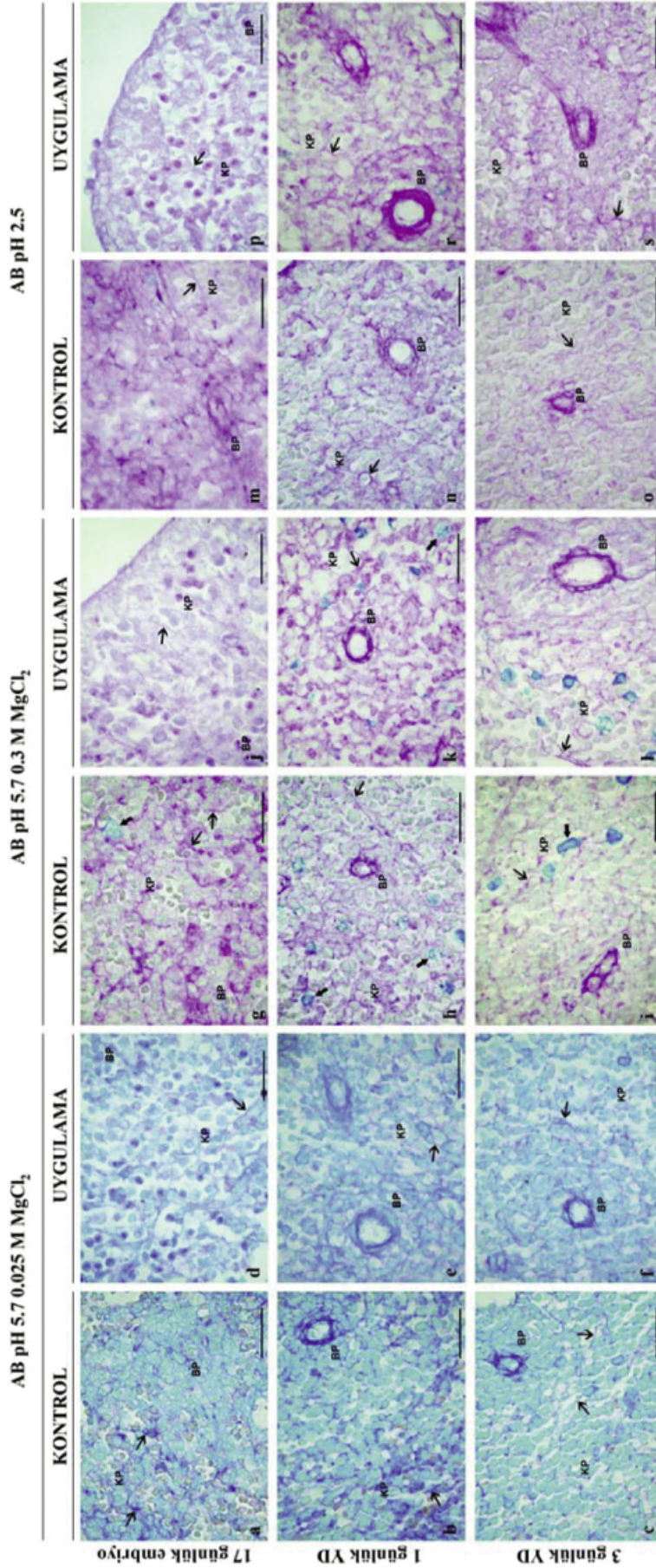
Tablo 2. Kontrol ve uygulama gruplarının embriyonik ve yeni doğan dalak dokusundaki AB-PAS reaksiyonları

Table 2. AB-PAS reactions in embryonic and newborn spleen tissues from control and application groups

E/YD yaşı	pH 5.7 0.025 M MgCl ₂			pH 5.7 0.3 M MgCl ₂			pH 2.5			
	KP	BP	S	KP	BP	S	KP	BP	S	
17 günlük E	K	++	++	++	±*	±*	-**	-*	-*	-**
	U	+	+	+	-*	-*	-*	-*	-*	-*
	K	++	++	++	±*	±*	-**	-*	-*	-**
	U	+	+	+	-*	-*	-**	-*	-*	-*
1 günlük YD	K	++	++	++	±*	±*	-**	-*	-*	-**
	U	+	+	+	-*	-*	-*	-*	-*	-*
	K	++	++	++	±*	±*	-**	-*	-*	-**
	U	+	+	+	-*	-*	-*	-*	-*	-*
3 günlük YD	K	++	++	++	±*	±*	-**	-*	-*	-**
	U	+	+	+	-*	-*	-**	-*	-*	-*
	K	++	++	++	±*	±*	-**	-*	-*	-**
	U	+	+	+	-*	-*	-*	-*	-*	-*

