



**İNSAN AKCİĞER EPİTEL HÜCRESİ VE AKCİĞER
KANSERİ HÜCRELERİNDE BORİK ASİDİN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNDEKİ
ROLÜ**

Furkan ELMAS

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Yüksek Lisans Tezi - 2023

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN AKCİĞER EPİTEL HÜCRESİ VE AKCİĞER KANSERİ
HÜCRELERİNDE BORİK ASİDİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ
ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

Furkan ELMAS

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2021-2712 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2023**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Ahmet KOÇ” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “İnsan Akciğer Epitel Hücreleri ve Akciğer Kanseri Hücrelerinde Borik Asidin Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerindeki Rolü” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

17/04/2023

Furkan ELMAS
İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.2. Akciğer Kanseri	6
2.2.1. Akciğer Kanseri Nedir?	6
2.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi	7
2.2.3. Akciğer Kanseri Teşhisi ve Tedavisi	9
2.2.4. Akciğer Kanseri Histolojisi ve Yayılımı	11
2.3. ER Stresi	14
2.3.1. Endoplazmik Retikulum Nedir?	14
2.3.2. Endoplazmik Retikulum Stresi	16
2.3.3. Protein Sentezi ve Katlanması	19
2.3.4. Protein Katlanması ve Hücrelerin Yanlış Katlanmaya (UPR) Tepkisi.....	20
2.3.5. Kanserde Katlanmamış Protein (UPR) Tepkisi	21
2.3.6. Tümör Hücresi Sağkalımında UPR nin Rolü	23
2.3.7. Tümör Hücresi Ölümünde UPR nin Rolü.....	26
2.3.8. ERAD (Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Protein Bozulması).....	28
2.3.9. PERK' in İşleyişi ve Etkinliği	33
2.3.10. ATF6 ' in İşleyişi ve Etkinliği	35
2.3.11. IRE1 – XBP1 ' in İşleyişi ve Etkinliği	37
2.3.12. ER Stresine Neden Olan Kimyasallar.....	39
2.3.13. ER Stresine Bağlı Bazı Hastalıklar	40
2.3.14. Araştırılacak ER Stresi İle İlişkili Genler	44
2.4. Bor Elementi Nedir?	48
2.4.1. Bor İle İlgili Toksikolojik Araştırmalar.....	49
2.4.2. Mikroorganizmaların Bor İhtiyacı	51
2.4.3. İnsan ve Hayvan Sağlığında Borun Yeri	51
2.4.4. Bor Alımı ve Taşıma Mekanizmaları	54
2.4.5. Bor ve Yara İyileşmesi	54

2.5. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)	55
2.5.1. PZR Tekniğinin Temel Bileşenleri	57
2.6. Western Blot Analizi	58
3. MATERYAL VE METOT	60
3.1. Materyal	61
3.1.1. Cihazlar ve Kimyasallar.....	61
3.2. Metot	62
3.2.1. DMEM Besiyeri ve Borik Asit Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	62
3.2.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Çözdürülmesi	63
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması	63
3.2.4. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı ve Canlılığının Belirlenmesi	64
3.2.5. Borik Asit Uygulaması ve Sitotoksite Analizleri (MTT).....	64
3.2.6. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	65
3.2.7. RT-PZR.....	66
3.2.8. Protein İzolasyonu ve Protein Miktarının Belirlenmesi	67
3.2.9. Western Blot (İmmünoblotlama)	69
4. BULGULAR.....	73
4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Morfolojik Güntüleri.....	73
4.2. Sitotoksite Analizleri (MTT).....	74
4.3. RNA İzolasyon Kontrolü	75
4.4. ER Stresi Yoluğında Yer Alan Genlerin(XBP1, PERK, MAOA, ATF6) mRNA İfadelemesi Analizleri.....	76
4.5. ER Stresi Yoluğında Yer Alan Genlerin (XBP1, PERK, MAOA, ATF6) Western Blot Analizleri.....	82
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR	91
EKLER.....	112
EK-1. Özgeçmiş.....	112
EK-2. Etik Kurul Kararı.....	112

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin boyunca bilgisinden ve deneyiminden faydalandığım, tez danışmanım olmasından dolayı derin bir sevinç duyduğum tez konusunun belirlenmesinden, laboratuvar işlemlerindeki işleyişinden tez yazımana kadar her konuda beni yönlendirerek yol gösteren sayın Prof Dr. Ahmet KOÇ'a, yüksek lisans eğitimin boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle kıymetli katkılar sağlayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın tüm saygıdeğer hocalarına,

Laboratuvarıda beraber çalıştığımız, deneyimin her aşamasında benden moral ve motivasyonlarını esirgemeyen tüm sevgili çalışma arkadaşlarım Bahar KIZILASLAN'a, Feyza YILMAZ DÜNDAR'a, Nefsun DANIŞ'a, Melike ALP'e, Nazmi ÖZGEN'e ve deneyimlerini ve desteğini benden esirgemeyen Arş. Gör. Muhammed DÜNDAR'a, ve

Hayatımın her anında desteklerini ve sonsuz sevgileri ile yanımda olduklarını hissettiren, zor zamanlarımda bana inanılmaz bir güç veren değerli aileme,

Çok teşekkür ederim...

Furkan ELMAS

ÖZET

İnsan Akciğer Epitel Hücreleri Ve Akciğer Kanseri Hücrelerinde Borik Asidin Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerindeki Rolü

Amaç: Araştırma Borik asit akciğer epitel hücreleri ve akciğer kanser hücreleri modellerinde ER stresi yolağını aktif hale getiriyor mu? Western Blot ve RT-qPCR tekniğinden yararlanılarak borik asitin ER stresi üzerindeki rolünün araştırılması, protein ve mRNA ifadenmesinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal Metod: Bu çalışmada A549 ve BEAS2B hücreleri model olarak kullanılmıştır. Bu doğrultuda, çalışma için uygun borik asit miktarı MTT analizleriyle tespit edilmiştir. Bu çalışmanın ardı sıra uygun koşullarda kültüre edilmiş hücelere borik asit uygulaması yapılarak RNA ve protein izolasyonları yapılarak RT-PZR ve Western Blot analiz testleri yapılmıştır.

Bulgular: ER stres yolağında rol alan genlerin (PERK, XBP1, MAOA, ATF6) gen ifadenmesi seviyeleri relatif kuantitatif analizler ve Student T testi yapılarak karşılaştırılmıştır. PERK, XBP1 genlerinde ER stresine bağlı UPR' ye cevap olarak borik asitin apoptozu tetiklediği (PERK $p_1=0.000488$ $p_2=0.000977$, XBP1 $p_1=0.000253$ $p_2=0.000506$) $p<0.05$ değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmışken, MAOA ve ATF6 strese bağlı aşırı gen ifadenmesi tesbit edilmemiş olup (MAOA $p_1=0.450321203$ $p_2=0.900642405$, ATF6 $p_1=0.496131$ $p_2=0.992261$) değerleri ile anlamlı fark saptanmadığı görülmüştür. İmmünblotlama analizlerinde de PERK, XBP1'de protein seviye analizlerinin kontrole oranladığında RT-PZR analiz sonuçlarını desteklediği görülmüştür. ATF6 ve MAOA için ise PZR sonuçlarına benzer anlamlı fark görülmemiştir. MAOA, RT-PZR analiz sonucuna nazaran immünblotlama analizinde anlamlı fark görülmüştür.

Sonuç: Analizler sonucunda, A549 ve BEAS2B hücrelerine borik asit muamelesi kontrole kıyasla ER stresini artırdığını buna bağlı olarak PERK, XBP1 ve MAOA anlamlı bir fark görülmüş olup ATF6 'da anlamlı fark görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: ATF6, Bor toksisitesi, Endoplazmik Retikulum(ER) stresi, Real Time qPCR, Western blot

ABSTRACT

The Role of Boric Acid on Endoplasmic Reticulum Stress in Human Lung Epithelial Cells and Lung Cancer Cells

Aim: Research Does boric acid activate the ER stress pathway in lung epithelial cells and lung cancer cell models? It is aimed to investigate the role of boric acid on ER stress and to determine protein and mRNA expression by using Western Blot and RT-qPCR technique.

Material and Method: A549 and BEAS2B cells were used as models in this study. In this direction, the amount of boric acid suitable for the study was determined by MTT analysis. Following this study, RNA and protein isolations were made by applying boric acid to cells cultured under appropriate conditions, and RT-PCR and Western Blot analysis tests were performed.

Results: Gene expression levels of genes involved in the ER stress pathway (PERK, XBP1, MAOA, ATF6) were compared by performing relative quantitative analyzes and Student's T test. In PERK, XBP1 genes, there was a statistically significant difference with $p < 0.05$ values in which boric acid triggered apoptosis in response to ER stress-induced UPR (PERK $p_1 = 0.000488$ $p_2 = 0.000977$, XBP1 $p_1 = 0.000253$ $p_2 = 0.000506$), while MAOA and ATF6 stress-induced excessive gene expression was not detected (MAOA $p_1 = 0.450321203$ $p_2 = 0.900642405$, ATF6 $p_1 = 0.496131$ $p_2 = 0.992261$). In immunoblotting analyzes, it was seen that protein level analyzes in PERK and XBP1 supported the results of RT-PCR analysis when compared to the control. There was no significant difference similar to PCR results for ATF6 and MAOA. A significant difference was observed in the immunoblotting analysis compared to the MAOA, RT-PCR analysis result.

Conclusion: As a result of the analyzes, boric acid treatment of A549 and BEAS2B cells increased ER stress compared to the control, accordingly, a significant difference was observed in PERK, XBP1 and MAOA, but no significant difference was observed in ATF6.

Key words: ATF6, Boron toxicity, Endoplasmic Reticulum(ER) stress, Real Time qPCR, Western blot

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADC	: Adenokarsinom
ADP	: Adenozin Difosfat
AHH	: Aril Hidrokarbon Hidroksilazin
APP	: Amiloid Öncü Protein
ASK1	: Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz-1
ATF4	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktör-4
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktör-6
ATP	: Adenozin Trifosfat
B.A	: Borik Asit
BAK	: BCL-2 Homoloğ Antagonisti
BCL	: B Hücreli Lenfoma
BİP	: İmmünoglobulin Bağlayan Faktör
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CFTR	: Kistik Fibröz Transmembran Regülatörü
CHOP	: C/EBP Homolog Protein
COSMIC	: Somatik Mutasyon Kanser Kataloğu
CpG	: Sitozin-Fosfat-Guanin Bölgeleri
CREB3L3	: Siklik AMP'ye Yanıt Veren Element Bağlayıcı Protein 3 Benzeri
CREBH	: Yanıt Bağlayıcı Protein H
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dsRNA	: Çift Zincirli RNA (Double Stranded RNA)
DUB	: Sudan Arındırıcı Enzim
E1	: Ubikutin Aktive Edici Enzim-1
E2	: Ubikutin Konjuge Edici Enzim-2
E3	: Ubikutin Ligaz Enzim-3
ECM	: Hücre Dışı Matris
EDEM1	: ER Bozunmasını Artıran Mannosidaz Benzeri Protein
EIF2α	: Ökaryotik Başlama Faktörü -2 α
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş

ER	: Endoplazmik Reticulum
ERAD	: ER ile İlişkili Bozunma
ERO1	: Oksidoredüktin-1
ERSE	: Stres Yanıt Elemanı
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
FBS	: Fetal Bovin Serum
GCN2	: Amino Asit Sentezi Genel Kontrol-2
GLS	: Golgi Lokalizasyon Sinyali
GRP78	: 78 kDa Glukozla Düzenlenen Protein
GRP94	: 94 kDa Glukozla Düzenlenen Protein
HIF1α	: Hipoksi İndüklenebilir Faktör -1 α
HMG-CoA	: 3-Hidroksi-3-Metilglutaril-Koenzim
Hsp70	: Isı Şoku Proteini
IDDM	: İnsülin Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus
Ig	: İmmünoglobulin
IP3R	: İnositol Trifosfat Reseptörü
IRE1	: İnositol Gerektiren Enzim-1
JNK	: Jun N Terminal Kinaz
LCLC	: Büyük Hücreli Akciğer Karsinom
LZIP	: Temel Lözün Fermuar Protein
MAOA	: Monoamin Oksidaz A
MEF	: Fare Embriyonik Fibroblastlar
miRNA	: Mikro Ribo Nükleik Asit
MM	: Multipl Miyelomda
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NF-Y	: Nükleer Faktör Y
NSLC	: Küçük Hücreli Olmayan Karsinom
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PBS	: Fosfat Tuzu Tampon
PDI	: Protein Disülfid İzomeraz
PERK	: ER Kinaz ile İlişkili
PKR	: Bağımlı Protein Kinaz
pre-mRNA	: Primer Transkript Mesajcı RNA
PVDF	: Poliviniliden Diflorid

RER	: Pürüzlü ER
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RyR	: Riyanodin Reseptörü
SCLC	: Küçük Hücreli Karsonim
SEAP	: Salgılanan Alkalın Fosfataz
SER	: Pürüzsüz Endoplazmik Reticulum
SERCA	: Sarkoendoplazmik Reticulum
ShRNA	: Short Hairpin RNA (Kısa Saç Tokası RNA)
SIP	: Site 1 Proteaz
SqCC	: Skuamöz Hücreli Karsinom
SREBP	: Sterol Yanıt Elementi Bağlayıcı Protein
SRP	: Sinyal Tanıma Partikülü
TCR	: T-Hücre Reseptörü
ThT	: Thioflavin
TSG	: Tümör Baskılayıcı Gen
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı
UPRE	: Katlanmamış Protein Yanıt Elemanı
UPS	: Ubikuitin-Proteazom Sistemi
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
XPB1	: X-Box Bağlayıcı Protein-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Hücre döngüsü kontrol noktaları	4
Şekil 2.2. Akciğer kanseri yapısal görünümü	7
Şekil 2.3. Akciğer kanserinden alınan sürüntü örneğinin sitolojik incelenmesinde asbestos parçacıkları ve ayrıca neoplastik hücreler görülmektedir	8
Şekil 2.4. Akciğer kanseri tanısı almış hastada akciğerin görünümü.	9
Şekil 2.5. Bir adenokarsinom (ADC) ve skuamöz hücreli karsinom (SqCC) örneği.	13
Şekil 2.6. NSCLC'de ana moleküler hedeflerin göreceli frekansının temsili	14
Şekil 2.7. Endoplazmik Retikulum organelinin genel yapısı	15
Şekil 2.8. Endoplazmik Retikulum stres akışının şematize edilmesi	17
Şekil 2.9. Endoplazmik retikulum ilişkili bozunmadaki (ERAD) adımlar.....	28
Şekil 2.10. (A) PERK yolunun aktivasyonu.....	34
Şekil 2.11. (B) ATF4 ifadesinin düzenlenmesi.	35
Şekil 2.12. RIP tarafından düzenlenen moleküller.	37
Şekil 2.13. Bazı bor bileşikleri	49
Şekil 2.14. Borun sağlığını etkileri	52
Şekil 2.15. Borun en fazla bulunduğu gıdalar	55
Şekil 2.16. Western blot testinin iş akışı	59
Şekil 3.1. Deneysel Çalışma İş Akış Planı	60
Şekil 3.2. Sitotokside MTT uygulaması	65
Şekil 3.3. BCA ile protein konsantrasyon tayini	68
Şekil 3.4. Yarı-kuru emdirim yöntemiyle proteinlerin jelden membrana aktarılması....	71
Şekil 3.5. Western blot yönteminin bloklama, birincil ve ikincil antikorlar ile işaretlenmesi	72
Şekil 4.1. BEAS2B hücreleri 4X	73
Şekil 4.2. A549 hücreleri 4X	73
Şekil 4.3. A549 hücre hattının MTT grafiği.....	74
Şekil 4.4. BEAS2B hücre hattının MTT grafiği	75
Şekil 4.5. İzole edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü	76
Şekil 4.6. Katlanmamış Protein Yanıt Sinyali Aktivatörü Borik asit tarafından ER Stres Sinyalinin Yapısı ve Moleküler Mekanizması.....	76

Şekil 4.7. ER stresine bağlı PERK geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği.....	79
Şekil 4.8. ER stresine bağlı XBP1geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği.....	80
Şekil 4.9. ER stresine bağlı Beta Aktin geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği.....	80
Şekil 4.10. ER stresine bağlı ATF6 geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği.....	81
Şekil 4.11. ER stresine bağlı MAOA geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği.....	81
Şekil 4.12. RT-PZR sonucu genlere ve hücre hatlarına göre Relatif Kuantitatif analizleri grafiği	82
Şekil 4.13. Western Blot analizi sonucu protein ekspresyonu miktarı grafiği	83
Şekil 4.14. Western Blot analizi sonucu protein ekspresyonu miktarı grafiği	84

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Deney aşamalarında kullanılan cihazlar	61
Tablo 3.2. Deney aşamalarında kullanılan kimyasallar	62
Tablo 3.3. Deney aşamalarında kullanılan kitler	62
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri	63
Tablo 3.5. cDNA sentez reaksiyon mix değerleri	66
Tablo 3.6. RT-PZR için sıcaklık optimizasyonu.....	66
Tablo 3.7. Genlerin bağlanma bölgelerine göre spesifik primerleri	66
Tablo 3.8. RT-PZR reaksiyon konsantrasyonları.....	67
Tablo 3.9. RT-PZR reaksiyonu döngü koşulları	67
Tablo 3.10. RIPA Modified Lysis Buffer hazırlama protokolü	68
Tablo 3.11. Protein konsantrasyon değerleri.....	69
Tablo 3.12. Western Blotta kullanılan antikorlar	69
Tablo 3.13. Western Blot jel hazırlama temel bileşenleri	70
Tablo 4.1. A549 hücre hattının MTT Sonuçlarının kontrole göre IC50 değeri	74
Tablo 4.2. BEAS2B hücre hattının MTT Sonuçlarının kontrole göre IC50 değeri	75
Tablo 4.3. Hücre Kültüründen elde edilen RNA Konsantrasyonları (ng/ µl) değerleri	75
Tablo 4.4. Tanımlayıcı İstatistiksel Veriler	77
Tablo 4.5. A549 ve BEAS2B Hücrelerinde, Borik Asit Muamelesi Yapılan İle Yapılmayan Kontrol Hücreleri Arasındaki Farklılık, Ortalama, Varyans ve Kat Yoğunluk p Değerleri (Gruplar arasındaki istatistiksel p değerleri, Student's T testi ile elde edilmiştir).	78
Tablo 4.6. Hücre Kültüründe İnkübatörde Uygulanan Süre, Sıcaklık ve Borik Asit Konsantrasyon Tablosu.....	79

1. GİRİŞ

Endoplazmik retikulum (ER) ilk olarak tavuk fibroblast benzeri hücrelerde elektron mikroskobu kullanılarak görüntülenen ve sitoplazma boyunca uzanan narin bir yapı olarak tanımlanan hücresel bir organel olmakla birlikte Endoplazmik Retikulum hücredeki en büyük organeldir (1). Aynı sıra protein sentezi ve taşınması, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanmasının ana bölgesidir (2, 3). Bu organelin çok işlevli doğası vardır. Ökaryotik hücrelerde salgı yolunun (ER-Golgi-lizozom) ilk bölmesidir. ER, nükleer zarfa uzanan sitoplazmanın büyük bir bölümünü kaplayan uzun tübüller ve düzleştirilmiş disklerden oluşan bir ağ oluşturur (4, 5). Proteinler, benzersiz fiziksel yapılar ve hücre içi ortamdaki değişikliklerle koordinasyon ve bunlara tepki olarak çeşitli sistemlerden yapılan çalışmalar, ER'nin her biri belirli bir işlev veya işlevlerle ilişkili olan çok sayıda farklı yapısal etki alanından oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. ER'nin ana işlevlerinden biri, salgılanan ve integral membran proteinleri (6, 7) için protein sentezi için bir bölge ve proteinlerin bir alt sistemi olarak görev almaktadır. (2).