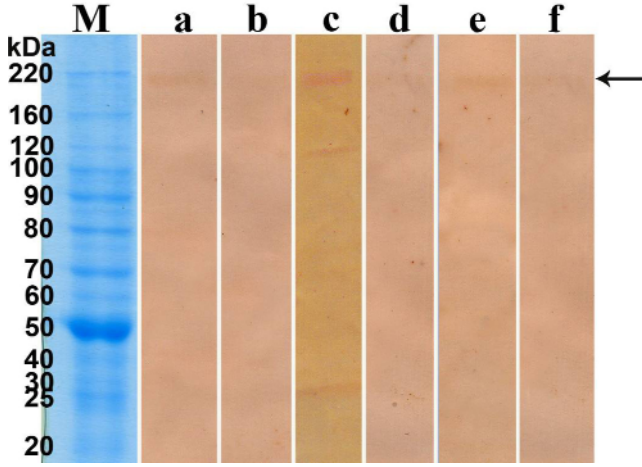
:- boyanma yok, +: zayıf boyanma, ++: yoğun boyanma, +++: çok yoğun boyanma, **K**: kontrol grubu, **U**: uygulama grubu, **KP**: kırmızı pulpa, **BP**: beyaz pulpa, **S**: sinuzoid, **E**: embriyonik dönem, **YD**: yeni doğan, *: PAS reaksiyonu, **: güçlü PAS reaksiyonu

:- no staining, ±: weak staining, +: moderate staining, ++: intense staining, **K**: control group, **U**: application group, **KP**: red pulp, **BP**: white pulp, **S**: sinusoid, **E**: embryonic period, **YD**: newborn, *: PAS reaction, **: strong PAS reaction



Şekil 1. Kontrol gruplarına ve tunicamisin uygulanmış gruplara ait embriyonik ve yeni doğan (YD) dalak dokularında AB-PAS boyanmaları. Kontrol gruplarında, beyaz pulpa (BP), kırmızı pulpa (KP) ve sinuzoid duvarları boyanın 0.025 M'lik konsantrasyonu ile yoğun olarak boyanmıştır (a-c). 0.3 M'lik konsantrasyonda (g-i) ve pH 2.5'da (m-o) ise reaksiyon oldukça azalmıştır. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 0.025 M MgCl₂ konsantrasyonundaki AB-PAS boyanmaları tüm tunicamisin uygulanmış gruplarda hafifçe azalmıştır (d-f), 0.3 M'lik konsantrasyonda (j-l) ve pH 2.5'da (p-s) ise tamamen kaybolmuştur. Ek olarak, hücreler arası alanda bir genişleme göze çarpmaktadır. Kalın oklar 0.3 M MgCl₂ konsantrasyonunda mast hücrelerini göstermektedir. Barlar 30µm

Fig 1. The staining patterns of AB-PAS in embryonic and newborn (YD) spleen tissues belong to control and tunicamycin treated groups. White (BP) and red (KP) pulps as well as sinusoidal walls were strongly stained with 0.025 M in control groups (a-c). However, the reaction was heavily decreased at 0.3 M concentration (g-i) and at pH 2.5 (m-o). When compared to control groups, the AB-PAS staining pattern at 0.025 M MgCl₂ were slightly decreased in all tunicamycin treated groups (d-f), whereas the reaction was disappeared at 0.3 M (j-l) and at pH 2.5 (p-s). In addition, there was an increase in the interstitial space between the cells. YD: newborn, KP: red pulp, BP: white pulp, thin arrows: sinusoid walls, thick arrows indicate mast cells at 0.3 M MgCl₂. Bars 30 µm

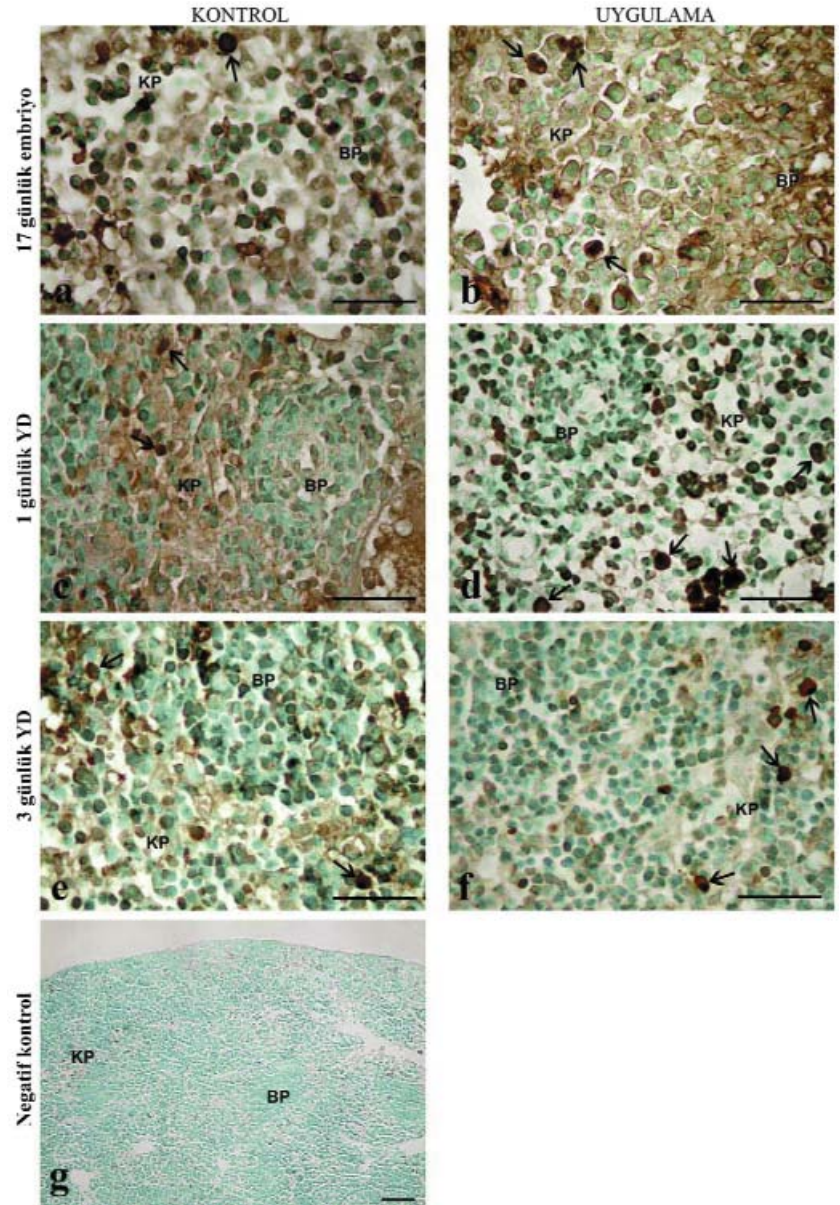


Şekil 2. Dalak ekstraktlarında laminin zincirinin immunoblotting analizleri, kontrol gruplarında poliklonal anti-laminin antikorunun, laminin- β 1 alt ünitesini betimleyen ~ 215 kDa'da reaksiyon verdiğini göstermiştir (a, c ve e sütunları). Buna karşın laminin- β 1 alt ünitesine karşı oluşan reaksiyon, tunikamisin uygulanmış doku ekstraktlarında büyük ölçüde azalmıştır (b, d ve f sütunları). a ve b sırasıyla 17 günlük kontrol ve uygulama grupları. c: 1 günlük yeni doğan kontrol, d: 1 günlük uygulama, e ve f sırasıyla 3 günlük yeni doğan kontrol ve uygulama doku ekstraktları. Geniş spektrumlu moleküler kütle protein standardı (Benchmark Broad Range Protein Marker, Invitrogen Cat \neq 10747012) sol kısımda yer almaktadır (M)

Fig 2. Immunoblotting analyses of laminin chain in spleen extracts indicated that polyclonal antibody against laminin were reacted at ~ 215 kDa which represents laminin- β 1 subunit in control groups (lanes a, c and e). By contrast, reactivity of laminin- β 1 subunit was strongly decreased in tunicamycin treated tissue extracts (b, d and f). a and b indicate control and tunicamycin treated embryos from 17th gestational day, respectively. c: control from first post natal day, d: application tissue from first postnatal day, e and f describe control and application tissue extracts from 3rd post natal day, respectively. A set of broad range molecular mass protein standard (Benchmark Broad Range Protein Marker, Invitrogen Cat \neq 10747012) indicated on the left (M)

Şekil 3. Kontrol (a,c,e) ve uygulama (b,d,f) gruplarında TUNEL uygulamaları tunikamisinin apoptotik hücre (oklar) sayısını arttırdığını göstermiştir. KP: kırmızı pulpa, BP: beyaz pulpa. Barlar 30 μ m. g: negatif kontrol, bar 50 μ m