Protein, hidrofobik kalıntıların bir uzantısı veya stop-transfer membran çapa dizisinin varlığı ile belirlenen bir integral membran proteini olacaksa, translokasyon duraklayacaktır (8, 9). Öte yandan, proteinleri düzgün bir şekilde katlamaya adanmış birkaç protein ve kompleksle bile, proteinlerin bir kısmı doğal ve fonksiyonel forma ulaşamaz veya yanlış katlanır ya da kümelenir (10). Bu proteinler ya ER'de kalabilir ya da proteazomun aracılık ettiği ER ile ilişkili bozunma (ERAD) yoluna girebilir, bu da anormal polipeptitlerin yanlışlıkla salgı yoluna girmemesini sağlar (11). Yanlış katlanmış proteinlerin tanınması ve ardından bu agregatların ERAD yolu yoluyla temizlenmesi, hücresel işlevi etkilememek için sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir (12). Ek olarak, diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve çeşitli kanserlerde ER stres yanıt yolunun aktivasyonu gözlenir. ER stres yanıt yollarının bu patolojilerde nasıl bir rol oynadığı aktif bir araştırma alanıdır ve stres yanıt yollarının çeşitli bileşenleri potansiyel terapötik hedefler olarak araştırılmaktadır (13). Katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin üst üste kümelenmesi sonucu meydana gelen ER stresi, kanserli hücre üremesi ve yaşamı üzerinde bir tesire sahiptir. Tümör mikroçevresi ER fonksiyonlarında birtakım karışıklığa yol açabilir. Hipoksi, besin yetersizliği ve düzensiz pH durumunda

ER lümeninde hatalı katlanmış veya katlanamamış proteinlerin kümelenmesi sonucu UPR aktivasyonunun yükselttiği bilinmektedir (14).

ER stresi ve/veya UPR'nin aktivasyonu, nörodejeneratif bozukluklar (Alzheimer, Parkinson), diabetes mellitus, obezite, kanser ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere çeşitli insan patolojilerinin gelişiminde rol oynamıştır (15). Bu nedenle, ER stresi ve UPR aktivasyonunun göstergesi olan faktörlerin, hastalık gelişimi veya ilerlemesinin tanısal belirteçleri olarak hareket etmesi mümkündür. Ayrıca, ER stresi hastalık patogeneğinde nedensel bir rol oynuyorsa, bu yol terapötik müdahale için hedefler içerebilir. ER stresi, endojen UPR'nin çeşitli bileşenlerinin aktivasyonu yukarı regülasyonu izlenerek dolaylı olarak ölçülebilir. Tipik olarak bu, sırasıyla UPR mRNA ve protein seviyelerindeki değişiklikleri saptamak için RT-qPCR veya immüno blotlama tekniklerinin kullanılmasını içerir (16). Bu stratejinin avantajı, yöntemlerin iyi kurulmuş olması, gerekli moleküler araçların hazır olması ve doğru bir şekilde gerçekleştirilip analiz edildiğinde sonuçların ER stresinin doğru ve tutarlı göstergeleri olmasıdır. Bununla birlikte, bu prosedürler doğada geriye dönüktür, çünkü ER stres belirteçleri, hücreler toplandıktan saatler sonra ölçülür. Ek olarak, bu yöntemler UPR'nin belirli bileşenlerinin ölçümü yoluyla ER stresini dolaylı olarak değerlendirir. Son olarak, çoklu UPR gen ürünleri izlenmelidir, çünkü ER stresinden bağımsız diğer yollar, bireysel UPR genlerinin ekspresyonunu etkileyebilir (16).

UPR aktivasyonunu tespit etmek için alternatif sistemler geliştirildi ilgililenilen hücrelere yerleştirilen ekzojen sensörler kullanılarak. Bunlar, salgılanan alkalın fosfatı (SEAP), XBP-1 venüs füzyon yapılarını ve XBP-1 veya ATF6 bağlanma bölgelerini içeren haberci yapıları içerir (17). SEAP ve XBP-1-venüs sistemlerinin in vivo ve kültürlenmiş hücrelerde çalıştığı gösterilmiştir. ER stresinin, şu anda mevcut olan ER stresi UPR algılama sistemlerinin sınırlamaları ile birlikte birkaç önemli hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde rolünün giderek daha fazla artması, yanlış katlanmış proteinleri hızlı bir şekilde tespit etmek ve ölçmek için daha çok yönlü bir tekniğe olan ihtiyacın temelini oluşturmaktadır. Thioflavin T (ThT), protein agregatlarına, özellikle β -tabakalarına seçici olarak bağlandığı gösterilen floresans özelliklerine sahip küçük bir molekül olduğu ileri sürülmektedir (18).

Borun doğal formu olan boratlar, dünya topraklarında ve okyanus suyunda yüksek konsantrasyonlarda bulunur (19). Borik asitin biyolojik sistemlerdeki rolü, çalışılması en zor elementlerden biri olmuştur. Borat esterlerinin, ramnogalakattanuran II'nin polisakkarit zincirlerini bağladığı, böylece hücre uzaması sırasında oluşan aşırı

hidrostatik basınçlara karşı hücre duvarlarını güçlendirdiği gösterilmiştir (20). Birkaç ay boyunca yürütülen insan çalışmaları, bor eksikliğinin birincil semptomu olarak bilişsel işlevdeki eksiklikleri tanımladı (21). Borik asitin prostat kanseri modellerinde yapılan çalışmalarında farelerde insan prostat tümörü implantlarının büyüme oranlarını ve kültürlenmiş prostat kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu nu apoptozu indüklemeyen doza bağlı bir şekilde azalttığını göstermiştir (22).

Bu çalışma kapsamında, literatür bilgileri doğrultusunda akciğer epitel hücreleri ve akciğer kanseri hücre modellerinde borik asit toksisitesine bağlı hücresel stres cevapları ya da biyolojik etki mekanizmalarının araştırılarak ve ER stresi yanıt yollarında görev alan bazı genlerin, proteinlerin ve mRNA'ların ifadenmesi araştırılarak ortaya konulacaktır.

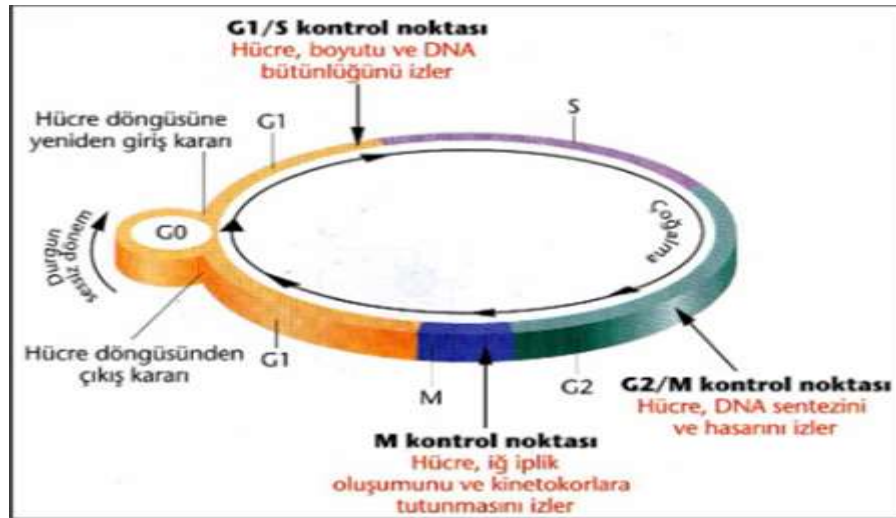


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Sağlıklı hücre, canlının temel yapısı olarak düzenli şekilde çoğalır, bölünür, yaşlanır ve ölür. Fakat kanserli hücreler düzensiz bir şekilde devamlı büyür, devamlı bölünür ve ölmez. Sağlıklı hücre ve kanser hücresi arasındaki fark bu şekilde açıklanabilir fakat değişikliği biyolojik olarak açıklamak daha karmaşık olacaktır. Bunun sebebi sağlıklı bir hücreden kanserli hücrenin ortaya çıkışında birçok etki mekanizması mevcuttur. (23).

Bu mekanizmaların bir bölümü henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Öngörülen mekanizmalardan kısaca bahsedebilmek için ilk olarak normal bir hücrenin yaşamsal döngüsüne göz atmak gerekmektedir: Hücrenin normal yaşam döngüsü (hücre siklusu) genel olarak dinlenme ve bölünme dönemi olarak ikiye ayrılır. Dinlenme dönemi, normal yaşamsal faaliyetlerin devam ettiği ve bölünmeye göre daha uzun bir dönemdir; bu dönem G0 fazı olarak da adlandırılır. Bölünme dönemi ise mitoz'a hazırlıkların yapıldığı G1, S, G2 fazları ile mitoz'un gerçekleştiği M fazından oluşur. Kısaca, G1 fazında DNA replikasyonunda (eşlemesinde) kullanılacak olan RNA ve proteinlerin üretimi yapılır, S fazında DNA replikasyonuna başlanacak bölgeler işaretlenir ve DNA eşlenir (yani diploid hale gelir), G2 fazı ise mitoz'a son hazırlıkların yapıldığı dönemdir. Son olarak, M fazı hücrenin tamamen iki eş hücre haline geldiği mitoz bölünme aşamasıdır (24).



Şekil 2.1. Hücre döngüsü kontrol noktaları (25)

Bu dönemlerin başlaması, zamanlaması ve tüm bu işlevlerin hatasız olarak yürütülmesi çok sayıda kontrol görevi üstlenmiş proteinin mükemmel uyumu ile sağlanır.

Bu sırada ara ara ortaya çıkabilen aksaklıklar hemen başka proteinler tarafından düzeltilir ve sistem hatasız olarak yürütülmeye çalışılır. Bu kontrol proteinlerinin sentezi bazı genlerle düzenlenmiştir ki, bunlar protoonkogenler, tümör baskılayıcı genlerdir(TSG; tumor supressor gene). Normalde protoonkogenler ve TSG'lerin aktiviteleri denge halindedir. Bu dengenin protoonkogenler yönüne bozulması kansere engel olan bazı proteinlerin sentezinin azalmasına ve kanser gelişimine neden olabilir. Buna göre, çeşitli mutasyonların, yani çeşitli etmenlerle DNA zincirinde bozulmaların meydana gelerek bu dengeyi bozduğu düşünülmektedir. Başka bir görüşe göre ise, çeşitli epigenetik modifikasyonlar yoluyla bazı TSG gen gruplarının susması bu dengeyi bozabilmektedir (26).

Bu noktada iki önemli kavramdan, yani telomeraz aktivitesi ve apoptozisden bahsetmek yerinde olur. Telomerler normalde kromozomların uç bölgelerinde bulunan ve her mitoz sırasında kesilerek kısaltılan kromozoma ait yapılardır. Telomerler hücre yaşam sürecindeki bölünmeler esnasında gittikçe yani yaşlandıkça kısalır ve bunun sonucunda hücre ölüme doğru gider. Ancak genelde kanser hücresinin bir özelliği olarak ön plana çıkan artmış telomeraz enzim aktivitesi telomerlerin kısalan parçalarını tamamlama özelliğine sahiptir. Bu şekilde, kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinin yüksek olması nedeniyle bölünme miktarı sınırlandırılmaz (27).

Kanserde hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasında bir denge kaybı vardır ve ölmesi gereken hücreler bu sinyalleri alamazlar. Sorun, apoptoz yolundaki herhangi bir adımda ortaya çıkabilir. Bir örnek, bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün aşağı regülasyonudur, bu da apoptozun azalmasına ve tümör büyümesinin ve gelişiminin artmasına neden olur (28) ve mekanizmadan bağımsız olarak p53'ün etkisizleştirilmesi birçok insan kanseriyle ilişkilendirilmiştir (29, 30).

Bir diğer kavram olan apoptozis ise kısaca hücre intiharı veya kontrollü (programlanmış) hücre ölümü olarak adlandırılır. Kaba bir benzetme ile apoptozis adeta normal vücut hücresinin fizyolojik işleyiş ve süreci değiştirmesin diye alınmış bir tedbir gibidir ve bu şekilde hücre anarşisi, yani kanser hücresi oluşumu engellenmiştir (31). Bununla birlikte, iki ucu keskin bir kılıç olan apoptoz, sorunun çözümü olduğu kadar sorunun da nedeni olabilir, çünkü artık birçok kişi apoptozun çeşitli yönlerini hedef alan

yeni ilaçlar arayışına girmiştir (32, 33). Bu nedenle, apoptoz hem karsinogeneizde hem de kanser tedavisinde önemli bir rol oynar.

Bir diğer hususta yaş, kanser için en güçlü demografik risk faktörüdür ve yaşlanma üzerine moleküler değişikliklerin malign transformasyonu tetiklediğini gösterir. Somatik mutasyonlar genellikle tümörü başlatan olaylar olarak kabul edilir (34, 35).

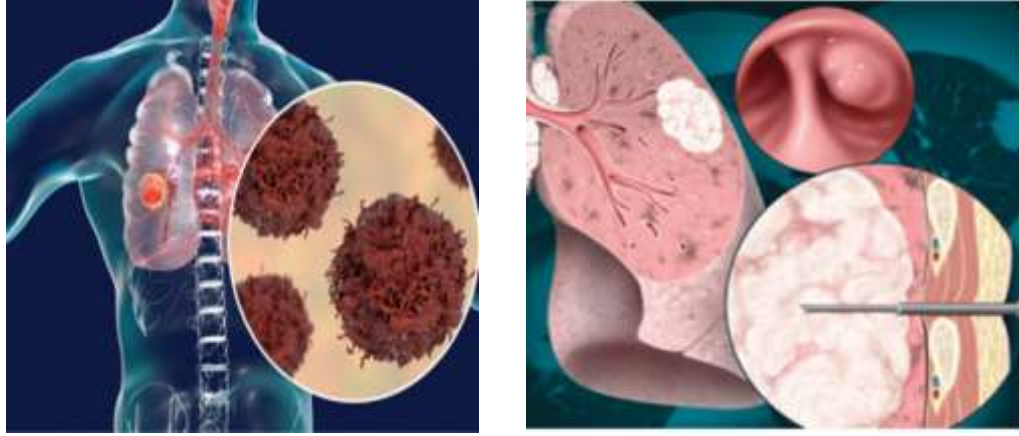
Bununla birlikte, yaşlanmaya aynı zamanda anormal kromatin konformasyonuna ve stabilitesine de katkıda bulunabilen spesifik epigenetik modifikasyonlar eşlik eder (36, 37). Bu tür epigenetik modifikasyonlar, bir CpG dinükleotit bağlamında metil gruplarının sitozinlere eklenmesine veya çıkarılmasına benzeyen DNA metilasyon (DNAm) değişikliklerinde özellikle gözlenir. Aslında, birkaç CpG yaşlanma üzerine neredeyse lineer hipermetilasyon veya hipometilasyon elde eder ve dolayısıyla lineer tek değişkenli veya çok değişkenli modeller kronolojik yaşı tahmin etmek için kullanılabilir (38, 39).

Kanser epigenomu, tüm genom boyunca eş zamanlı DNAm kazanımları ve kayıpları ile karakterize edilir (40). Kanser, potansiyel olarak en önlenabilir ve tedavi edilebilir kronik hastalıklar arasında yer almasına rağmen, yalnızca 2005 yılında kanser nedeniyle yaklaşık 7 milyon yaşam kaybedilecek (41).

2.2. Akciğer Kanseri

2.2.1. Akciğer Kanseri Nedir?

Akciğer kanseri, klinik önemi olan çeşitli histolojik ve moleküler tiplerden oluşan karmaşık bir hastalıktır. Büyük ölçekli moleküler profillemenin ortaya çıkışı, belirli akciğer kanseri hastalarının tedavisine uygulanabilecek yeni moleküler hedefleri belirlemeye ve akciğer kanserinin patolojik sınıflandırmasını yeniden şekillendirmeye yardımcı olmuştur. Yeni yönler, kanser tedavisi için yeni fırsatlara kapı açan ve aynı zamanda akciğer kanseri de dahil olmak üzere çok sayıda tümörün sınıflandırmasını yeniden tanımlayan immünoterapi devrimini içerir. Son zamanlarda insidans ve ölüm oranındaki düşüşe rağmen, akciğer kanseri, 2015 yılında tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %27'sini temsil eden 158.040 ölümlle gerçekleşmesi beklenen ABD'de ölümlerin ilk sebeplerindendir (42).



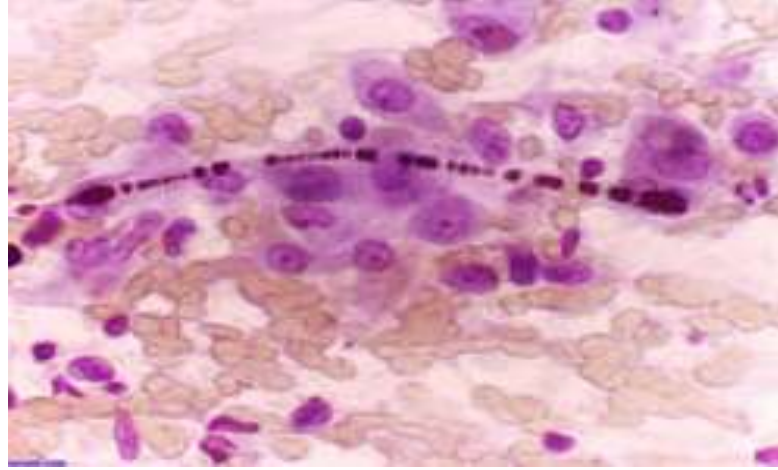
Şekil 2.2. Akciğer kanseri yapısal görünümü (43)

Akciğer kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. 2006'da hastalık 158.000'den fazla ölüme neden oldu - kolorektal, meme ve prostat kanserlerinin toplamından daha fazladır (44). Amerika Birleşik Devletleri'nde erkekler arasında ölüm oranları düşmeye başlasa da, son zamanlarda kadınlarda ölümcül kanserin en yaygın kaynağı olarak akciğer memeyi geride bıraktı (45). Yetişkinlerin dörtte biri sigara içtiği için akciğer kanseri bir sorun olmaya devam edecek (45) Akciğer kanseri tedavisindeki ilerlemelere rağmen, ortalama beş yıllık sağkalım oranı yalnızca yüzde 15'tir (46).

Ana histotip, prognostik ve terapötik çıkarımlara göre, akciğer kanserleri iki ana gruba ayrılır: küçük hücreli karsinom (SCLC, vakaların %13'ü) ve küçük hücreli olmayan karsinom (NSCLC, vakaların %83'ü) oluşturmaktadır (42, 47). Adenokarsinom, akciğer karsinomunun en yaygın histolojik tipi olarak skuamöz hücreli karsinomu geride bırakmıştır ve erken metastaz giderek yaygınlaşmaktadır (48, 49).