Fig 3. TUNEL assays in control (a,c,e) and application (b,d,f) groups indicated that tunicamycin induce an increment in apoptotic cell number (arrows). KP: red pulp, BP: white pulp. Bars 30 μ m. g: negative control, bar 50 μ m



Laminin İmmunoblotting Analizi

Yapılan immunoblotting çalışmalarında kontrol gruplarına ait dalak ekstraktlarında yaklaşık 220 kDa'luk bölgede anti-laminin poliklonal antikoru ile reaksiyon veren bir bant belirlenmiştir (*Şekil 2 a,c ve e sütunları*). Büyük olasılıkla laminin molekülünün 215 kDa'luk $\beta 1$ zinciri olan bu bant, 17 günlük embriyo ve 1 ve 3 günlük yeni doğan dönemlerine ait tunikamisin uygulanmış dokularda büyük ölçüde azalmıştır (*Şekil 2 b,d ve f sütunları*).

TUNEL Uygulaması

Apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL uygulamalarında embriyolara ait kontrol gruplarında az sayıda apoptotik hücreye rastlanırken bu sayının yeni doğan gruplarında özellikle 3 günlük yeni doğan grubunda arttığı gözlenmiştir (*Şekil 3 a, c, e*). Uygulama grubunda ise apoptotik hücre sayısında önemli bir artış görülmüştür. Bu artışın özellikle yeni doğan gruplarında daha fazla olduğu belirlenmiştir (*Şekil 3 b, d, f*).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Periferal bir lenfoid organ olarak dalak immunolojik yanıtta önemli görevler üstlenmektedir. Dalak çeşitli ECM moleküllerinden oluşmuş zengin bir retiküler ağ yapısı içerir. ECM, dokuların ve hücrelerin yapısal bütünlüğünü, hücrelerin morfogenezini, göçünü, proliferasyonunu, yaşayabilirliğini ve metabolik fonksiyonlarını düzenleyen dinamik bir ortamdır⁴. ECM, bu fonksiyonlarını yapısal bileşenleri (glikoproteinler, proteoglikanlar, bazı düzenleyici moleküller) ile gerçekleştirir⁴. Bu çalışmada bir N-glikozilasyon inhibitörü olan tunikamisinin ECM bileşenlerinden glikozamino- glikanlar ve laminin molekülleri üzerine etkileri embriyonik ve yeni doğan fare dalak dokularında araştırılmıştır.

AB-PAS uygulamalarında incelenen tüm kontrol dönemlerine ait dalak dokularında AB'nun 0.025 M MgCl₂ konsantrasyonu ile yoğun olarak boyandığı, buna karşın, boyanın 0.3 M'luk konsantrasyonu ile pH 2.5'luk solusyonda zayıf bir reaksiyon göze çarpmaktadır. AB'nin farklı konsantrasyonları ve pH aralıklarında kontrol gruplarındaki farklı boyanma özellikleri, dalak parankimasında özellikle karboksillenmiş GAG'ların (örneğin hyaluronik asit) yoğun olarak bulunduğunu, bunun yanında sülfatlanmış ve/veya asidik GAG'ların ya da diğer glukokonjugatların da zayıf olarak yer alabileceğini göstermiştir. Tunikamisin uygulanan grupta ise incelenen tüm dönemlerde AB 0.025 M MgCl₂ reaksiyonu özellikle merkezi arterlerde

ve sinuzoid duvarlarında hafif bir azalma gösterirken 0.3 M'luk ve pH 2.5'luk konsantrasyonlarda boya reaksiyonu tamamen kaybolmuştur. Bu sonuç, tunikamisinin dalak parankimasında karboksillenmiş GAG'ların hafif bir şekilde azalmasına neden olurken sülfatlanmış ve/veya karboksillenmiş GAG'ların ya da glukokonjugatların ekspresyonlarını büyük ölçüde azalttığını düşündürmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda tunikamisinin epidermal hücre yüzeyi ile ilişkili glukokonjugatların sentezinin etkilediği²⁶ ve glikozamino- glikan zincirlerinin uzamasını ve sülfatlanmasını inhibe ettiği³⁷ belirlenmiştir. Öte yandan, tunikamisinin sülfatlanmış korneal³⁸ ve epidermal²⁶ GAG'ların sentezini inhibe ederken hyaluronik asit üzerine bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Sülfatlanmış GAG sentezinin tunikamisin aracılığı ile inhibisyonu konusundaki bilgiler yeterli değildir. Tunikamisinin bu inhibitör etkisinin N-bağlı oligosakkarit sentezi inhibisyonu yoluyla proteoglikan kor protein "havuzunu" azalttığı düşünülmektedir³⁷. Yapılan bu çalışmalar, tunikamisinin etkisi ile özellikle bazal tabakalar içeren (sinuzoid ve damar duvarları gibi) kısımlarda bir azalma olması mevcut literatür bulgularını desteklemektedir. Fötal gelişim sırasında sülfatlanmış bir GAG olan heparin içeren mast hücrelerinin dalak, karaciğer ve deride bulunduğu bilinmektedir³⁹. Uygulama gruplarına ait dalak dokularında mast hücrelerinin 0.3 M MgCl₂ konsantrasyonlarındaki AB ile reaksiyon vermesi tunikamisinin heparin biyosentezi üzerine inhibitör bir etkisinin olmadığını düşündürmüştür.

Dalak, lenf düğümü ve bademcikler gibi immunolojik savunma merkezleri olarak görev yapan lenfoid organlarda laminin, kollajen ve fibronektin gibi çeşitli ECM bileşenlerinin bulunduğu bilinmektedir⁴⁰⁻⁴³. Yapılan çalışmalarla laminin zincirlerinin gelişimsel süreçte temel bir rol oynadığı ve bu zincirlerden bazılarının eksikliğinde bazal membranın şekillenemediği^{44,45}, kas gelişiminin tam olarak sağlanamadığı⁴⁶, iskelet, kas ve sinir sisteminde, deride, mukozada, kan damarlarında çeşitli hasarların ortaya çıktığı görülmüştür. Öte yandan, laminin molekülünün lenfositler ile antijen sunan hücreler arasındaki hücre-hücre etkileşimlerini düzenlediği ve bu nedenle lenfoid organlarda immunolojik fonksiyonların gerçekleşmesinde önemli bir rol üstlendiği öne sürülmüştür⁴⁷. Dalak dokusunda laminin sentezine bazal laminada, beyaz pulpanın retiküler fibrilleri ve marjinal sinüsün retiküler matriksinde, damar benzeri yapıların çevresinde düz kas hücrelerinde ve kırmızı pulpanın retiküler ağında rastlanmıştır^{41,48-50}. Yoğun olarak glikozillenmiş bir molekül olan lamininin karbohidrat içeriğinin biyolojik önemi henüz tam anla-

şılabilmiş değildir. Tunikamisinin N-bağlı glikozilasyonu bloke etmesinin ^{27,28} dışında laminin sentezini ve glikozilasyonunu, bu nedenle laminin sekresyonunu önemli oranlarda azalttığı belirtilmiştir ^{8,51}. Benzer şekilde bizim laminin blotting çalışmalarımızda tunikamisinin dalak dokularında laminin miktarını azalttığı görülmektedir. Daha önceki bulgulara ⁵² uygun olarak Tunikamisinin protein glikozilasyonu üzerine inhibitör bir etki göstermesi sonucu hücreler arası alanda bir genişleme ortaya çıkmaktadır. Bu durum, laminin sentez ya da glikozilasyonunda belirlediğimiz bu değişikliklerin hücre-hücre ya da hücre-ECM etkileşimlerinde glikoproteinlerin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Apoptozis, yetişkin dokularında ve fetal hayat sırasında, embriyonik dönemde organ şekillenmesi, hücre sayısının kontrolü, uygun olmayan ya da hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması, immun sistemin gelişimi ve fonksiyon göstermesi gibi çok farklı fizyolojik işlemlerin gerçekleştirilmesinde büyük önem taşıyan bir ölüm çeşididir ⁵³⁻⁵⁶. Hüresel olarak, endoplazmik retikulum (ER), apoptotik sinyallerin sürdürülmesinde anahtar role sahip bir organeldir ⁵⁷. ER, serbest Ca⁺⁺ iyonların deposu olarak Ca⁺⁺ homeostazisinde önemli rol oynar. Programlanmış hücre ölümünde Ca⁺⁺'un ER'dan mitokondriye transferi için bazı apoptotik uyarılar gerekirken, bazı apoptotik sinyallerde ER'un Ca⁺⁺ kapıları üzerine etki etmektedir ⁵⁸. Daha önce yapılan çalışmalarda kaspaz 12'nin ER-baskılanması aracılığı ile gerçekleşen apoptoziste önemli bir mediatör olduğu vurgulanmıştır ^{59,60}. Tunikamisinin N-bağlı glikozilasyonu bloke ederek ER baskılanmasını arttırdığı ⁶¹ ve uzun süreli tunikamisin uygulamalarının ER-membranındaki kaspaz-12'nin aktivasyonunu uyararak apoptozisi indüklediği ⁶² ve glikozilasyon inhibisyonu ile apoptozis arasında direkt bir ilişki olduğu rapor edilmiştir ^{63,64}. TUNEL ile yaptığımız çalışmalarda, tunikamisin uygulanan gruplarda apoptotik hücre sayılarında büyük oranda artış gözlemlenmiştir. Tunikamisinin dalak dokularındaki hücrelerde ER baskılanmasını arttırmalarının yanında laminin moleküllerinin glikozilasyonunu ortadan kaldırarak ECM bileşiminde değişiklik yaptığı ve hücreleri apoptozise gönderdiği düşünülebilir. Örneğin, epitelyal hücreler ECM ile kontaktlarını yitirdiklerinde apoptozise gitmektedirler ^{65,66}. Böyle ECM ile hücre arasında eksik yada uygunsuz adezyon sonucu ortaya çıkan apoptozise anoikis (Antik Yunanca'da evsizlik) adı verilmiştir ⁶⁵. Anoikis mekanizmasının ECM en önemli reseptörleri olan integrinlerin oluşturduğu sinyaller tarafından yönlendirildiği öne sürülmektedir ⁶⁷. Integrinlere bağlanabilen laminin moleküllerinin hücreleri anoikis'ten koruduğu ⁶⁸ ve