2.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanserinin bir medeniyet hastalığı olduğu çok açık. Akciğer tümörlerinin insidansı, nüfus yoğunluğu, kentleşme, sanayileşme ve sigara içme ile ilişkilidir (50). Tüm akciğer kanserlerinin etiyolojisinde şüphesiz ki en önemli faktör kanserojen etkenlerdir. Asbest, nikel, uranyum, kromatlar ve diğer radyoaktif mineraller bilinen akciğer kanserojenleridir. Arsenik ve berilyum, akciğer kanserine neden olabilen ilave mesleki faktörlerdir (51). Ancak tütün, akciğer kanserinde en sık görülen önemli kanserojendir. Tüm ülkelerde akciğer kanseri insidansındaki artış, sigara içmedeki artışı takip eder (52).



Şekil 2.3. Akciğer kanserinden alınan sürüntü örneğinin sitolojik incelenmesinde asbestos parçacıkları ve ayrıca neoplastik hücreler görülmektedir (71).

Philadelphia Pulmoner Neoplazm Projesi ve Güney Londra Çalışması gibi geniş popülasyon araştırmalarında, tüm yeni akciğer kanseri vakaları sigara içenlerde meydana geldi (53, 54). Akciğer kanseri gelişimi, sigara içmeye bağlı doz ve zamanla ilişkilidir (55). Sigaranın bırakılmasının ardından bronşiyal epitelyum normale döner ve yaklaşık 13 yıl sonra akciğer kanseri riski sigara içmeyenlerle aynı hale gelir. Sigara içimi ile asbest ve uranyum gibi diğer bazı kanserojen etkenler arasında bir sinerji vardır (56). Sigarayı önlemek, günümüzde akciğer kanserini önlemenin tek yoludur. Sigara dahil olmak üzere kanserojen etkenlere maruz kalan bireylerin yalnızca küçük bir yüzdesi akciğer kanseri geliştirdiğinden, çevresel zarara bireysel konakçı tepkisi kesinlikle önemli bir rol oynar. Literatürdeki veriler, bazı konak faktörlerinin, muhtemelen solunum yolu onkojenlerine duyarlılığı artırarak, akciğer kanserine zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir. Örneğin A vitamini eksikliğinin böyle bir etkisi vardır (57).



Şekil 2.4. Akciğer kanseri tanısı almış hastada akciğerin görünümü. Üst lobdaki beyaz bölge kanserleşmiş dokuyu, siyahlaşmış kısımlarsa hastanın sigara kullandığını göstermektedir (71).

Bazı çalışmalar, akciğer kanserine yatkınlığın kalıtsal olduğunu ve ailesel kümelenmenin rapor edildiğini göstermektedir (58). Akciğer kanserli hastalarda, kimyasal kanserojenler metabolizmasında yer alan ve genetik kontrol altında indüklenebilir, zara bağlı bir enzim olan aril hidrokarbon hidroksilazın (AHH) daha yüksek seviyeleri bulunmuştur (59). İlerlemiş akciğer kanseri olan hastalarda hücre aracılı bağışıklığın iyi bilinen belirgin depresyonunun yanı sıra, erken kanser hastalarında hücre aracılı bağışıklık yanıtında azalma da tanımlanmıştır. Kanser öncesi bağışıklık eksikliklerinin akciğer kanseri gelişiminde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Bu ilişkiden primer hücrel immün yetmezlik, immün sürveyansın geçici başarısızlığı veya tütündeki immün baskılayıcılarla uzun süreli temasın sorumlu olup olmadığı açık değildir (60). Tüberküloz, pulmoner fibroz, plevral hastalıklar, eski infarktlar, bronşektazi ve kronik bronşit ve akciğer kanseri gibi önceden var olan, habisi olmayan akciğer anormallikleri arasındaki ilişki birçok klinisyen tarafından tanımlanmıştır (61).

2.2.3. Akciğer Kanseri Teşhisi ve Tedavisi

Teşhisi

Doktorlara doğru doku tanısı almalarında yardımcı olacak çeşitli teknikler vardır. En uygun testin seçilmesi genellikle bir göğüs hastalıkları uzmanı, girişimsel radyolog veya göğüs cerrahisi ile konsültasyonu gerektirir. Cerrahi aday olan hücreli

karsinomlarda, torakotomi doku teşhisi ve evreleme için önerilen testtir. Küçük hücreli veya metastatik küçük hücreli dışı karsinom olduğu varsayılan hastalarda, tanı mevcut olan en uygun ve en az invaziv yöntem kullanılarak yapılmalıdır (örn. bir plevral efüzyonun torasentezi, erişilebilir bir düğümün eksizyonel biyopsisi, bronkoskopi, transtorasik iğne aspirasyonu) (62).

Balgam sitolojisi, fleksibl bronkoskopi ve transtorasik iğne aspirasyonu gibi kanserin türü ve evresi daha az net olduğunda çeşitli seçenekler mevcuttur. Merkezi tümörü olan hastalarda fleksibl bronkoskopi (bronş yıkama, fırçalama ve biyopsilerin kullanıldığı) sıklıkla tercih edilen testtir ve bu hastalarda kombine duyarlılık yüzde 88'dir. Floroskopik ve bilgisayarlı tomografi (BT) kılavuzluğunda transbronşiyal iğne aspirasyonu eklenmesine rağmen, periferik tümörü olan hastalarda bronkoskopinin duyarlılığı yüzde 70'e, hatta çapı 2 cm'den küçük tümörü olan hastalarda daha da düşmektedir (63).

Pnömotoraks ve kanama, transbronşiyal iğne aspirasyonunun ciddi fakat nadir görülen komplikasyonlarıdır (64). Periferik akciğer tümörü olan hastalarda transtorasik iğne aspirasyonunun bronkoskopiden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir ve transbronşiyal iğne aspirasyonu sonuçsuz kaldığında veya cerrahi aday olmayan hastalarda kullanılabilir (63). Transtorasik iğne aspirasyonu rutin olarak floroskopi veya BT ile yönlendirilir ve bir sitopatoloğun yardımı tanısal verimi artırır. Transtorasik iğne aspirasyonunun en yaygın komplikasyonu pnömotorakstır (%25-30), ancak işlem nadiren göğüs tüpü takılmasını gerektirir (64). Video yardımcı torakoskopi, küçük periferik tümörleri (çapı 2 cm'den küçük), plevral tümörleri veya plevral efüzyonları teşhis veya evreleme amacıyla örneklemek için kullanılabilen daha yeni bir yöntemdir (65).

Tedavisi

Tedavi, kanserin histolojik tipine, başvuru evresine ve hastanın fonksiyonel değerlendirmesine göre farklılık gösterir (66). Evre I ila IIIA küçük hücreli dışı karsinomlu hastalarda tercih edilen tedavi cerrahidir (67). Son veriler, preoperatif kemoterapinin küçük hücreli dışı karsinomlu hastalarda sağkalımı iyileştirdiğini göstermektedir (68).

Tam rezeksiyon uygulanan ve preoperatif kemoterapi uygulanmayan hastalarda adjuvan kemoterapi standarttır. Randomize kontrollü klinik araştırmalar, ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası adjuvan tedavi konusunu ele almalıdır (68).

Rezeke edilemeyen (çıkarılamayan) küçük hücreli dışı karsinomun tedavisi radyoterapi ve kemoterapiyi içerebilir. Hedefe yönelik tedavilerin, özellikle antivasküler endotel büyüme faktörü ajanı bevacizumab'ın (Avastin) rolü, ileri evre (IIIB ve IV) skuamöz olmayan karsinomlu hastalarda incelenmiştir. Kemoterapi ile kombine edilen Bevacizumab, tek başına kemoterapiye kıyasla sağkalımı artırdı (69)Kemoterapi (sınırlı evre hastalıkta radyoterapi ile birlikte) küçük hücreli karsinom tedavisinin temel dayanağıdır (67). Palyatif ve darülaceze bakımı önemli yaşam sonu tedavi modaliteleridir. Birinci basamak hekimi, hastaların hangi seçeneklerin en uygun olabileceğini belirlemesine yardımcı olabilir.

2.2.4. Akciğer Kanseri Histolojisi ve Yayılımı

Teşhis ve tanıda belirlenebilirlik için morfolojik olarak küçük hücreli karsinom veya küçük hücreli olmayan karsinom (NSCLC) olarak sınıflandırılır. Işık mikroskobu akciğer kanserini dört majör ve birkaç minör histolojik sınıfa ayırmak için kullanılır (70). Başlıca histolojik sınıflar adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, küçük hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur.

NSCLC'nin Histolojik Sınıflandırması

Günümüze kadar, akciğer kanseri tanısında altın standart prosedür, histolojik veya sitolojik örneklerin bir patolog tarafından mikroskop altında mikroskopik olarak değerlendirilmesidir (72). Biyopsi veya sitoloji örneği, morfolojik ve immünohistokimyasal (IHC) özelliklere dayalı olarak bir tümörün varlığının ve histotipinin doğrulanması da dahil olmak üzere klinik açıdan önemli ilk bilgileri sağlar (73).

Geçmişte, klinik tanının ana odak noktası, NSCLC tümörlerini daha fazla sınıflandırmak için majör terapötik endikasyonlar olmadan, SCLC ve NSCLC arasında ayırım yapmaktı. Bununla birlikte, moleküler profil oluşturma ve hedefe yönelik tedavinin ortaya çıkışı, NSCLC'yi adenokarsinom (ADC) ve varyantları, skuamöz hücreli karsinom (SqCC) ve büyük hücreli akciğer karsinomu (LCLC) olarak daha fazla sınıflandırmaya yönelik ilgiyi yeniden canlandırdı (74, 75).Tükürük bezi tipi tümörler, sarkomatoid karsinomlar ve diğerleri dahil olmak üzere diğer tipler, toplam NSCLC vakalarının çok küçük bir bölümünü temsil eder. NSCLC tanısındaki ilk adım, tümörün morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesine dayanan histolojik sınıflandırma ve ardından yardımcı IHC metodolojileridir. Küçük biyopsilerde, histolojik özellikler ve

IHC fenotipi NSCLC alt tipi için kesin olmadığında, "başka türlü tanımlanmamış" (NSCLC-NOS) terimi kullanılır (75).

Adenokarsinom (ADC)

ADC, NSCLC'nin çoğunluğunu temsil eder ve tüm akciğer kanseri vakalarının %38.5'ini oluşturur (76). ADC, muskarmin gibi müsin boyaması ile tespit edilebilen müsin üretimi veya napsin A veya tiroid transkripsiyon faktörü 1 (TTF1) gibi pnömosit belirteç ekspresyonu gösterebilen glandüler farklılaşmaya sahip malign bir epitelyal tümör olarak tanımlanır (77). Genel olarak, ADC akciğerin periferinde bulunur (78, 79).

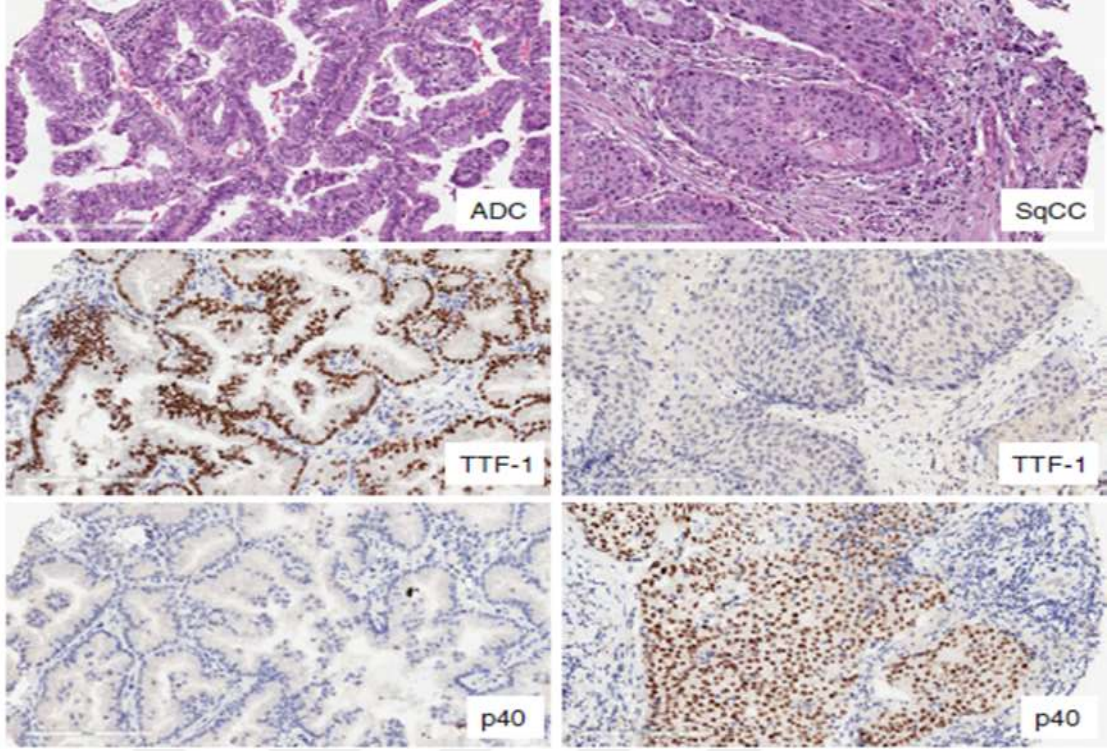
ADC, lepidik, asiner, papiller, mikropapiller ve katı modeller dahil olmak üzere aynı tümörde karıştırılabilen çeşitli histolojik modeller sunabilir. Lepidik patern olumlu bir prognoz ile ilişkilendirilirken, mikropapiller ve solid paternler daha agresif bir davranış ile ilişkilidir (77, 80). Katı ADC, SqCC veya LCLC ile karıştırılabilir; TTF-1 veya Napsin A'nın müsin üretimi ve IHC ifadesi zorlu vakalarda katı ADC'nin teşhisinde yardımcı olabilir (77).

Skuamöz Hücreli Karsinom (SqCC)

SqCC, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sinden sorumludur (76). SqCC genellikle ana veya lobar bronştan kaynaklanan merkezi bir yerleşimde ortaya çıkar (77). Histolojik olarak SqCC, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından keratinizasyon ve/veya hücreler arası köprüler gösteren veya skuamöz hücre farklılaşmasının IHC belirteçlerini eksprese eden malign bir epitelyal tümör olarak tanımlanmaktadır (77).

Keratinizasyon, SqCC'nin ayırt edici özelliği olmasına rağmen, birçok SqCC, keratinizasyonun morfolojik özelliklerini göstermeyebilir. Akciğer Kanserinin Teşhisi ve Moleküler Sınıflandırması 27 Ayrıca, az diferansiye SqCC psödoglandüler görünüm gösterebilir ve ayrıca az diferansiye adenokarsinomlar psödoskuamöz özellikler gösterebilir, bu da küçük biyopsilerin veya sitolojik örneklerin yorumlanmasını özellikle zorlaştırır (77, 80).

Skuamöz hücre farklılaşmasının belirteçlerini içeren IHC testleri p40 veya p63 ve sitokeratinler 5/6, zor durumlarda SqCC'nin tanımlanmasında yardımcı araçları temsil ettiğinden. Farklı bir varlık, bazaloid skuamöz hücreli karsinomdur. Küçük hücreli akciğer karsinomu ile karıştırılabilen, ancak p40, p63 ve sitokeratinler 5/6 dahil olmak üzere skuamöz hücre farklılaşmasının immüno belirteçleri için karakteristik olarak pozitifken, TTF-1 negatiftir (77).



Şekil 2.5. Bir adenokarsinom (ADC) ve skuamöz hücreli karsinom (SqCC) örneği. ADC, genellikle TTF-1 için pozitif ve p40 için negatif olan glandüler benzeri yapılarda düzenlenmiş epitel hücrelerini gösteren bir tümördür. Bunun yerine SqCC, katı bir şekilde düzenlenmiş tümör epitel hücrelerinden oluşur ve bazen keratinizasyon gibi genellikle TTF-1 için negatif ve p40 için pozitif olan skuamöz hücre farklılaşması belirtileri gösterir. (20 objektif lens kullanılarak Aperio tarafından taranan slaytlardan alınan mikrofotograflar) (81).

Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu (LCLC)

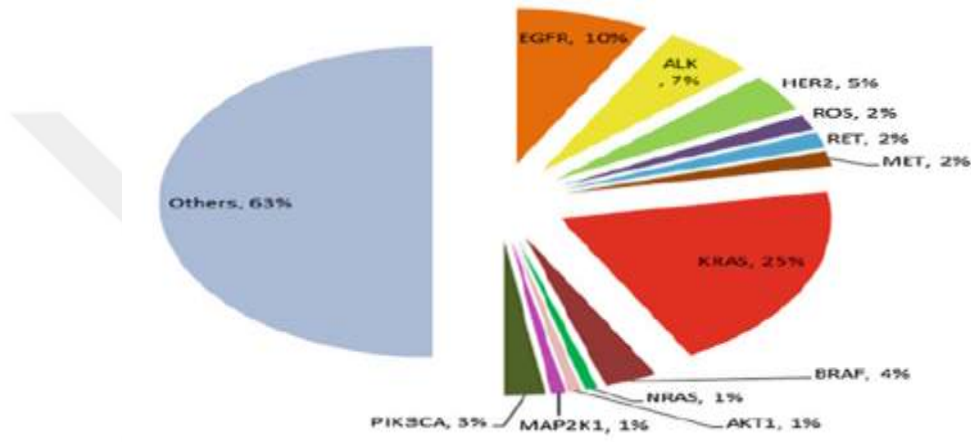
LCLC, tüm akciğer kanserlerinin %2.9'unu oluşturur (76). LCLC, skuamöz hücre, glandüler veya küçük hücre farklılaşmasının histolojik veya IHC kanıtı göstermeyen, farklılaşmamış bir NSCLC karsinomu olarak tanımlanır (77). LCLC tanısı, SqCC, ADC veya SCLC'yi dışladıktan sonra cerrahi olarak rezeke edilmiş bir numunenin kapsamlı bir şekilde örneklenmesini gerektirir ve bu nedenle, kor iğne biyopsileri veya sitoloji numuneleri üzerinde yapılamaz (77). Müsikarmin gibi müsin boyaması ile tespit edilen müsin üretimi yoktur. İmmünohistokimyasal olarak LCLC, sitokeratinler için pozitif olabilir ancak TTF-1 ve p40 için negatiftir.

LCLC, büyük hücreli nöroendokrin (genellikle TTF-1 ve nöroendokrin belirteçleri ifade eden), katı ADC modeli (TTF-1 pozitif), keratinize olmayan SqCC (p40 pozitif) ve nadiren adenoskuamöz karsinomdan (hem ADC hem de nöroendokrin belirteçleri gösteren) ayırt edilmelidir. SqCC farklılaşması) (77). Belirtildiği gibi küçük

biyopsilerde NSCLC özellikleri ve null IHC fenotipi olan tümörler NSCLC-NOS olarak adlandırılır.

NSCLC'nin Moleküler Değişiklikleri

Son yıllarda, NSCLC'de onkogenler ve tümör baskılayıcı genler dahil olmak üzere, artan miktarda yeni moleküler değişiklikler tanımlanmıştır ve bunların çoğu, kanser tedavisi için yeni öngörücü biyobelirteçleri veya hedefleri temsil etmektedir (47). NSCLC'deki moleküler hedeflerin nispi frekanslarının bir temsili, Şekil'de gösterilmektedir. Aşağıdaki moleküler değişiklikler, NSCLC için moleküler hedefler olarak klinik önemi olabilecekleri temsil eder.



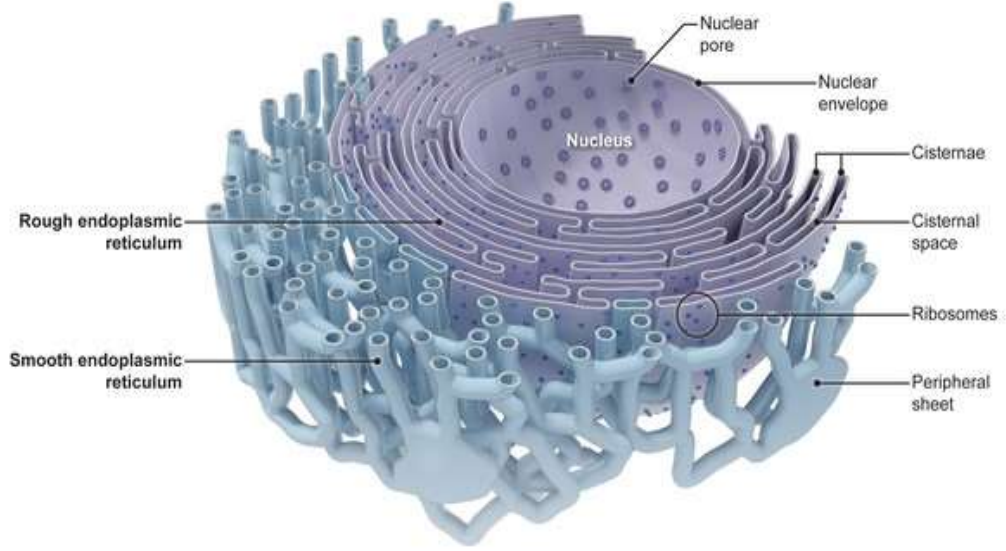
Şekil 2.6. NSCLC'de ana moleküler hedeflerin göreceli frekansının temsili (47).

2.3. ER Stresi

2.3.1. Endoplazmik Retikulum Nedir?

Endoplazmik retikulum (ER), ökaryotik hücrelerde sitoplazma içerisinde geniş bir zar ağı içeren önemli bir organel oluşturur. ER ağı son derece dinamiktir ve hücrel hücre iskeleti, plazma zarı ve mitokondri, Golgi aygıtı, peroksizomlar, endozomlar ve lizozomlar gibi diğer organellerle etkileşimi kolaylaştıran sarnıçlar, lineer tübüller ve sürekli yeniden düzenlenebilen bağlantı noktalarından oluşur (82, 83).

ER, proteinlerin, özellikle de salgı yollarına yönelik olanların düzgün katlanmasını ve üretilmesini kolaylaştırmak için tasarlanmış zarif bir sistem içerir. ER içinde, protein katlanması ve ilerleyişinde çeşitli şaperon proteinleri yer alır. Hızlı hücrel proliferasyonun fizyolojik durumlarında (örneğin, malignite) veya yüksek düzeyde salgılayıcı hücrelerde (plazma hücreleri, pankreatik β hücreleri ve alveolar tip II epitel hücreleri), iyi koordine edilmiş bir dizi transkripsiyonel ve translasyonel değişikliğin aktivasyonu, homeostazi destekler (84).



Şekil 2.7. Endoplazmik Retikulum organelinin genel yapısı (86)

ER düz, sakküler sarnıç oluşturan veziküler ve tübüler yapılardan oluşur, ancak morfoloji farklı hücre tipleri arasında büyük farklılıklar gösterir. İşlevleri arasında protein işleme, karbonhidrat ve kalsiyum metabolizması ve lipid biyogenezi yer alır. İki formda bulunur: pürüzlü veya granüler ER (RER) ve agranüler veya pürüzsüz ER (SER). RER, sitoplazmik yönü düzensiz bir şekilde ribozomlarla süslenmiş olduğu için bu şekilde adlandırılmıştır. Ribozomlar aynı zamanda sitoplazmada serbest olarak bulunurlar, burada gruplar (poliribozmlar) halinde bir araya gelme eğilimindedirler ve bireysel ribozomlar ince bir haberci RNA dizisi ile bağlanır. Genel olarak, bol miktarda RER'ye sahip olan hücre tiplerinde SER eksikliği vardır ve bunun tersi de geçerlidir (85).

Serbest sitoplazmik ribozomlar, endojen hücresel kullanım için gerekli proteinleri detaylandırırken, ihracata yönelik salgı proteinleri, RER zarı üzerinde bulunan ribozomlar tarafından sentezlenir. Ribozomlar tarafından sentezlenen proteinler, doğru üç boyutlu yapılarına katlandıkları ve glikosilasyon ve disülfid bağı oluşumu dahil olmak üzere bir dizi post-translasyonel modifikasyona tabi tutuldukları ERLumen'e taşınır. Doğru konformasyonlarına ulaşırlarsa, proteinler Golgi aygıtına iletilir. Bu nedenle, RER tüm hücresel proteinlerin yaklaşık üçte birini sentezler (85).

Nihai konformasyon biyolojik fonksiyonlarının ifadesi için gerekli olduğundan, proteinlerin uygun şekilde katlanması kritiktir. Bu, protein katlanması, birleştirilmesi ve post-translasyonel modifikasyonu kolaylaştıran, yalnızca doğru şekilde katlanmış proteinlerin dışa aktarılmasını sağlayan çok sayıda şaperon proteini ve katlaz içeren

karmaşık bir süreçtir. Bu işlem ayrıca uygun kalsiyum seviyeleri ve oksitleyici bir mikro ortam gerektirir. Protein homeostazını (proteostaz) sürdürmek için, protein katlanmasının etkinliği ve doğruluğu, değişken ve çeşitli girdilere yanıt olarak bağlama bağlı ve entegre bir şekilde sürekli olarak izlenmelidir (85).

RER ve dış mitokondriyal zar yakın temas halindedir. Mitokondri ile ilişkili zarlar olarak adlandırılan bu birbirine yakın alanlar, iki organel arasında iletişime izin vererek, değişen bir mikro ortama yanıt olarak yapılarını ve işlevlerini değiştirmelerine izin verir. Bu nedenle, RER, proteinler için geçerli olan işlevsel talebe bağlı olarak körelebilen veya hipertrofiye uğrayabilen labil bir organeldir. Bu çeşitli işlevler, RER'ye hücrel homeostazın sürdürülmesi için hayati önem taşıyan dinamik bir metabolik algılama rolü verir (85).

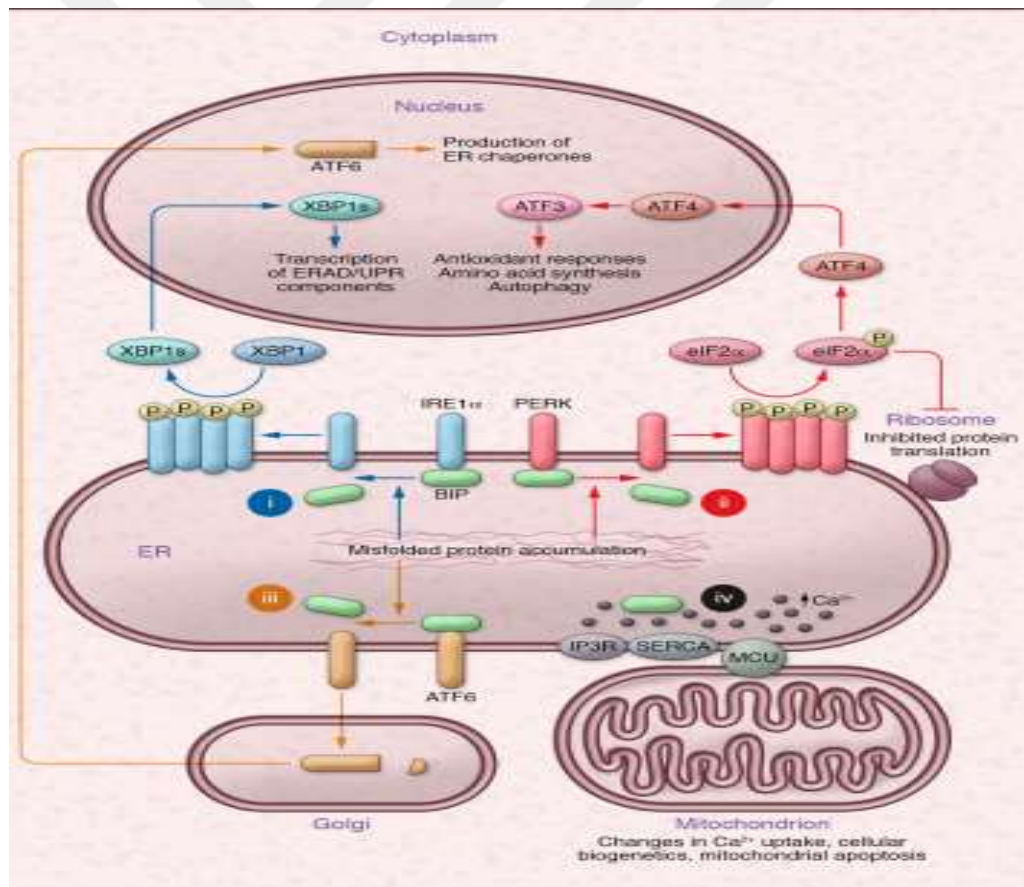
2.3.2. Endoplazmik Retikulum Stresi

Proteinlerin sentezi ve fonksiyonel moleküllerin üretimiyle sonuçlanan sonraki adımlar, yani proteinlerin katlanması, translasyon sonrası modifikasyonları ve salgılanması ER'de gerçekleşir. ER'nin düzgün işleyişindeki herhangi bir aksama, hücreleri değişen duruma uyarlamaya çalışan bir hücrel tepkiye neden olur; ancak sorun kronikleşirse hücre ölümü tetiklenir. ER stresi bazı patolojik durumlarla ilişkilidir (87), ancak lenfosit B farklılaşması, lens veya beyin gelişimi gibi bazı fizyolojik durumlarda da gereklidir (88, 89).

Yeni sentezlenen proteinlerin ER lümenine translokasyonuna Sec61p kanalı aracılık eder. Ayrıca protein katlanması, proteinlerin katlanma düzeyine bağlı olarak farklı afinitelere sahip moleküler şaperon sistemlerinin eylemini gerektirir. Nihai konformasyon, protein disülfid izomerazlar (PDI) tarafından disülfid bağlarının oluşturulmasını gerektirir ve bunların birçoğunun oligosakkaritlerin eklenmesine ihtiyacı vardır. PDI'lar, disülfid bağları oluşturmak için bir disülfid izomeraz aktivitesine ve bir oksidaz aktivitesine sahiptir. Oksitlenmiş PDI formu, oksijeni elektronlar için son alıcı olarak kullanan flavin adenin dinükleotit (FAD) bağımlı oksidazlar ve ER oksidoredüktin-1 (ERO1) tarafından oksidaz kapasitelerini korumak için geri yüklenir. Bu nedenle, protein katlanması için bir redoks ortamı gereklidir (90). Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi, UPR sinyali yoluyla antioksidan mekanizmaların aktivasyonundan sorumludur (91).

Uygun olmayan şekilde katlanmış proteinlerin birikmesi, protein katlama mekanizmasını bozar ve sırasıyla ER-ilişkili bozunma sistemi (ERAD) ve otofaji

Kalsiyum konsantrasyonları üç transmembran kanal tarafından kontrol edilir: sitozolden Ca^{2+} akışından sorumlu Sarco endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pompaları, iskelet kası hücrelerinde önemli olan ryanodin reseptörleri katyon akışından sorumludur. Bu kalsiyum düzenleyicilerin ER stresinin gelişimine dahil edilmesi incelenmiştir. (94).



Bip, ER'de biriken yanlış katlanmış proteinlere bağlanır ve bunun üç ER stres sensöründen, IRE1 α , PERK ve ATF6'dan ayrışmasına yol açar. Bip'ten ayrışma, IRE1 α 'nın multimerize olmasına ve otofosforile olmasına izin vererek, transkripsiyon

faktörü XBP1'in alternatif eklenmesine yol açan endoribonükleaz aktivitesini aktive eder. Eklenmiş XBP1 (XBP1'ler) daha sonra çekirdeğe yer değiştirir ve ERAD sisteminin bileşenlerinin transkripsiyonunu destekler. Oligomerize IRE1 α , endoribonükleaz aktivitesinin sertliğini kaybeder ve düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozulmayı aktive ederek mRNA ve miRNA'ları bozar. Protein translasyonunu ve ATF4 nükleer translokasyonu için sinyalleri inhibe etmek üzere eIF2 α 'yı fosforile eden PERK'in dimerizasyonuna ve otofosforilasyonuna yol açar. Çekirdeğe girdikten sonra, ATF4, adaptif antioksidan tepkileri indükleyen, amino asit sentezini destekleyen ve otofajiyi destekleyen ATF3'ü aktive eder. ATF6'dan Bip ayrışması, ER'den Golgi'ye geçişine izin verir; burada daha fazla işlem, çekirdeğe kaçakçılığa izin verir ve ardından ER şaperonlarının üretiminde artış sağlar. Bip ve diğer ER şaperonları, kalsiyum bağlayıcı proteinler olarak görev yapar. ER, sarkoendoplazmik retikulum Ca²⁺ ATPaz (SERCA) ve inositol trifosfat reseptörü (IP3R) yoluyla mitokondriyal kalsiyum uniporter (MCU) aracılığıyla mitokondriyal alım için mevcut sitozolik kalsiyum havuzunu sıkı bir şekilde kontrol eder. Kalsiyum akışının düzenlenmesi yoluyla ER, hücrel biyoenerjetiklerin ve apoptozun mitokondriyal mekanizmalarının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Farklı intraluminal proteinler kalsiyumu bağlayarak konsantrasyonunda dengeyi sağlar (95). Katlanmamış proteinlerin birikmesi, kalsiyumun sitozole translokasyonuna neden olur (96).

Kalsiyum ayrıca UPR sinyalini başlatmak için stres koşulları altında immünoglobulin ağır zincir bağlayıcı protein (BiP)/78-kDa glukozla düzenlenen protein (GRP78) ve kalretikülinden salınan ATF6 gibi ER stres sensörlerinin aktivasyonunu da etkiler (97). UPR başlangıcında kalsiyum etkisi, mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkilidir. ER ve mitokondri bağlantılıdır ve bu, fizyolojik koşullar altında Krebs döngüsünün aktivitesini ve ATP üretimini sürdürmek için metabolik takviyelerin ve kalsiyumun akışını sağlar. Bununla birlikte, yanlış katlanmış protein konsantrasyonlarında'ki artışlar, IP3R reseptörünün aracılık ettiği ER'den kalsiyum salınımını indükler. Bu iyonlar mitokondri matriksinde birikir ve fazla kalsiyum elektron taşıma zinciri fonksiyonunu etkileyerek ROS oluşumunda artışa neden olur ve bu da UPR'yi aktive eder (98). ER'nin lipid bileşimindeki bir dengesizlik, UPR yanıtını indükler. Doymuş yağ asitlerinden yüksek diyetler karaciğerde ER stresi oluşturur (99) ve hepatositlerin palmitat veya stearata maruz kalması UPR yanıtını aktive eder; ancak doymamış yağ asitleri ER fonksiyonunu değiştiremez (101).

Zincir bağlayıcı protein, yalnızca ER stres sensörlerinin aktivasyonu için gerekli değildir, aynı zamanda kalsiyum dengesinin korunması için bir ana düzenleyicidir ve şaperon aktivitesine sahiptir; proteinleri katlama kapasitesinin kalsiyum iyonları ile etkileşime bağlı olması mümkündür (95).

BiP ayrıca bazı kaspaz aktivitelerini bloke ederek apoptoz regülasyonuna katılır ve plazma zarında bulunduğu farklı ligandlar tarafından başlatılan sinyal iletiminde yer alır (102). BiP ifadesi, ER stresi ile aktive edilen sensörlerden biri tarafından düzenlenir. BiP'nin, protein yeniden katlanması ve UPR inaktivasyonunu sağlamak için bir mekanizma olarak ATF6 ve aktive edici transkripsiyon faktörü-4 (ATF4) yoluyla ER stresi tarafından indüklendiği bulunmuştur (103).

2.3.3. Protein Sentezi ve Katlanması

ER'nin ana işlevlerinden biri, salgılanan ve bütünleşik zar proteinleri ve ayrıca sitozolik proteinlerin bir alt popülasyonu için protein sentezi için bir bölge olarak hizmet etmektir. Protein sentezi, ribozomların ER'nin sitozolik yüzüne lokalizasyonunu gerektirir ve protein sentezini düzenleyen kanonik yol, mRNA: ribozom kompleksinin ER zarı üzerinde birlikte translasyonel kenetlenmesini içerir. Salgılayıcı veya bütünleyici zar proteinlerinin çevirisi sitozolde başlar, ardından bu mRNA'ları içeren ribozomlar, sinyal tanıma partikülü (SRP) tarafından tanınan ve bağlanan yeni oluşan polipeptitin amino terminali içindeki bir sinyal sekansı yoluyla ER zarına alınır (104).

mRNA, ribozom, gelişmekte olan polipeptit SRP kompleksi, SRP reseptörüne kenetlendiği ER'yi hedef alır (105). Translasyon ER'de devam eder ve ortaya çıkan polipeptit, birkaç Sec proteini içeren ve lipid çift katmanını kapsayan bir kanal olan translokon aracılığıyla ER'ye ko-translasyonel olarak girebilir (106).

Ayrıca bu süre zarfında veya bazı durumlarda translasyon tamamlandığında, bir sinyal peptidazı kısa sinyal peptidini bölerek serbest proteinin ER lümenine girmesine izin verir (107). Protein, hidrofobik kalıntıların bir uzantısının veya stop-transfer membran ankor dizisinin varlığıyla belirlenen bir integral membran proteini olmaya mahkumsa translokasyon duraklayacaktır (108).

Bu noktada protein yanal olarak kaydırılacak ve kaldığı yerde fosfolipid çift tabakası içinde sabitlenecektir (108). Transmembran proteinler ya bir hidrofobik amino asit dizisi içerebilir ve tek geçişli transmembran proteinler olarak sınıflandırılır ya da zarı geçen çok sayıda bölge içerir ve çok geçişli transmembran proteinler olarak sınıflandırılır (109).

Protein zara entegre olmaya mahkum değilse, bunun yerine salgı yoluna veya zara bağlı organellerin lümenine girerse, protein taşıma sürecini başlatır. Çeviri tamamlandıktan ve sinyal peptidi bölündükten sonra, ribozomlar tekrar sitozole salınır (110). Stabil bağlı ER ribozomları tarafından çevrilen mRNA'lar için, mRNA'lar salınır ve ribozomlar ER'ye bağlı kalabilir ve çoklu çeviri turlarına katılabilir (111).