laminin moleküllerinin baskılanmasının ⁶⁹ ya da laminince zengin matriksin haraplanmasının hücreleri anoikis'e götürdüğü saptanmıştır ⁷⁰⁻⁷⁵.

Genel sonuç olarak, gelişimsel süreçte ECM bileşenlerinin glikozilasyon durumu hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerinin düzenlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Öte yandan, glikozilasyon değişimlerinin ve/veya eksikliklerinin dalak dokusu üzerinde apoptotik etkiler yaptığı ve bu apoptotik etkinin oluşumunda hücreler ile laminin ve GAG'lar gibi ECM bileşenleri arasındaki etkileşimlerin düzenleyici bir rol oynadığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. **Damsky C, Sutherland A, Fisher S:** Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. *FASEB J*, 7 (14): 1320-1329, 1993.
2. **Aumailley M, Gayraud B:** Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med*, 76 (3-4): 253-265, 1998.
3. **Daley WP, Peters SB, Larsen M:** Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*, 121, 255-264, 2008.
4. **Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP:** Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol*, 14 (5): 526-532, 2003.
5. **Streuli C:** Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol*, 11 (5): 634-640, 1999.
6. **Hall H, Schachner M:** Laminins and their ligands: involvement of carbohydrates in formation of the extracellular matrix and in cell adhesion. *Trends Glycosci Glycotechnol*, 10 (55): 361-382, 1998.
7. **Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR:** Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254 (19): 9933-9937, 1979.
8. **Dean JW 3rd, Chandrasekaran S, Tanzer ML:** A biological role of the carbohydrate moieties of laminin. *J Biol Chem*, 265 (21): 12553-12562, 1990.
9. **Mercurio AM:** Laminin receptors: Achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol*, 5 (11): 419-423 1995.
10. **Colognato H, Yurchenco PD:** Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218 (2): 213-234, 2000.
11. **Davies JA, Fisher CE, Barnett MW:** Glycosaminoglycans in the study of mammalian organ development. *Biochem Soc Trans*, 29, 166-171, 2001.
12. **Hardingham TE, Fosang AJ:** Proteoglycans: Many forms and many functions. *FASEB J*, 6 (3): 861-870, 1992.
13. **Yanagishita M:** Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn*, 43 (6): 283-293, 1993
14. **Har-el R, Tanzer ML:** Extracellular matrix. 3: Evolution of the extracellular matrix in invertebrates. *FASEB J*, 7 (12): 1115-1123, 1993.