ER'ye bağlı ribozomlar üzerinde çevrilen sitozolik proteinler için, bu mRNA'ların nasıl ER'ye alındığı veya neyin işe yaradığı açık değildir. Yakın tarihli bir çalışma, ER'de yerleşik protein p180'in mRNA'ların ER'ye çeviriden bağımsız alımında bir rol oynayabileceğini göstermesine rağmen, ribozomların opulasyonları translasyonu başlatmak için kullanılır (112). Protein sentezi ve ER lümenine translokasyonun ardından, salgılanacak bir protein, şaperonlar ve katlama enzimlerinin yardımıyla uygun katlanma ve modifikasyonlardan geçmelidir. Bu modifikasyonlar, N-bağlı glikosilasyon, disülfid bağı oluşumu ve oligomerizasyonu içerir (109).

Bu noktada salgı proteinlerinin kaderi belirlenir. Protein ER'de örneğin bir şaperon olarak işlev görürse, uygun katlanma başlayacaktır. Protein salgılanmaya mahkumsa şaperonlar tarafından salınacak ve Golgi yoluyla nihai bir varış noktasına (plazma zarı veya salgılanmak gibi) seyahat etmek veya peroksizomlara taşınmak üzere paketleneyecektir (113).

Ek olarak, transmembran proteinin sitosolik bölgeleri, bu alanları uygun şekilde katlamak için sitozolik proteinler veya şaperonlarla etkileşime girebilir. Öte yandan, birkaç protein ve proteinleri uygun şekilde katlamaya adanmış komplekslerle bile, proteinlerin bir kısmı doğal ve fonksiyonel forma ulaşmaz ve ya yanlış katlanır ya da kümelenir (114). Bu proteinler ya ER'de kalabilir ya da proteazomun aracılık ettiği ER-ilişkili egradasyon (ERAD) yoluna girerek anormal polipeptitlerin yanlışlıkla salgı yoluna girmemesini sağlar. Yanlış katlanmış proteinlerin tanınması ve ardından bu kümelerin ERAD yoluyla temizlenmesi, hücresel işlevi etkilememek için sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir (115). İlginç bir şekilde, ER stres tepki yollarının aktivasyonu ve patolojik insan koşulları ile ilgili birkaç bağlantı vardır.

2.3.4. Protein Katlanması ve Hücrelerin Yanlış Katlanmaya (UPR) Tepkisi

UPR, etkilenen hücrenin hayatta kalmasını tehdit etmeden önce ER stresini algılayan ve buna yanıt veren gelişmiş bir gözetim mekanizmasıdır. Fazla protein birikimi saptandıktan sonra, aktive edilmiş UPR sinyal yolları, protein sentezinin azalmasına, protein katlanma kapasitesinin artmasına ve yanlış katlanmış, katlanmamış,

çözünmeyen veya başka şekilde hasar görmüş proteinlerin bozunmalarını hızlandırarak temizlenmesinin artmasına neden olur (85).

Bu uyarlanabilir tepki, stresin doğasından, yoğunluğundan ve süresinden etkilenir. ER stresi tedavi edilemez olduğunda, özellikle şiddetli veya uzun süreliyse, UPR başarısız olabilir ve proinflatuvar ve pro-ölüm sinyalleri iletebilir. Hücre ölümü apoptoz tarafından gerçekleştirilir, ancak nekroz, nekroptoz (programlanmış nekroz) ve otofaji katkıda bulunabilir. UPR ayrıca hücre proliferasyonu, farklılaşması ve anjiyogenezin düzenlenmesinde de bir role sahiptir. UPR, üç ER sensörü, yani IRE1 (transmembran kinaz/endoribonükleaz gerektiren inositol), PERK (çift sarmallı RNA'ya bağımlı protein kinaz benzeri ökaryotik başlatma faktörü 2α [eLF2α] kinaz) ve ATF6 (aktive edici transkripsiyon faktörü 6) tarafından başlatılır. Bu üç UPR kolu, her biri farklı bir zamansal tarzda sinyal gönderen ve tanımlanmış bir hedef gen setini yukarı regüle eden çeşitli ER stres biçimlerine farklı şekilde yanıt verir. Bununla birlikte, birbirleriyle yakından bağlantılıdır ve diğer yollarla iletişim kurarak, ER stresine etkili bir yanıt koordine etmelerine izin verirler. Üç ER stres sensörü, normalde bir ısı şoku proteini (Hsp70) aile üyesi olan bir ER yerleşik şaperon, immünoglobulin bağlayıcı protein (BiP) tarafından aktif olmayan bir durumda bağlanır. BiP, glikozla düzenlenen protein 78 (GRP78) olarak da bilinir. ER stresi sırasında, ER lümeninde biriken ve yanlış katlanan proteinler, yüksek afiniteli bağlanma ile BiP'ye bağlanır ve üç sensörü serbest bırakır. Ayrılmış IRE1 ve PERK daha sonra aşağı akış yollarını etkinleştirirken, ATF6 Golgi aparatına yer değiştirir (85).

Üç ER sensörünün tümü, hem sitoprotektif hem de proapoptotik yolları aynı anda aktive ediyor gibi görünmektedir. Başlangıçta, protein translasyonunu geri yüklemeye, ER katlama kapasitesini artırmaya ve yanlış katlanmış proteinleri temizlemeye çalışan daha kararlı koruyucu çıktılar baskındır. Bununla birlikte, ER stresi şiddetli veya uzun süreli ise, sitoprotektif sinyalleme azalır ve proapoptotik sinyalleme, hücreyi ölümüne doğru iter (85).

2.3.5. Kanserde Katlanmamış Protein (UPR) Tepkisi

Katı tümörler ve bunların metastatik türevleri, genellikle ER fonksiyonunu riske atan ve ER stresine yol açan hipoksi, besin yoksunluğu, laktik asidoz ve oksidatif stres yaşar. Birçok açıdan UPR, kanser hücrelerinin çok elverişsiz koşullar altında hayatta kalmasını sağlayarak tümör büyümesini destekleyen sitoprotektif bir mekanizma olarak görülebilir. Bununla birlikte, başka bir açıdan bakıldığında, UPR, hücre ölüm yollarını

başlatarak konağı korumaya hizmet edebilir. UPR sinyali, anjiyogenez, invazyon, mitokondriyal fonksiyon, hücreler arası iletişim ve tümörle ilişkili enflamasyon dahil olmak üzere tümör hücresi biyolojisinin çeşitli yönlerinde yer almıştır (116). Onkogeneze ve kanser gelişiminde ER stresi ile UPR arasındaki bağlantılar başka yerlerde kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir. Şimdiye kadar kanser hücrelerinde yapılan çalışmaların çoğu, uyarlanabilir bir hayatta kalma mekanizması olarak UPR aktivasyonuna işaret ediyor. Örneğin, bu fikirle tutarlı olarak, artan GRP94 ve BiP seviyeleri mide kanseri ile ilişkilendirilmiştir (117).

XBP1'ler hipoksik hücrelerde arttığından ve hayatta kalma avantajı sağladığından IRE1 α kolu, hipoksiye ve pro-anjiyogenetik mekanizmalara tümör toleransında da rol oynar. Bununla birlikte, birçok kanser türünde ER stresi ve UPR aktivasyonunu gösteren büyük miktarda veriye rağmen, UPR'nin nihai olarak tümör büyümesini teşvik edip etmediği veya engellediği hala net değil. Sitoprotektif bir yanıt olarak UPR aktivasyonu, kanser hücrelerinde aşırı XBP1 ekspresyonunun, örneğin kronik lenfositik lösemide olduğu gibi, doğrudan tümörjenezini teşvik etmesi gerçeğiyle desteklenir (118).

Multipl miyelomda (MM), aktive edilmiş IRE1 α 'yı ve ardından birkaç bileşik tarafından XBP1 eklenmesini hedeflemek, preklinik modellerde umut verici sonuçlarla test edilmiştir. Ayrıca, MM için FDA onaylı proteazom inhibitörü olan bortezomib ile kombinasyon halinde sinerjistik etkiler vardı. Başka bir çalışma, XBP1'lerin kaybının, MM hücrelerine bortezomib'e direnç sağlayabileceğini göstermiştir (119).

XBP1, üçlü negatif meme kanserinde hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF1 α) ile etkileşime girer ve hipoksi imza gen ekspresyonunu indükleyerek tümörün ilerlemesini sağlar. İlginç bir şekilde, yakın tarihli bir çalışma, XBP1'in tümörle ilişkili dendritik hücrelerin işlevine müdahale ederek antitümör aktivitesini köreltebildiğini de göstermiştir (120).

XBP1'ler ve ATF6 α hedefi, P58IPK, kronik UPR sinyaline adaptif bir cevaba aracılık ederek, ER stresiyle karşı karşıya kalan malign hücrelerin hayatta kalmasıyla ilişkilendirilmiştir. PERK sinyalinin tümör büyümesini hem engellediği hem de teşvik ettiği bildirilmiştir. PERK eksikliği olan meme kanseri hücreleri, bozulmuş hücre büyümesi ve artmış ROS üretimi gösterir (121).

Tersine, bir kemirgen medulloblastom modelinde PERK'nin etkisizleştirilmesi, tümör büyümesini destekler. Ayrıca, onkoprotein MYC'nin PERK'yi indüklediği ve böylece sitoprotektif otofaji yoluyla hücre sağkalımını desteklediği gösterilmiştir (122).

Yakın tarihli bir çalışma ayrıca ER homeostazını epitelyal-mezenkimal geçişe (EMT) bağlayarak, EMT'ye giren hücrelerin artmış BiP ekspresyonuna ve artmış salgılama potansiyeli ve ER stres indükleyicilerine duyarlılıktan sorumlu olabilecek aktive PERK, eIF2 α yolağına sahip olduğunu göstermektedir (123). Bununla birlikte, diğer çalışmalar, CHOP'un kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir. PERK-ATF4'e bağımlı bir miRNA, CHOP ekspresyonunu azaltır ve meme kanserinde tümör hücresinin hayatta kalmasını destekler (124).

Bu örnekler, PERK sinyalinin apoptoz üzerindeki çeşitli etkilerini vurgulamaktadır. Farklı kanser türlerinde UPR sinyalinin sonucu değişkendir ve orijin dokusu, tümör evresi ve tümör mikroçevresi gibi çok sayıda faktöre bağlıdır. Ek olarak, tümör hücrelerinin heterojenliği, kanserde UPR sinyalinin sonucunu incelerken bir zorluk teşkil eder.

UPR bileşenlerinin in vivo genetik manipülasyonu, bu sinyal yollarının bir dizi organın normal işleyişi için gerekli olduğu gerçeğini doğrulayan bir fenotip spektrumu ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde, insanlarda UPR sensörlerinde doğal olarak meydana gelen mutasyonlar, metabolik hastalıklar ve kanser gibi bir dizi maligniteye yol açmaktadır (125). Örneğin, hepatoselüler karsinom, glioblastoma, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, böbrek kanseri ve mide kanseri gibi birçok insan kanserinde IRE1'deki somatik mutasyonlar tespit edilmiştir (126). Ayrıca, multipl miyelomlu hastalardan alınan örneklerde XBP mutasyonları bulunmuştur (127).

Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu (COSMIC) veri tabanından elde edilen veriler, IRE1, PERK ve ATF6'da spesifik mutasyon paternleri ve doku dağılımı gösteren bir dizi farklı mutasyon ortaya çıkarmıştır (128). Farklı mutasyonların tümör ilerlemesi üzerindeki biyolojik etkileri şu anda net değildir; bununla birlikte, insan kanserlerinde tanımlanan bir dizi IRE1 α mutasyonunun, XBP1'i hala birleştirebilen ancak RIDD'yi indükleyemeyen bir sağkalım avantajı sağladığı görülmektedir (129).

2.3.6. Tümör Hücresi Sağkalımında UPR nin Rolü

UPR'yi yukarı regüle etme yeteneği, tümörün hayatta kalması için gerekli görünmektedir (130). Aslında, UPR, ısı şoku yoluyla proteinleri iltihaplanma kaynaklı onkogeneze rol oynamıştır (131). Hem ATF6 hem de IRE1 dalları, ER stresi koşullarında BiP/GRP78 ekspresyonunu indükler ve bu şaperon, BIK ve kaspaz-7 ile etkileşime girerek ER homeostazını ve apoptoza direnci destekler (132).

BiP/GRP78'in prostatta koşullu ablasyonu, PTEN-null farede tümör oluşumunu ortadan kaldırır; burada şaperon, tümör büyümesi ve metastazı sırasında neovaskülarizasyon için kritiktir. Ayrıca, transgen kaynaklı bir meme kanseri modelinde, BiP/GRP78'in tümör proliferasyonu ve anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir (133). BiP/GRP78'in katılımı diğer çalışmalardan da önerilmektedir. Özellikle, mide karsinomları, melanom, hepatoselüler karsinom ve meme kanseri dahil olmak üzere bir dizi başka kanser türünde BiP/GRP78 ekspresyonu ile kanser ilerlemesi arasında bir korelasyon gözlenir (134). Tümör hücrelerinde bu tür yüksek BiP/GRP78 seviyeleri, bazal UPR seviyelerinin arttığını ve apoptozun azalmasına katkıda bulunabileceğini düşündürür. Birlikte ele alındığında, şu anda mevcut olan veriler, UPR ve BiP/GRP78 ekspresyonunun arttırılmasının, bu kısıtlayıcı koşullar altında hipoksik ortama ve tümör büyümesine adaptasyonu desteklediğini göstermektedir. Ayrıca, temel olarak bir sonuç olarak, son klinik öncesi çalışmalar BiP/GRP78 inhibitörlerinin kanser tedavisi için kullanıldığını bildirmiştir (135).

1. IRE1-XBP1 dalı:

Birkaç kanıt, UPR'nin IRE1-XBP1 dalının, hipoksik koşullar altında tümör hücresinin hayatta kalması ve malignitenin sürdürülmesi için gerekli olduğunu göstermektedir (136). Örneğin, XBP1 eksikliği olan hücrelerde, hipoksik koşullar altında artmış apoptoz ve azalmış klonojenik sağkalım gözlemlenir. Bağışıklığı yetersiz farelere XBP1 nakavt hücrelerle deri altı enjeksiyonu üzerine, vahşi tip kontrollere kıyasla tümör büyümesinde azalma ve hipoksiye karşı daha yüksek hassasiyet gözlemlendi (136).

Ayrıca, spesifik shRNA kullanılarak XBP1'in aşağı regülasyonu, fare embriyonik fibroblast ve fibrosarkoma hücrelerinden tümörlerde kan damarı oluşumunu azalttı ve XBP1'in eklenmiş formunun ekspresyonu, baskın negatif IRE1 α ifade eden hücrelerde anjiyogenezi restore etti (137). Son gözlemler, başarılı anjiyogenezi tümör hücrelerinde IRE1-XBP1 dalına bağlayan kanıtlar sağlar. Ayrıca, transgenik farelerde, bir XBP1-lusiferaz yapısını ER stresi ve tümör mikro ortamıyla ilgili aşağı akış yanıtları için bir raportör olarak ifade eden, birkaç birincil meme tümörü hücresi için XBP1-lusiferaz aktivitesi ile tümör büyüme oranları arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi (138). Bu dal aynı zamanda, tümörlerde yüksek oranda eksprese edilen ve onları iskemik hasara karşı koruyan ve tümör büyümesinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynayan (139) bir anjiyojenik faktör olan VEGF'nin transkripsiyonel regülasyonunda yer alır.

VEGF mRNA, ER stresi koşulları altında artar, ancak IRE1 shRNA tarafından susturulduğunda, VEGF indüksiyonu azalır ve bu da kan damarlarının kaybına neden olur. Bu yazarlar ayrıca, diğer iki dalın (PERK, ATF6) bağımsız olarak VEGF ekspresyonunu düzenlediğini ve bu üç yoldan herhangi birinin inaktivasyonunun, ER stresinin bir sonucu olarak VEGF upregülasyonunu bozduğunu gösterdi; VEGF ifadesi (140).

2. PERK dalı:

PERK dalının aktivasyonu, hipoksida hayatta kalmak için gerekli olan tümör hücrelerinde tetiklenen yanıtların önemli bir parçası olarak kabul edilir. Tümörlerde PERK aktive edilir, eIF2 α 'yı fosforile eder ve böylece otofajiyi artırarak ve antioksidan mekanizmaları aktive ederek hücre hayatta kalmasını destekleyen transkripsiyon faktörleri olan ATF4 ve NRF2'nin aktivasyonunu destekler. PERK tarafından fosforile edilemeyen bir eIF2 α mutantını (S51A) eksprese eden MEF hücrelerinde yapılan bir çalışmadan elde edilen ilk kanıtlar, uzun süreli hipoksi altında bu tür hücrelerin hayatta kalma süresinin azaldığını gösterdi (130). PERK ablasyonu, çıplak farelerde tümör büyüme oranlarını azalttı ve PERK nakavt farelerde, azalmış insülinoma oluşumu ve vaskülarizasyon gözlemlendi (130).

ATF4 yolu, hipoksiye yanıtta tümör adaptasyonunda da rol oynar. Bu tümör adaptasyon tepkilerinden biri, VEGF'nin gelişmiş ekspresyonu ile ilgilidir, bu sayede ER'de salgı için sentez ve işleme, hipoksida ATF4 yolunu içeren mekanizmalar tarafından artırılır (141). Öte yandan, de novo sentezlenen VEGF'nin salgılanması, hipoksi altında yukarı regüle edilen ER'de (ORP150) lokalize bir ısı şoku proteini 70 ailesi moleküler şaperon tarafından kontrol edilir (142).

Ek olarak, PERK, artan BiP/GRP78 ekspresyonu, azaltılmış protein sentezi ve G1 fazında hücre döngüsünden çıkışı içeren mekanizmalar yoluyla küçük, kemoterapiye dirençli ve asemptomatik tümörlerde bulunan uyuyan tümör hücrelerinin hayatta kalmasına katılır (143). Alternatif olarak PERK, insan meme epitel hücrelerinde otofajiyi, ATP üretimini ve bir antioksidan tepkisini teşvik ederek hücre dışı matris (ECM) ile ayrılmış hücrelerin hayatta kalmasını kolaylaştırır. Bu mekanizma, meme duktal karsinomu in situ lezyonlarında ECM ile ayrılmış tümör hücreleri tarafından potansiyel olarak kullanılabilir (144).

Bununla birlikte, paradoksal olarak, PERK ablasyonunun yakın zamanda, artan ROS ve DNA hasarı yoluyla yaşlı farelerde meme tümörü oluşumunu desteklediği de

gösterildi. Bunu yaparken PERK ablasyonu, DNA mutasyonunu ve neoplastik büyümeyi destekler (145).

3. ATF6 dalı:

ATF6 dalının kanserdeki rolü bugüne kadar yetersiz bir şekilde araştırılmıştır, ancak ATF6α'nın kronik ER stresinin önemli bir modülatörü olduğunu gösteren dolaylı kanıtlar mevcuttur. Örneğin, MEF hücrelerinde XBP1 ve ATF6α arasında ERAD bileşenlerini yukarı regüle eden bir kompleks tespit edilmiştir (146). Hücreler, sentezi yüksek düzeyde ATP tüketen proteinleri parçaladığından, bu süreç dikkatli bir şekilde düzenlenmelidir. Ayrıca, ERAD yolu kendi başına da büyük miktarlarda ATP gerektirir. Kalıcı ER stresinde ATF6α'yı ana düzenleyici olarak gösteren ikinci bir kanıt, ATF6α nakavt farelerden alınan hücreler kullanılarak elde edildi. Orada, BiP ve GRP94 gibi daha düşük şaperon seviyeleri ile ilişkili uzun vadeli ER stresini takiben hayatta kalma süresinin azalmasıdır (147).

ATF6α'yı ima eden dolaylı kanıtlar, orta derecede veya az farklılaşmış hepatoselüler karsinomlarda çekirdek içinde p50, ATF6α'yı tanımlayan çalışmalarla sağlanır (134). Öte yandan, ATF6α aktivasyonu, sakın skuamöz karsinom hücrelerinde kemoterapiye, besin açlığına ve strese karşı direnci artırarak tümörlerin uzun süreli hayatta kalması için çok önemlidir; burada ATF6α, Rheb ekspresyonunu artırır ve bu da mTOR aktivitesini bağımsız bir şekilde aktive eder (148).

Son olarak, PERK, IRE1α ve ATF6α yoluyla UPR'nin aktivasyonu, VEGF ekspresyonunu ve ardından anjiyojenik programın başlatılmasını teşvik eder (140).

2.3.7. Tümör Hücresi Ölümünde UPR nin Rolü

Şimdiye kadar, UPR'nin tümör hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen yönlerini inceledik. Bununla birlikte, kalıcı veya aşırı ER stresinin, hem mitokondri bağımlı hem de bağımsız yollarla hücre ölümünü, özellikle apoptozu tetiklediği bilinmektedir (132).

1. IRE1-XBP1 dalı:

IRE1-XBP1 dalının, TRAF2'yi alarak, procaspase-4'ü ve ardından kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive ederek apoptoza bağlandığı ve böylece mitokondriden bağımsız apoptozu tetiklediği öne sürülmüştür (147).

Yaygın olarak kullanılan bir herbisit olan Parakuat (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinyum diklorür), UPR'yi indükler, IRE1/ASK1/JNK eksenini aktive ederek nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde apoptoza yol açar (149).

2. PERK dalı:

PERK dalı, yapışma kaybı sırasında aktive edilebilir ve hücrel kaderi düzenleyebilir. İki baskın negatif PERK mutantının ifadesi ile PERK sinyalinin inhibisyonu, hiperproliferatif MCF10A meme epitel hücreleri ile sonuçlanır. Aynı çalışmada, mutasyona uğramış PERK'in eklenmesi, çıplak fare meme yağ yastıklarına implantasyondan sonra MCF10A hücrelerini tümörijenik hücrelere dönüştürdü (139).

Ayrıca PERK dalı, hipoksiye yanıt olarak anjiyogenezi de düzenler. K-ras dönüştürülmüş PERK-/- hücrelerinde mikroarray analizi kullanılarak (150), hipoksik koşullar altında, birkaç proanjiyogenez transkriptinin daha az etkili bir şekilde çevrildiğini, bunun da artan apoptoz, işlevsiz, düzensiz yapılara sahip kan damarları ve azalmış mikrodamar yoğunluğu ile sonuçlandığını göstermiştir. UPR'nin uyarılması, tümör hücrelerini madde kaynaklı ölüme duyarlı hale getirebilir. Sisplatin, katı tümörleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılır ve DNA'ya bağlanarak ve onarıma müdahale ederek hücreleri öldürdüğüne ve böylece hücre döngüsü durmasını ve apoptozu aktive ettiğine inanılır. Bununla birlikte, UPR'yi etkili bir şekilde indükler ve kaspaz-12'yi insan melanomu ve kolon kanseri (HCY116) sitoplastlarında çekirdekten bağımsız bir şekilde aktive eder. Özet olarak, sisplatinin proapoptotik etkileri, DNA'ya bağlanma kabiliyeti ile ilgili değildir, fakat aynı zamanda protein katlanması üzerindeki etkilerle de bağlantılı olabilir (151).

3. ATF6 dalı:

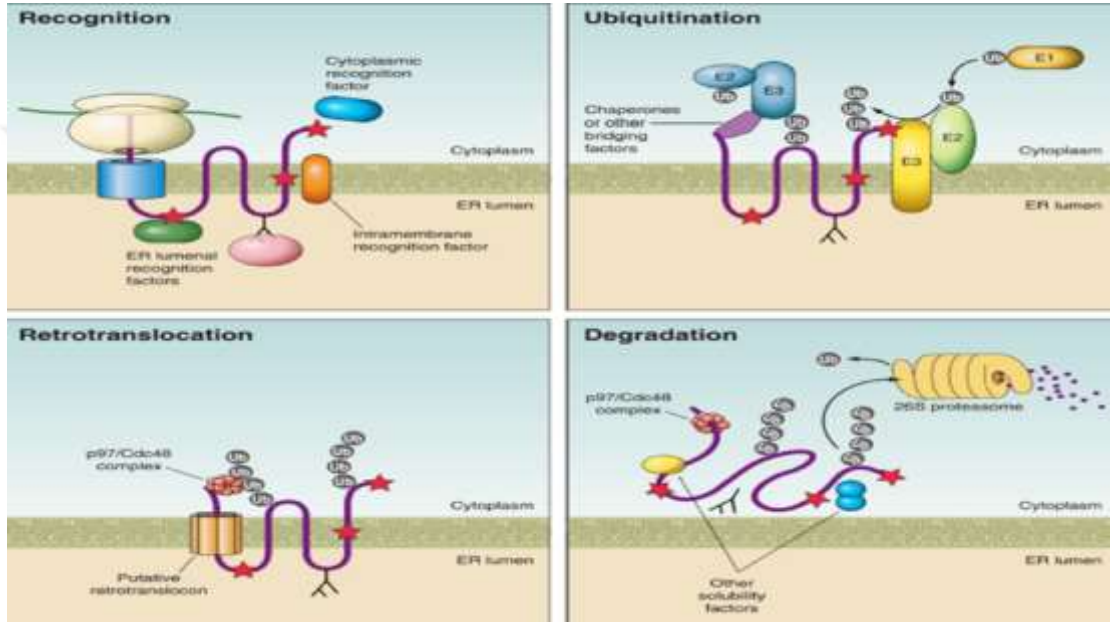
Metastaz sırasında, tümör hücreleri sıklıkla anoikise yol açan ECM'den ayrılmalıdır. Hem ATF6 hem de PERK dallarında bir aşağı akış efektörü olan CHOP, yaygın olarak atfedilen proapoptotik fonksiyonlardır (151). Örneğin, CHOP'un, birlikte mitokondriden sitokrom-c salınımını destekleyen ve apoptozu tetikleyen anti-apoptotik BCL2'yi aşağı regüle ederken ve reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırırken, BAK/BAD gibi proapoptotik BCL2 ailesi üyelerini yukarı regüle etmesi önerilmektedir. ER stres koşulları ayrıca ER'den sitozole kalsiyum salınımını teşvik eder, böylece daha sonra kaspaz-12'yi parçalayan ve aktive eden kalpainlerin aktivasyonunu destekler (152).

Daha sonra kaspaz-12, sitozolik kaspaz-9'u ayırır ve aktive ederek, mitokondriden sitokrom c salınımından bağımsız bir şekilde apoptozu tetikler. Özetle, UPR, bir tümör içindeki sitotoksik ortamda malign hücrenin hayatta kalması için çok önemlidir. Bu koşullar, UPR'yi tümör hücrelerinin devam etmesine izin veren adaptif bir yanıt olarak etkinleştirir (152).

Bu nedenle, bazı önemli UPR bileşenlerini hedef alan kimyasal ajanlar geliştirme olasılığı ilginç bir terapötik seçenektir. Öte yandan, ER stres koşulları devam ederse ve hücrel homeostaz eski haline getirilemezse, UPR apoptozu tetikleyebilir.

2.3.8. ERAD (Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Protein Bozulması)

Katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinler, ERAD mekanizması tarafından tutulur ve sitoplazmaya taşınır. Genel olarak, ERAD dört aşamaya ayrılabilir: substrat tanıma, ubiquitinyasyon, sitozole retrotranslokasyon ve proteazom aracılı bozunma (153).



Şekil 2.9. Endoplazmik retikulum ilişkili bozunmadaki (ERAD) adımlar (153).

Substrat Tanıma

Protein sentezi ve translokasyonu sırasında, yanlış katlanmış bir bölge (kırmızı yıldız) bir proteinin sitoplazmik, ER luminal veya transmembran alanlarında bulunabilir. Tanıma, katlanan lezyonun konumuna bağlı olarak gösterildiği gibi ER luminal veya sitoplazmik şaperonlar tarafından aracılık edilir. Glikoproteinler için lektinler (pembe) N glikanlarla etkileşime girer ve bazı durumlarda proteinin katlanma durumunu izlerler (153).

Ubikuitinyasyon

Tanımanın ardından, ubiquitinyasyon mekanizması, ya doğrudan zar içinde ya da sitoplazmik şaperonlarla etkileşimler yoluyla yanlış katlanmış substrata alınır. Bir ubiquitin aktive edici enzim (E1), ATP'ye bağlı bir süreçte ubiquitini (gri daire) bir ubiquitin konjugasyon enziminde (E2) aktif bölge sisteine aktarır. Ubiquitin daha sonra

en yaygın olarak bir ubiquitin ligaz (E3) aracılığıyla bir müşteri proteini üzerindeki bir lizin kalıntısına aktarılır. ER zarında ubiquitination, her ikisi de gösterilen sitoplazmik veya ER-lokalize E3 ligazları yoluyla meydana gelebilir (153).

Retrotranslokasyon

Politopik membran proteinleri için (resimde), retrotranslokasyon, proteinin bir kanaldan çıkarılması (retrotranslokon) ve/veya proteinin ve çevreleyen zarın (resimde gösterilmemiştir) çıkarılmasıyla meydana gelebilir. Her iki durumda da, retrotranslokasyon neredeyse her zaman Ufd1 ve Npl4'ü içeren ve bir substrat üzerinde ubiquitin ve yanlış katlanmış bölgelerle etkileşime giren p97/Cdc48 kompleksine bağlıdır. p97/Cdc48, substratın çıkarılması için ATP hidrolizi yoluyla mekanik kuvveti sağlar (153).

Bozunma

Retrotranslokasyonun ardından, yanlış katlanmış proteinler 26S proteazomuna götürülür ve agregasyonu önlemek için çözünebilir halde tutulmalıdır. N-glikanlar, N-glikan (resimde gösterilmemiştir) tarafından kırılır ve ubiquitin kısımları, ya sitozolde ya da proteazom başlığında deubikitinasyon yapan enzimler tarafından çıkarılır. Proteazom, proteinleri kısa peptit fragmanların'a bölen, tripsin benzeri, kimotripsin benzeri ve kaspaz benzeri üç peptidaz aktivitesi içerir (153).

ERAD yolu, hücre stresi ve mutasyona uğramış ve yanlış katlanmış bozunan proteinler nedeniyle ER'den yanlış katlanmış proteinleri temizlemeye ek olarak, spesifik enzimlerin ve lipid taşıyıcıların seviyelerini düzenlemek için de kullanılır. Bunlar, kolesterol biyosentezinde hız belirleyici basamağı katalize eden 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz ve kolesterol içeren lipozomların birleşmesi için gerekli olan apolipoprotein B'yi içerir (154, 155).

Bu ER sakinlerinin metabolik olarak düzenlenen yıkımındaki kusurlar, lipid homeostazı ve ateroskleroz ile bağlantılı çeşitli hastalıklara yol açar. Tüm bu nedenlerden dolayı, ERAD insan sağlığı için hayati önem taşımaktadır ve artan kanıtlar bu yolu birçok hastalıkla ilişkilendirmektedir. T-hücresi reseptörünün (TCR) montajı üzerine yapılan ilk çalışmalar, şu anda ERAD olarak bilinen şeyin varlığına dair ilk ipuçlarını verenlerdi. Klausner ve arkadaşları, heptamerik TCR'nin birleştirilmemiş alfa, beta ve delta alt birimlerinin lizozomal olmayan bir bölmede bozunduğunu keşfettiler. Bozulmanın ya ER'de yerleşik bir proteaz tarafından ya da başka bir prelizozomal bölmede meydana geldiği varsayılmıştır (156).

Golgi öncesi bozunmaya ilişkin diğer kanıtlar, asialoglikoprotein reseptörünün bir alt birimi, HMG-CoA redüktaz, birleştirilmemiş immünoglobulin hafif zincirleri ve sitokrom P-450 dahil olmak üzere diğer memeli proteinlerini inceleyen çalışmalardan geldi. Memeli hücre sistemlerini kullanan bu raporlara ek olarak, tomurcuklanan *Saccharomyces cerevisiae* mayasındaki paralel çalışma da yeni, lizozomdan bağımsız bir bozunma yolunun varlığına işaret etti (157).

Örneğin, bir translokon bileşeni olan Sec61'in sıcaklığa duyarlı bir mutanlığı tarafından ortaya çıkarılan translokasyon kusurlarının, Ubc6'yı kodlayan genin silinmesiyle kurtarıldığı bulundu; Ubc6, maya ER zarına entegre edilmiş bir ubikuitin konjüge edici enzimdir (158).

Bu veriler, yanlış katlanmış bir ER membran proteininin, yani Sec-61 mutantının cirosunda sitoplazmik proteazom için bir rol önerdi. Kısa bir süre sonra, memeli hücrelerinde kistik fibroz transmembran iletkenlik regülatörünün (CFTR) olgunlaşmamış vahşi tip ve mutant formlarının proteasome bağımlı bozunması rapor edildi. ER'de anormal bir çözünür proteinin sitoplazmaya iletilmesi gerekliliği, yanlış katlanmış maya salgı proteinleri, pro-alfa faktörü üzerine yapılan çalışmalardan ortaya çıkmıştır. Hem in vitro hem de genetik araçlar kullanılarak, bu proteinlerin ER'den retrotranslokasyona uğradığı ve proteazom tarafından yok edildiği bulundu (159).

Memeli ER'den çözünür proteinlerin retrotranslokasyonu ve bozunması da gözlemlendi (160). Nihayetinde, ERAD'ın ve bu yolun mekanizmasının altında yatan temel gereksinimlerin çoğunun mayadan insanlara korunduğu kısa sürede anlaşıldı. ERAD, yanlış katlanmış bir proteinin moleküler şaperonlar tarafından tanınmasıyla başlar (Şekil 2.9.).

ERAD substratları, ER lümeninde, ER membranında veya sitoplazmada yanlış katlanmış bir lezyon gösterebilir ve bu, etkileşime girdikleri şaperon tiplerini etkiler (161). Yukarıda tanımlanan BiP, immünoglobulin (Ig) ağır zincirlerine stabil bağlanması sayesinde keşfedilen bir ER luminal Hsp70'dir (162).

BiP' nin yeni sentezlenen proteinlere bağlanması, müşteri proteini üzerindeki açıkta kalan hidrofobik yüzeyler aracılığıyla gerçekleşir; Bununla birlikte, katlanma gecikirse veya protein ölümcül bir şekilde yanlış katlanırsa, uzatılmış şaperon etkileşimi iki işlevden birine hizmet edebilir:

1) topaklanmanın uzun süre önlenmesi ve katlanmamış bir substratın korunması ve/veya 2) yanlış katlanmış olan daha ayrıntılı bir süreç protein, diğer şaperonlara ve/veya ERAD mekanizmasına aktarılır. İkinci fonksiyon için kanıt, BiP ve Grp94'ün Ig

hafif zincirlerine (Ig λ) bağlandığını gösteren bir çalışmadan geldi. BiP, Ig λ 'nın hem indirgenmiş hem de oksitlenmiş formlarıyla ilişkiliyken, Grp94 esas olarak oksitlenmiş forma bağlanır, bu da şaperonların Ig λ ile sıralı bir şekilde etkileşime girdiğini düşündürür (163). BiP'yi kodlayan gende sıcaklığa duyarlı alele sahip mayada, substratlar yüksek sıcaklıklarda kümelenir; aynı durum, Hsp40 kokaparon partnerleri mutasyona uğradığında gözlemlendi (164). Birlikte, bu çalışmalar, şaperonların protein katlanması / bozulmasının farklı aşamalarında nasıl birlikte çalıştığını vurgulamaktadır.

ER'de şaperon benzeri lektinlere bağlanan N-glikanlar, protein katlanmasında ve ERAD'da önemli bir rol oynar. Glikozla kesilmiş glikoproteinlerin, OGT tarafından yönetilen kalneksinkalretikülin katlama döngüsüne akıtılması, döngüden çıkış ve bozunma ile rekabet halindedir. Yukarıda tartışıldığı gibi, döngüden çıkış ER mannosidazların etkisiyle tetiklenir. Memeli hücrelerinde, EDEM1 ve bunların izozimleri, glikan yapısının belirli dalları üzerindeki mannoz kalıntılarını keserek reglukosilasyonu önlerken aynı zamanda substrat retrotranslokasyonu ve bozulmasını destekler (165). O halde beklendiği gibi, ER mannosidaz seviyelerinin modülasyonu, anti-tripsin eksikliğine neden olan proteinin mutant formu gibi spesifik substratları parçalama etkinliği üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir (166).

Ubikuitin zinciri genellikle yanlış katlanmış protein üzerindeki bir Lys kalıntısına bağlanır, ancak son veriler bazı ERAD substratlarının Ser veya Thr kalıntıları üzerinde ubikuitin zincirleri içerdiğini gösterir (167). Protein ubikitasyonu, bir ubikuitin aktive edici enzim (E1), bir ubikuitin konjuge enzim (E2) ve ubikuitinin substrata son transferini katalize eden bir ubikuitin ligaz (E3) tarafından aracılık edilen üç aşamalı bir işlemle gerçekleşir. E3 ligazının substrat özgüllüğü sağladığı düşünülmektedir ve buna göre E3'ler, memeli hücrelerinde tanımlanmış 500'den fazla farazi ligazla (500) üç sınıfın en bol bulunanıdır. İlk E3 aracılı ubikuitin bağlanmasından sonra, ubikuitin zincir uzantısı ("poliübikuitinasyon"), ek ubikuitin monomerlerinin önceden bağlanmış bir ubikuitin içindeki bir Lys kalıntısı üzerindeki kovalent modifikasyonu ile gerçekleşir. Bu, uzatılmış bir izopeptide bağlı poliübikuitin zinciri oluşturur. Bazı durumlarda, bir poliübikuitin zincirinin kooperatif uzantısına, ERAD etkinliğini artıran başka bir enzim grubu, E4'ler aracılık eder (168).

Etkili proteazom etkileşimi için bir substrat üzerine dört ubikuitin zinciri eklenmelidir ve poliübikuitin zincirleri, zincirin üzerine inşa edildiği kalıntıya göre ayırt edilir. Başka bir deyişle, bağlantı türü, her yerde bulunan substratın kaderini belirleyebilir. Başlangıçta, Lys 48 izopeptit bağlantıları üzerine inşa edilmiş bir

poliübikuitin zincirinin proteazomal degradasyona özgü olduğu varsayılırken, Lys-63 poliübikuitin zinciri endositoz ve DNA onarımı için proteasomal olmayan bir sinyal olarak görev yaptı (169). Bununla birlikte, proteomik çalışmalar, hücrelerde birkaç başka ubikuitin bağlantısının (Lys-6, -11, -27, -29 ve -33) bulunduğunu ve Lys-48- ve -11-bağlı zincirlerin her ikisinin de ERAD substratlarına eklendiğini ortaya çıkardı (170).