15. **Harrisson F:** The extracellular matrix and cell surface, mediators of cell interactions in chicken gastrulation. *Int J Dev Biol*, 33 (4): 417-438, 1989.
16. **Zagris N:** Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron*, 32 (4): 427-438, 2001.
17. **Kolset SO, Gallagher JT:** Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1032 (2-3): 191-211, 1990.
18. **Kolset SO, Prydz K, Pejler G:** Intracellular proteoglycans. *Biochem J*, 379, 217-227, 2004.
19. **Iozzo RV, Murdoch AD:** Proteoglycans of the extracellular environment: Clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J*, 10 (5): 598-614, 1996.
20. **Jalkanen M, Rapraeger A, Bernfield M:** Mouse mammary epithelial cells produce basement membrane and cell surface heparan sulfate proteoglycans containing distinct core proteins. *J Cell Biol*, 106 (3): 953-962, 1988.
21. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P:** Cell junctions, cell adhesions, and the extracellular matrix. In, Gibbs S (Ed): *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. pp. 1131-1204, Garland Science, New York, 2008.
22. **Prydz K, Dalen KT:** Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci*, 113, 193-205, 2000.
23. **Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM:** Carbohydrates. In, Nelson DL, Cox MM (Eds): *Principles of Biochemistry*. 2nd ed. pp. 298-323, Worth Publishers, New York, 1993.
24. **Timar J, Jeney A, Kovalszky I I, Kopper L:** Role of Proteoglycans in Tumor Progression. *Pathol Oncol Res*, 1 (1): 85-93, 1995.
25. **Toole BP:** Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 12 (2): 79-87, 2001.
26. **King IA, Tabiowo A:** Effect of tunicamycin on epidermal glycoprotein and glycosaminoglycan synthesis in vitro. *Biochem J*, 198 (2): 331-338, 1981.
27. **Takatsuki A, Kohno K, Tamura G:** Inhibition of biosynthesis of polyisoprenol sugars in chick embryo microsomes by tunicamycin. *Agric Biol Chem*, 39, 2089-2091, 1975.
28. **Tkacz JS, Lampen O:** Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 65, 248-257, 1975.
29. **Lehle L, Tanner W:** The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Lett*, 72 (1): 167-170, 1976.
30. **Tsvetanova BC, Kiemle DJ, Price NP:** Biosynthesis of tunicamycin and metabolic origin of the 11-carbon dialdose sugar, tunicamine. *J Biol Chem*, 277 (38): 35289-35296, 2002.
31. **Scott JE, Dorling J:** Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. *Histochimie*, 5 (3): 221-233, 1965.
32. **Mowry RW:** The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue 8GX, and their combination with the periodic-acid-Schiff reaction. *Ann N Y Acad Sci*, 106, 402-423, 1963.
33. **Spicer SS, Horn RG, Leppi TJ:** Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In, Wagner BM, Smith DE (Eds): *The Connective Tissue*. pp. 251-303, Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1967.
34. **Yamabayashi S:** Periodic acid-Schiff-alcian blue: A method for the differential staining of glycoproteins. *Histochem J*, 19 (10-11): 565-571, 1987.
35. **Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685, 1970.
36. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 (9): 4350-4354, 1979.
37. **Takagaki K, Tazawa T, Munakata H, Nakamura T, Endo M:** Characterization of beta-D-xyloside-initiated glycosaminoglycan synthesized by human skin fibroblasts in the presence of tunicamycin. *Glycoconj J*, 15 (5): 483-489, 1998.
38. **Hart GW, Lennarz WJ:** Effects of tunicamycin on the biosynthesis of glycosaminoglycans by embryonic chick cornea. *J Biol Chem*, 253 (16): 5795-5801, 1978.
39. **Straus AH, Nader HB, Dietrich CP:** Absence of heparin or heparin-like compounds in mast-cell-free tissues and animals. *Biochim Biophys Acta*, 717 (3): 478-485, 1982.
40. **Liakka A, Apaja-Sarkkinen M, Karttunen T, Autio-Harmainen H:** Distribution of laminin and types IV and III collagen in fetal, infant and adult human spleens. *Cell Tissue Res*, 263 (2): 245-252, 1991.
41. **van den Berg TK, van der Ende M, Döpp EA, Kraal G, Dijkstra CD:** Localization of beta 1 integrins and their extracellular ligands in human lymphoid tissues. *Am J Pathol*, 143 (4): 1098-1110, 1993.
42. **Liakka KA:** The integrin subunits alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 5, alpha 6, alpha V, beta 1 and beta 3 in fetal, infant and adult human spleen as detected by immunohistochemistry. *Differentiation*, 56 (3): 183-190, 1994.
43. **Jaspars LH, De Melker AA, Bonnet P, Sonnenberg A, Meijer CJ:** Distribution of laminin variants and their integrin receptors in human secondary lymphoid tissue. Colocalization suggests that the alpha 6 beta 4-integrin is a receptor for laminin-5 in lymphoid follicles. *Cell Adhes Commun*, 4 (4-5): 269-279, 1996.
44. **Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D:** Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol*, 144 (1): 151-160, 1999.
45. **Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE:** Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development*, 131 (10): 2247-2256, 2004.
46. **Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, Engvall E:** Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscul Disord*, 13 (3): 207-215, 2003.
47. **Määttä M, Liakka A, Salo S, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, Autio-Harmainen H:** Differential expression of basement membrane components in lymphatic tissues. *J Histochem Cytochem*, 52 (8): 1073-1081, 2004.