Gelecekteki araştırmalar, var olan farklı bağlantıların ve karışık bağlantıların işlevlerini çözmeye devam edecektir. Bununla birlikte, genişletilmiş poliübikuitin zincirlerine sahip proteinlerin nörodejeneratif hastalıklarda hücre içi inklüzyonlarda bulunabileceği açıktır, bu da verimsiz proteazom bozulmasının hastalık fenotipiyle bağlantılı olduğunu düşündürür. Poliübikleştirme sonrasında veya sırasında, ERAD substratı teslim edilmeli veya proteazoma retrotranslokasyon yapılmalıdır. ER zarındaki bir retrotranslokasyon kanalının varlığı veya kimliği tartışmalı olsa da, birkaç varsayılan kanal dikkate alınmıştır. Bunlar, translokasyon kanalı olan Sec-61'i, bazı ERAD substratlarına ve ERAD mekanizmasının bileşenlerine yakından bağlı bir politopik membran proteinleri ailesi olan Derlins'i ve politopik bir E3 ubikuitin ligaz olan Hrd1'i içerir. Sec-61'in bir retrotranslokasyon kanalı olarak kullanılması başlangıçta en mantıklı görünüyordu. Mayada, Sec-61 mutantlarının bazı substratların ERAD'sini önlediği ve bir ERAD substratının, Sec-61'de bozunma yolunda Cys kalıntıları ile disülfid bağları oluşturduğu bulundu (171).

Son zamanlarda yapılan bir çalışma, ribozomda kuyruğa bağlı proteinlerin tanınmasına katılan bir protein kompleksinin, zar proteinlerinin proteazoma giden yolda çözünür bir formda tutulmasına yardımcı olabileceğini düşündürmektedir; bununla birlikte, bu kompleks, muhtemelen kümelenmeye en yatkın bölgeler olan, ilişkili substratlarının zara yayılan bölgelerini tanımıyor gibi görünmektedir (172). ERAD substratı proteolizi, sitoplazmada 26S proteazomunun etkisiyle gerçekleşir (173). Proteazom, iki ana gruba bölünebilen büyük (~2,5 MDa) bir protein kompleksidir; 20S çekirdek parçacığı ve 19S düzenleyici parçacık (19S "başlık" veya PA700 olarak da bilinir). Bir substrat üzerindeki poliübikuitin etiketi, ya proteazom kapağındaki alt birimler tarafından ve/veya proteazomla ilişkili proteinler tarafından tanınır (174).

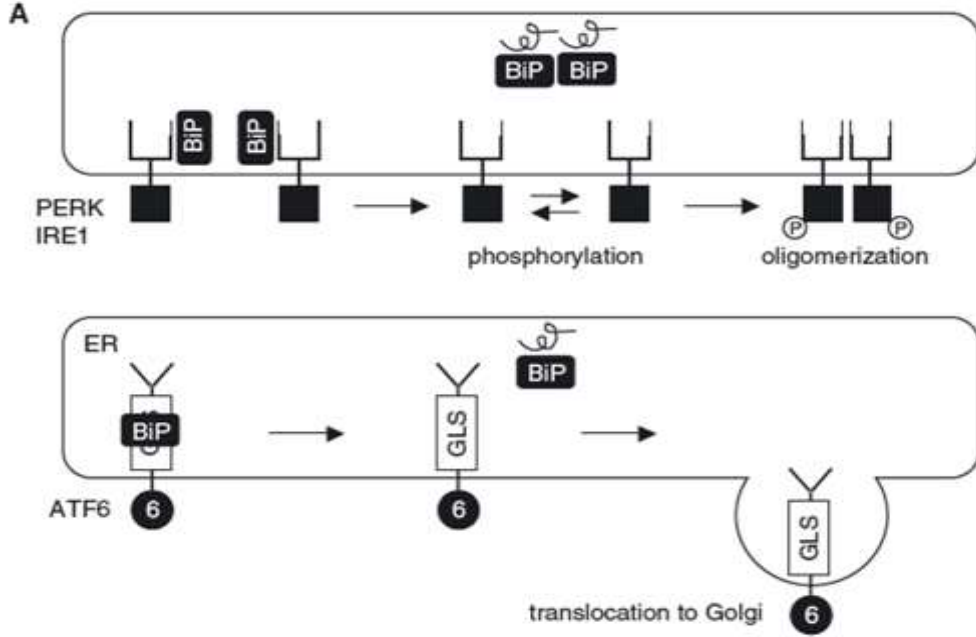
Tanıma sonrasında, substratlar, sudan arındırıcı enzimler (DUB'ler) tarafından sudan arındırılmalıdır. Örneğin, 19S başlığındaki Rpn11 alt birimi, bozunma için bir önkoşul olan ve yüksek seviyelerde serbest ubikuitini korumak için önemli olan proteazom substratlarını sudan arındırır (175). DUB'lerin ayrıca, p97/Cdc48 aracılığıyla

geçirildiklerinden ubiquitin bağlantılarını substratlardan çıkarmak için önerilmiştir ve büyük ölçekli bir proteomik analiz, p97/Cdc48 ve iki p97/Cdc48 ortağıyla ilişkilendirilen bir DUB, USP13 tanımlamıştır; USP13 yıkımı, bir ERAD'yi ve sitosolik her yerde bulunan bir substratı stabilize etti; bu DUB'nin p97/Cdc48 fonksiyonunu düzenlediğini düşündürür (176). Aksine, DUB'ler proteazom birleşmesinden önce substrat ile etkileşime girerse, ubiquitin zincirlerini kırabilir ve substrat bozulmasını geciktirebilirler. 20S proteazom çekirdeği, üç farklı proteolitik aktivite içerir: tripsin benzeri, kimotripsin benzeri ve kaspaz benzeri. Proteazom aracılı bozunmanın net sonucu, diğer hücrel proteazlar tarafından daha fazla işlenebilen küçük, ~2-30 amino asitli peptitlerin üretilmesidir (176).

Proteazomun farklı aktivitelerini hedefleyen ve ubiquitin-proteazom sisteminin (UPS) ERAD da dahil olmak üzere hücrel yolların düzenlenmesine katkısını belirlemede yararlı olduğu kanıtlanmış birkaç proteazom inhibitörü keşfedilmiştir. Örneğin, asetil-Leu-Leu-norleucinal (ALLN) ve Cbz-Leu-Leu-leucinal, kimotripsin benzeri aktivitenin geri dönüşümlü inhibitörleridir ve klinik olarak kullanılan proteazom inhibitörlerinin keşfi için temel atmıştır, örn. Bortezomib (176).

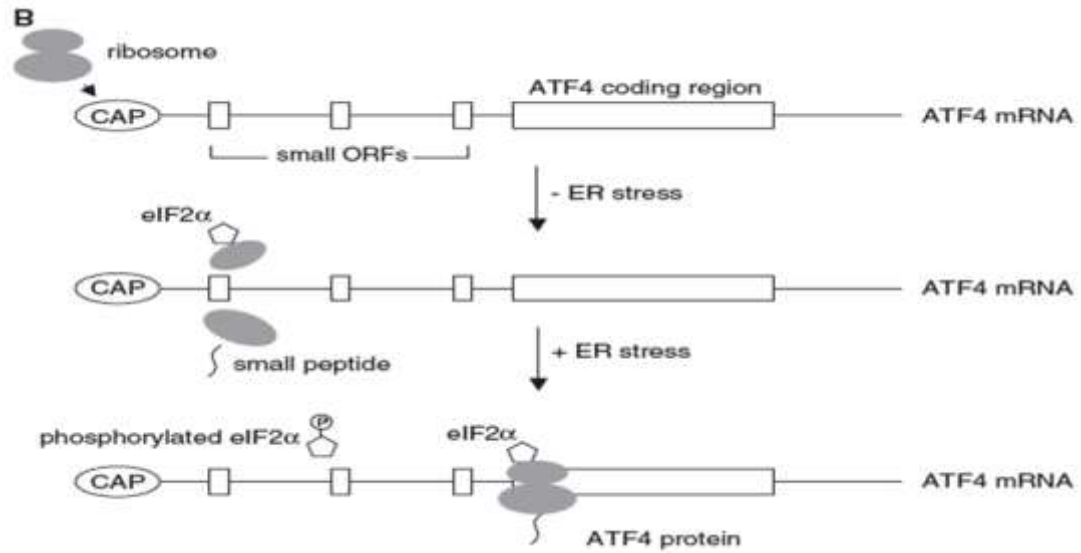
2.3.9. PERK' in İşleyişi ve Etkinliği

PERK, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimini algılayan, ER'de bulunan bir tip-I transmembran proteindir (177). PERK'in lümen kısmı, katlanmamış proteinlerin algılanmasında yer alırken, sitoplazmik kısım bir kinaz alanı içerir. ER stresinin yokluğunda BiP, PERK'in lümen bölgesine bağlanır ve aktive olmasını engeller (Şekil 2.10.A). ER stresine yanıt olarak BiP, PERK'ten salınır ve PERK, oligomerizasyon ve trans-fosforilasyon yoluyla aktive edilir (178). Aktive edilmiş PERK, ökaryotik translasyonel başlatma faktörü 2'nin (eIF2 α) a-alt birimini fosforile eder ve inaktive ederek translasyonel zayıflamaya yol açar. PERK fosforilasyonu, protein CReP (eIF2 α fosforilasyonunun kurucu baskılayıcısı), protein fosfataz GADD34 ve p58IPK gibi spesifik fosfatazlar tarafından defosforile edildiğinden geçicidir. CReP yapısal olarak ifade edilirken GADD34 ve p58IPK'nın ifadesi, sırasıyla PERK ve aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF)6 yolları tarafından ER stresinde indüklenir.



Şekil 2.10. (A) PERK yolunun aktivasyonu. (A) PERK, IRE1 ve ATF6'nın etkinleştirilmesi. BiP, ER stresinin olmadığı durumlarda bu sensörlere bağlanarak PERK, IRE1 ve ATF6'nın aktifleşmesini engeller. BiP, IRE1 ve PERK'in aktivasyonunu oligomerleşmelerini engelleyerek engellerken BiP, Golgi-lokalizasyon sinyalini (GLS) maskeleyerek ATF6'nın translokasyonunu inhibe eder. BiP, katlanmamış proteinler tarafından sensörlerden ayrıldığında, bu sensör molekülleri aktive edilir (178).

İlginç bir şekilde, transkripsiyon faktörü ATF4'ün çevirisi, eIF2 α aracılı çeviri zayıflaması ile yukarı regüle edilir. ATF4 mRNA'nın 5'-UTR'sinde birkaç küçük ORF vardır (Şekil 2.11.5B). Ribozom önce 5'cap bir yapıya bağlanır, ATF4 mRNA üzerinde kayar ve ardından fosforile edilmemiş (aktif) eIF2 α ile küçük ORF'lerde translasyona başlar. Ribozom, küçük ORF'lerin durdurma kodonunda çevirinin sona ermesi üzerine ATF4 mRNA'dan salındığından, ATF4 ORF, ER stresinin yokluğunda çevrilemez. Bunun aksine, fosforile edilmiş (aktif olmayan) eIF2 α translasyona başlayamadığı için, ER stresinin varlığında ribozomun ATF4 ORF'ye ulaşma olasılığı artar. Bu nedenle, ATF4'ün çevirisi, ER stresine yanıt olarak dikkate değer bir şekilde geliştirilmiştir. ATF4'ün hedefleri, apoptozun indüklenmesinde yer alan bir transkripsiyon faktörü olan CHOP'u (C/EBP homolog proteini) ve asparajin sentetaz ilgili olanlar gibi amino asit metabolizmasında yer alan proteinleri içerir (179).



Şekil 2.11. (B) ATF4 ifadesinin düzenlenmesi. ER stresinin yokluğunda, eIF2α'nın çoğu aktiftir (fosforile değildir) ve translasyon küçük ORF'lerde başlar ve ribozomların ATF4 ORF'ye ulaşmadan salınmasına yol açar. ER stresi üzerine, eIF2α'nın çoğu inaktif hale gelir (fosforile olur) ve translasyon nadiren küçük ORF'lerde başlar, bu nedenle ribozomlar ATF4 ORF'ye ulaşabilir ve ATF4 proteininin translasyonunu indükleyebilir (178).

eIF2α ayrıca dsRNA'ya bağımlı protein kinaz (PKR), GCN2 (amino asit sentezinin genel kontrolü 2) ve hemen regüle edilmiş translasyon inhibitörü gibi diğer kinazlar tarafından da fosforile edilir. Bu kinazlar, sırasıyla viral enfeksiyonlar, amino asit açlığı ve heme eksikliği tarafından aktive edilir; bu, translasyonel zayıflamanın ve ATF4 indüksiyonunun yalnızca ER stresi tarafından değil, aynı zamanda bu fizyolojik durumlar tarafından da indüklendiğini gösterir. Bu nedenle, eIF2α'nın fosforilasyonunun aracılık ettiği hücresel yanıt, entegre stres yanıtı olarak adlandırılır ve hücrenin hayatta kalması için gereklidir (180).

2.3.10. ATF6 ' in İşleyişi ve Etkinliği

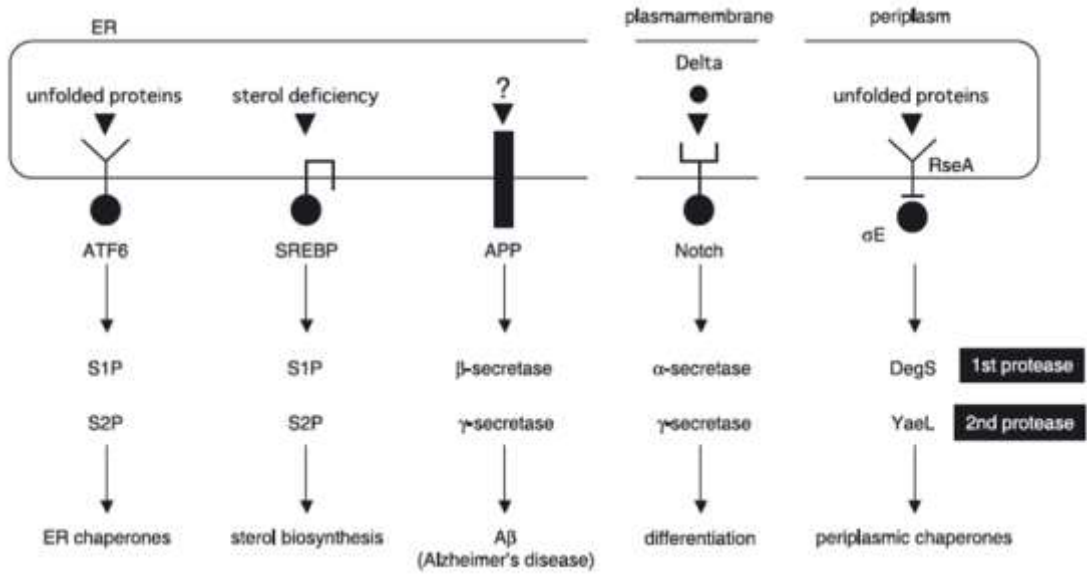
ER zarında başka bir sensör molekülü olan ATF6 vardır (181). ATF6, luminal alanı katlanmamış proteinlerin algılanmasından sorumlu olan bir tip-II transmembran proteinidir. ATF6'nın sitoplazmik kısmı, bazik lösin fermuar motifini (bZIP) içeren bir DNA bağlama alanına ve bir transkripsiyonel aktivasyon alanına sahiptir. ER stresinin yokluğunda BiP, ATF6'nın lümen alanına bağlanır ve Golgi lokalizasyon sinyalini engelleyerek ATF6 translokasyonunun inhibisyonuna yol açar (Şekil 2.10. A) (182). Katlanmamış proteinlerin birikmesine yanıt olarak BiP, ATF6'dan ayrışır ve ATF6, veziküler taşıma ile Golgi aygıtına taşınır. Golgi aparatında ATF6, site 1 proteaz (S1P) ve site 2 proteaz (S2P) olarak adlandırılan bir çift proteaz tarafından ardışık olarak

bölünür ve ATF6'nın [pATF6(N)] elde edilen sitoplazmik kısmı çekirdeğe yer değiştirir. Çekirdekte pATF6(N), cis-etkili bir elemente, ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlanır ve BiP, GRP94 ve calreticulin (183) gibi ER şaperon genlerinin transkripsiyonunu aktive eder.

ER stres yanıtı öğesinin konsensüs dizisi CCAAT-(N9)-CCACG'dir ve ATF6, CCACG bölümüne bağlanırken, genel bir transkripsiyon faktörü olan NF-Y (nükleer faktör Y), CCAAT bölümüne bağlanır. ATF6'nın bölünmesi benzersizdir, özellikle S2P tarafından ikinci bölünme transmembran bölgede meydana geldiğinden (184). Bu süreç, bakterilerden memelilere kadar iyi korunan düzenlenmiş zar içi proteoliz (RIP) olarak adlandırılır (Şekil 2.12). RIP'nin en belirgin substratı, sterol yanıt element bağlayıcı proteindir (SREBP) (184). SREBP, ATF6 gibi ER zarında bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Bir sterol eksikliği üzerine SREBP, Golgi aparatına taşınır, S1P ve S2P tarafından bölünür ve sterol biyosentezinde yer alan genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Bu nedenle, ATF6 ve SREBP'nin aktivasyonu esas olarak veziküler taşıma seviyesinde düzenlenir. SREBP'nin taşınmasının düzenlenmesi iyi karakterize edilmiştir ve sensör protein SCAP (SREBP bölünmeyi aktive eden protein) ve ankor protein INSIG (insülin kaynaklı gen 1) gibi düzenleyici bileşenler tanımlanmıştır (185).

ATF6 için ATF6a ve ATF6b olarak adlandırılan, benzer bir işleve sahip olan ve her yerde ifade edilen iki gen vardır (186). Son zamanlarda, ER'de bulunan ve RIP tarafından düzenlenen birkaç bZIP transkripsiyon faktörü rapor edilmiştir. cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein H (CREBH), spesifik olarak karaciğerde eksprese edilir ve ER stresine yanıt olarak S1P ve S2P tarafından işlenir (187).

CREBH, akut enflamatuar yanıtlarda yer alan akut faz yanıt genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. OASIS (eski astrosit spesifik olarak indüklenen madde) ayrıca astrositlerdeki ER stresine yanıt olarak S1P ve S2P tarafından bölünür ve BiP transkripsiyonunu aktive eder (188). Spermatide özgü bir transkripsiyon faktörü olan Tisp40 (spermiyogenez 40'ta indüklenen transkript), ayrıca S1p ve S2P tarafından ayrılır ve EDEM'in transkripsiyonunu aktive eder (189). Bu dokuya özgü ATF6 benzeri moleküller, ER stres tepkisine katkıda bulunabilir.



Şekil 2.12. RIP tarafından düzenlenen moleküller. RIP, bakterilerden memelilere kadar korunur ve çeşitli biyolojik süreçlerde yer alır. SREBP, bir sterol eksikliğini algılar ve sterol sentezinde yer alan genlerin transkripsiyonunu aktive eder. APP'nin RIP ile bölünmesi, Alzheimer hastalığının başlamasından sorumlu olan antikor üretimi ile sonuçlanır. Çentik, Delta'nın bağlanması üzerine RIP tarafından bölünen ve farklılaşmada yer alan hedef genlerin aktivasyonuna yol açan bir hücre yüzey proteinidir. Bakteriyel RseA proteini, etkisiz kalması için bir transkripsiyon faktörü olan σE 'yi bağlar. Periplazmada katlanmamış proteinlerin birikmesine yanıt olarak, RIP tarafından ayrılarak periplazmik şaperonların transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar (190, 191).