- 48. ten Dam GB, Hafmans T, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH:** Differential expression of heparan sulfate domains in rat spleen. *J Histochem Cytochem*, 51 (6): 727-739, 2003.
- 49. Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L:** The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Semin Immunol*, 20 (1): 4-13, 2008.
- 50. Morohashi K, Tsuboi-Asai H, Matsushita S, Suda M, Nakashima M, Sasano H, Hataba Y, Li CL, Fukata J, Irie J, Watanabe T, Nagura H, Li E:** Structural and functional abnormalities in the spleen of an mFtz-F1 gene-disrupted mouse. *Blood*, 93 (5): 1586-94, 1999.
- 51. Howe CC:** Functional role of laminin carbohydrate. *Mol Cell Biol*, 4 (1): 1-7, 1984.
- 52. Tiganis T, Leaver DD, Ham K, Friedhuber A, Stewart P, Dziadek M:** Functional and morphological changes induced by tunicamycin in dividing and confluent endothelial cells. *Exp Cell Res*, 198 (2): 191-200, 1992.
- 53. Reed JC:** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157 (5): 1415-1430, 2000.
- 54. Raff MC:** Social controls of cell survival and cell death. *Nature*, 356 (6368): 397-400, 1992.
- 55. Vaux DL, Strasser A:** The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (6): 2239-2244, 1996.
- 56. Renehan AG, Booth C, Potten CS:** What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*, 322 (7301): 1536-1538, 2001.
- 57. Maag RS, Hicks SW, Machamer CE:** Death from within: apoptosis and the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 15 (14): 456-461, 2003.
- 58. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ:** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : A control point for apoptosis. *Sci*, 300 (5616): 135-139, 2003.
- 59. Nakagawa T, Yuan J:** Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, 150 (4): 887-94, 2000.
- 60. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J:** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403 (6765): 98-103, 2000.
- 61. Cheung HH, Lynn Kelly N, Liston P, Korneluk RG:** Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: A role for the IAPs. *Exp Cell Res*, 312 (12): 2347-2357, 2006.
- 62. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D:** Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 5 (5): 897-904, 2000.
- 63. Walker BK, Lei H, Krag SS:** A functional link between N-linked glycosylation and apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 250 (2): 264-270, 1998.
- 64. Yoshimi M, Sekiguchi T, Hara N, Nishimoto T:** Inhibition of N-linked glycosylation causes apoptosis in hamster BHK21 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 276 (3): 965-969, 2000.
- 65. Frisch SM, Francis H:** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124 (4): 619-626, 1994.
- 66. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennström S, Warne PH, Downward J:** Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J*, 16 (10): 2783-2793, 1997.
- 67. Frisch SM, Ruoslahti E:** Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, 9 (5): 701-706, 1997.
- 68. Miner JH, Yurchenco PD:** Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 255-284, 2004.
- 69. Vachon PH, Loechel F, Xu H, Wewer UM, Engvall E:** Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol*, 134 (6): 1483-1497, 1996.
- 70. Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z:** Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol*, 118 (5): 1271-1282, 1992.
- 71. Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ:** Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Sci*, 267 (5199): 891-893, 1995.
- 72. Jones PL, Boudreau N, Myers CA, Erickson HP, Bissell MJ:** Tenascin-C inhibits extracellular matrix-dependent gene expression in mammary epithelial cells. Localization of active regions using recombinant tenascin fragments. *J Cell Sci*, 108: 519-527, 1995.
- 73. Lund LR, Rømer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Danø K, Werb Z:** Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: Proteinase-independent and -dependent pathways. *Development*, 122 (1): 181-193, 1996.
- 74. Faraldo MM, Deugnier MA, Lukashev M, Thiery JP, Glukhova MA:** Perturbation of beta1-integrin function alters the development of murine mammary gland. *EMBO J*, 17 (8): 2139-2147, 1998.
- 75. Hansen RK, Bissell MJ:** Tissue architecture and breast cancer: The role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer*, 7 (2): 95-113, 2000.