Luman / LZIP / CREB3, S1P ve S2P tarafından kesilebilir ve bir cis-etkili element, katlanmamış protein yanıt elemanı (UPRE) yoluyla EDEM transkripsiyonunu aktive eder, ancak ER stresi Luman RIP'i indükleyemez (190). CREB4, ER stresine yanıt olarak Golgi aparatına taşınır, S1P ve S2P tarafından bölünür ve ER stresinde bölünme gözlenmemesine rağmen BiP'nin transkripsiyonunu aktive eder (191).

ER stresine duyarsız olan bu ATF6 benzeri moleküller, ER stresi dışındaki durumlarda aktive olabilir ve ER şaperonlarının transkripsiyonunu aktive edebilir.

2.3.11. IRE1 – XBP1 ' in İşleyişi ve Etkinliği

ER zarındaki üçüncü sensör molekülü IRE1'dir (inositol gereksinimi 1) (192). IRE1'in luminal alanı, PERK'inkine benzer ve katlanmamış proteinlerin algılanmasında yer alırken, sitoplazmik alan, bir kinaz alanı ve bir RNaz alanı içerir. IRE1, IRE1a ve IRE1b için iki gen vardır. ER stresi üzerine, IRE1 aktivasyonunun BiP baskılaması salınır ve IRE1, dimerizasyon ve transfosforilasyon yoluyla aktive olur (Şekil 2.10. A)

(181). Aktive edilmiş IRE1, XBP1 (x-box bağlayıcı protein 1) pre-mRNA'yı geleneksel olmayan bir ekleme mekanizmasıyla olgun mRNA'ya dönüştürür (193).

DNA bağlama alanı ve aktivasyon alanı, XBP1 pre-mRNA'daki ORF'lerde kodlandığından, pre-mRNA'dan [pXBP1(U)] çevrilen bir protein, transkripsiyonu aktive edemez. Buna karşılık, olgun mRNA'dan [pXBP1(S)] çevrilen bir protein, EDEM, HRD1, Derlin-2 ve Derlin-3 gibi ERAD bileşen genlerinin transkripsiyonunu, bunlar gibi bir cis-etkili element, katlanmamış protein yanıt elemanı aracılığıyla aktive eder. Olgun mRNA'da iki ORF birleştirilir (194). pXBP1(S) ayrıca lipid sentezi ve ER biyogenezinde yer alan proteinlerin ekspresyonunu ve ayrıca BiP, p58IPK, ERdj4, PDI-P5 ve HEDJ gibi ER şaperonlarının ekspresyonunu indükler (195).

Bu nedenle XBP1, pankreatik b-hücreleri, hepatositler ve antikor üreten plazma hücreleri gibi büyük miktarlarda salgı proteinini üreten hücrelerin işlevi için gereklidir (196). XBP1 pre-mRNA'nın IRE1 tarafından eklenmesi, geleneksel mRNA eklenmesinden oldukça farklıdır. Geleneksel ekleme, spliceosome tarafından katalize edilir ve ekzon-intron sınırındaki konsensüs dizisi GU-AG veya AU-AC'dir (Chambon kuralı).

Ekleme reaksiyonu sıralıdır: önce 5' bölgesi bölünür, ardından bir kement yapısı oluşuktan sonra 3' bölgesi bölünür. Buna karşılık, XBP1 pre-mRNA'nın geleneksel olmayan eklenmesi, IRE1a ve RNA ligaz tarafından katalize edilir ve ekzon-intron sınırında GU-AG veya AU-AC yerine bir çift kök-halka yapısı vardır. Ayrıca, ekleme reaksiyonu sıralı değil, rastgeledir. Geleneksel ve geleneksel olmayan ekleme arasındaki en önemli fark, reaksiyonun meydana geldiği yerdir. Geleneksel ekleme (nükleer ekleme) çekirdekte gerçekleşirken, geleneksel olmayan ekleme (sitoplazmik ekleme) sitoplazmada gerçekleşir. Sitoplazmik eklemenin biyolojik önemi, sitoplazmada çeviri için kullanılan pre-mRNA'nın, hücre dışı veya hücre içi sinyallemeye yanıt olarak mRNA'dan çevrilen proteinin doğasını değiştirmek gerektiğinde eklenebilir olmasıdır. Buna karşılık, nükleer ekleme, sitoplazmaya gönderilen mRNA'yı ekleyemediği için, pre-mRNA'nın de novo kopyalanması ve eklenmesi gerekir. Bu nedenle, sitoplazmik ekleme, geleneksel mRNA eklemeye kıyasla çok hızlı, çok yönlü ve minimum atıkla enerji açısından verimli bir mekanizma olacaktır. Son zamanlarda, XBP1 pre-mRNA'da kodlanan pXBP1(U)'nun, pXBP1(S)'nin negatif geri besleme düzenleyicisi olduğu bulundu. Bu nedenle, XBP1 durumunda, pre-mRNA ve olgun mRNA, sırasıyla negatif ve pozitif düzenleyicileri kodlar ve ekspresyonları, ER'deki duruma yanıt olarak sitoplazmik splicing tarafından değiştirilir (197).

IRE1 β , gastrointestinal sistemin epitel hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilir ve ER stresine yanıt olarak translasyonu azaltmak için rRNA'yı parçaladığı düşünülür. IRE1 β - fareler, bir enflamatuvar barsak hastalığı indükleyicisine maruz kaldıklarında, muhtemelen artan ER stresi nedeniyle gerçekte kolit geliştirdiler (198).

Son zamanlarda, IRE1 α 'nın lümen bölgesinin kristal yapısı çözüldü (199). Lümen alanı, majör histo-uyumluluk komplekslerinin peptit bağlama alanına yapı olarak benzerdir, bu, katlanmamış proteinleri doğrudan bağlayarak ER stresini doğrudan algılaması gibi ilginç bir olasılığı düşündürür.

2.3.12. ER Stresine Neden Olan Kimyasallar

Tunikamisin, thapsigargin ve ditiyotritol gibi kimyasallar genellikle kültürlenmiş hücrelerde veya hayvanlarda deneysel amaçlarla ER stresi uyandırmak için kullanılır.

ER stresi oluşturan kimyasalları aşağıda kısaca özetleyeceğim. ER stresörlerinin birinci grubu glikosilasyon inhibitörlerini içerir. ER'de sentezlenen proteinlerin çoğu N-glikosile edilmiştir ve N-glikosilasyon genellikle protein katlanması için gereklidir. Bu nedenle, N-glikosilasyonu bozan kimyasallar, ER stresini indüklemeye potansiyeline sahiptir. Tunikamisin, *Streptomyces lysosuperificus* tarafından üretilen ve UDP-GlcNAc-dolikol fosfat GlcNAc-fosfat transferaz aktivitesini önleyerek N-glikosilasyonu inhibe eden bir antibiyotiktir (200). 2-Deoksid-glikoz da N-glikosilasyonu inhibe etmek için kullanılır, ancak tunikamisin'den daha az etkilidir. Diğer bir ER stres etkeni sınıfı, Ca²⁺ metabolizmasını bozan etkenlerdir. ER'deki Ca²⁺ iyon konsantrasyonu yüksek seviyede tutulduğu ve BiP gibi ER şaperonları Ca²⁺ iyonlarına ihtiyaç duyduğundan, ER'de Ca²⁺ metabolizmasını bozan kimyasallar ER stresini tetikler. A23187 gibi Ca²⁺ iyonoforları ve Ca²⁺ pompa inhibitörü thapsigargin, genellikle ER stresini uyandırmak için kullanılır (200).

ER stres faktörlerinin üçüncü kategorisi, indirgeyici ajanlardır. ER lümeni oldukça oksidatif olduğundan, burada sentezlenen proteinler, sistein kalıntıları arasında moleküller arası veya moleküller arası disülfid bağları oluşturabilir. Disülfid bağlarının oluşumu salgı proteinlerinin katlanması için önemli olduğundan, disülfid bağlarını bozan indirgeyici ajanlar ER stresini uyandırır. Ditiyotritol ve 2 merkaptotanol bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır (201). Altta yatan mekanizma bilinmemekle birlikte, hipoksinin ER stresini indüklediği de bilinmektedir. Hipoksinin neden olduğu glikoz konsantrasyonunda'ki bir düşüşün (çünkü hipoksi ATP üretimini sürdürmek için

glikolitik enzimleri indükler ve ardından hücreler glikoz tüketir) N-glikozilasyonu inhibe ederek ER stresine yol açtığı tahmin edilmektedir (202).

2.3.13. ER Stresine Bağlı Bazı Hastalıklar

Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler, sitozolün yanı sıra ER'de kolayca agregatlar oluşturur. Son raporlar, ubikuitin proteazom yolunu ve CREB bağlayıcı protein ve TATA bağlayıcı protein gibi sekester transkripsiyon faktörlerini bozdukları için küçük agregatların oldukça toksik olduğunu, oysa agrezom ve inklüzyon cisimciği gibi büyük agregatların sitoprotektif olduğunu öne sürdü. İlginç bir şekilde, HSP70 ve TRiC (TCP1-halka kompleksi) gibi moleküler şaperonlar, protein agregatlarının oluşumunu ve toksisitesini baskılayabilir. Hücrel proteinlerin hatalı katlanmasının neden olduğu hastalıklara toplu olarak "konformasyonel hastalıklar" veya "katlanma hastalıkları" denir. Hatalı katlanmış proteinler ve protein agregatları ER stresini uyandırabileceğinden, ER stresinin (veya protein agregatlarının) önemli bir neden olup olmadığı hala büyük ölçüde tartışılmalı da, ER stresinin çoğu konformasyonel hastalıkta, özellikle Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığında yer aldığı tahmin edilmektedir. Bu bölümde, ER stresinin konformasyonel hastalıklarda nasıl yer aldığına dair son bulguları kısaca özetleyeceğim (203).

1. Nörodejeneratif hastalıklar:

Nöronların protein agregatlarına duyarlı olduğu düşünülür ve ER stresinin nörodejeneratif hastalıklarda yer aldığına dair birçok rapor vardır. Aslında, BiP'nin yardımcı şaperonu olan SIL1/BAP'ın bozulması, protein agregatlarının birikmesine ve nörodejenerasyona neden olur. Bu hastalıkların çoğuna yaşlanma veya genetik arka plan neden olur, ancak birçoğunun, özellikle prion hastalığının bulaşıcı olduğu varsayılır. Alzheimer hastalığı en yaygın nörodejeneratif hastalıktır ve amiloid β -peptitin serebral nöritik plakları ile karakterize edilir. Son bulgular, Alzheimer hastalığının ana nedenlerinden birinin amiloid β -peptit birikimi olduğunu güçlü bir şekilde öne sürüyor, ancak tau da hastalıkta yer alıyor gibi görünüyor. Otozomal dominant ailesel Alzheimer hastalığı olan hastalar üzerinde yapılan araştırmalar, hastalıktan sorumlu üç gen, amiloid öncü proteini (APP), PS1 ve PS2 tanımlamıştır. APP tarafından kodlanan amiloid öncü proteini, işlevi hala bilinmeyen bir transmembran proteindir, oysa hem PS1 hem de PS2, c-sekretaz adı verilen bir proteazın temel bir bileşeni olan presenilin adı verilen bir proteini kodlar. APP, BACE (β -bölgesi amiloid β A4 öncü protein parçalayıcı enzim 1) ve c-sekretaz adı verilen bir β -sekretaz tarafından sırayla bölünür

ve amiloid β -peptidin birikmesine yol açar. İlginç bir şekilde, PS1 mutantlarını eksprese eden hücreler, azalan bir ER stres yanıtı gösterir ve ER stresine duyarlıdır (203).

ATF6, IRE1 ve PERK'in aktivasyonu da bu mutant hücrelerde bozulur. Ayrıca, PKR ve kaspaz-4 gibi ER stres kaynaklı apoptozda yer alan proteinler, Alzheimer hastalığının başlangıcında rol oynar. Aslında, ER stres yanıtı Alzheimer hastalığı olan hastalarda aktive edilir ve ERAD'nin bir bileşeni olan SEL1'in polimorfizmi Alzheimer hastalığı ile bağlantılıdır. Bu bulgular, ER stresi ile Alzheimer hastalığı arasında güçlü bir nedensel ilişkiyi güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır ve amiloid β -peptit birikimi tarafından başlatılan ER stresinin, Alzheimer hastalığının anahtar mekanizmalarından biri olması oldukça olasıdır (203).

2. Bipolar bozukluk:

Bipolar bozukluk, kişinin tekrarlayan mani ve depresyon atakları yaşadığı bir duygudurum bozuklukları sınıfıdır. Genetik bağlantı çalışmaları, hastalığa genetik faktörlerin dahil olduğunu düşündürmektedir. Hastalığa göre uyumsuz ikizlerden türetilen hücrelerin mikroarray analizleri, etkilenen ikizlerde XBP1 ve BiP ekspresyonunun azaldığını ortaya çıkardı. Son raporlar, XBP1 ve BiP'nin promotör bölgelerinde hastalarda ortak olan polimorfizmler olduğunu göstermiştir, ancak bu sonuç hala tartışmalıdır. Bipolar bozukluğun tedavisinde oldukça etkili olan valproat ve lityum gibi ruh halini dengeleyici ilaçların BiP, GRP94 ve calreticulin gibi ER şaperonlarının ekspresyonunu arttırabilmesi ilginçtir (203). ER stresinin bipolar bozukluğun başlangıcında yer aldığını doğrulamak için daha ileri analizler gereklidir.

3. Şeker hastalığı:

Diabetes mellitus, insülinin bozulmuş sekresyonunun veya etkisinin neden olduğu hiperglisemi ile karakterize bir hastalıktır. Tip I diabetes mellitus [insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (IDDM)], insülin salgılayan β -hücrelerinin seçici yıkımından kaynaklanırken, tip-II [insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM)] klinik olarak insülin direnci ile karakterize edilir. B-hücreleri, büyük miktarda insülin üretiminin neden olduğu ER stresinden muzdarip görüldüğünden, ER stresi ile IDDM arasındaki bağlantı, özellikle PERK yolu, kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. PERK, Wolcott Ralison sendromu olarak adlandırılan erken bebeklik IDDM'sinden sorumludur ve PERK^{-/-} fareler, IDDM'nin karakteristik semptomlarını gösterir. Ayrıca, eIF2a fosforilasyon bölgesinde (Ser51Ala) homozigot mutasyona sahip fareler benzer patolojik özellikler gösterirken, CHOP^{-/-} farelerde diyabet başlangıcı

gecikir. İlginç bir şekilde, PERK yolu dışındaki ER stres yollarının bileşenleri de IDDM'de yer alır. İlk olarak, Akita diyabetli fare modelinde BiP, GRP94, ORP150 ve HRD1'in ekspresyonu yukarı regüle edilir ve hem ATF6 hem de XBP1 aktive edilir. İkinci olarak, p58IPK^{-/-} fareler de IDDM'ye benzer semptomlar gösterir. Son olarak, Wolfman sendromu'nun (juvenil diyabet) başlangıcından sorumlu bir gen olan WFS1'in ekspresyonu, ER stresi tarafından indüklenir ve WFS1'in yıkılması veya devre dışı bırakılması, pankreatik b-hücrelerinde ER stresine neden olur (203).

Bu bulgular, ER stresinin IDDM'nin başlangıcında derinden yer aldığını kuvvetle önerir. ER stresinin NIDDM'ye de dahil olduğunu öne süren birkaç rapor var. İlk olarak, NIDDM'nin nedenlerinden biri olan obezite, ER stresini uyandırır ve XBP1^{-/-} fareler, altta yatan mekanizma bilinmemekle birlikte, insülin direnci geliştirir. İkinci olarak, b-hücrelerinde ORP150'nin ektopik ekspresyonu, insülin toleransını artırır. Bunun olası bir açıklaması, ORP150 ekspresyonunun ER'deki katlama kapasitesini geliştirebilmesi ve hücreleri ER stres kaynaklı apoptozdan koruyabilmesidir. Son olarak, küçük bir nükleer polimorfizm analizi, ATF6'daki bir polimorfizmin Pima Kızılderililerinde NIDDM ile ilişkili olduğunu ortaya çıkardı (203).

4. Ateroskleroz:

Ateroskleroz, arterlerin iç astarında yağlı maddeler, kolesterol, hücre atık, Ca²⁺ ve diğer maddelerin birikmesi nedeniyle kalp krizi veya felce yol açan sertleşip daraldığı bir hastalıktır. Ateroskleroz için risk faktörlerinden biri, kükürt amino asitlerinin metabolizması sırasında üretilen bir ara ürün olan homosisteinin birikmesidir. İlginç bir şekilde, homosistein bilinmeyen bir mekanizma ile ER stresini indükler ve ardından BiP, GRP94, CHOP, Herp ve TDAG51'in ekspresyonunu artırır. Homosistein tarafından indüklenen ER stresi, transkripsiyon faktörü SREBP'yi aktive ederek kolesterol sentezini de artırır. Hem CHOP hem de TDAG51'in (pleckstrin homoloji ile ilişkili alan ailesinin bir üyesi) indüksiyonu ve kolesterol birikimi, makrofajların apoptozunu teşvik ediyor gibi görünmektedir ve bu da, ateroskleroz gelişimine katkıda bulunan kan damarlarında makrofaj kalıntılarının birikmesine yol açtığı gözlemlenmiştir hiperhomosisteinemide. Aslında, CHOP^{-/-} – makrofajlar, kolesterol kaynaklı apoptozla karşı daha az duyarlıdır. Bu bulgular, ER stresinin neden olduğu apoptozun ateroskleroza neden olan ana faktörlerden biri olduğu fikrini kuvvetle desteklemektedir (203).

5. İskemi:

Hipoksi, yukarıda bahsedildiği gibi ER stresini indüklediğinden, ER stresi iskemi ile ilişkili hastalıkların önemli bir nedenidir. Örneğin, beyin iskemi nöronlarda ER stresini indükler ve ATF6, IRE1 ve PERK yollarını aktive ederek nöronların CHOP aracılı apoptozisine yol açar. İskemi ayrıca kalpte ER stresini ve ER şaperonlarının ekspresyonunu indükleyerek kardiyomiyositlerin dejenerasyonuna yol açar, bu da ER stresinin iskemik kalp hastalığının gelişiminde rol oynadığını düşündürür (203).

6. Kalp hastalıkları:

ER stresinin kalp ile ilgili hastalıklarda yer aldığı bildirilmiştir. Transvers aort daralması ile oluşan aşırı basınç, ER şaperonlarının ekspresyonunu ve ER stres kaynaklı kardiyak miyositlerin apoptozunu indükleyerek kardiyak hipertrofiye yol açar. İlginç bir şekilde, erken salgı yolundaki ER şaperonları için bir geri alma reseptörü olan bir mutant KDEL reseptörünü eksprese eden transgenik fareler, ER kalite kontrol mekanizmasındaki bir arıza ve artan ER stresi nedeniyle dilate kardiyomiyopati geliştirdi. Ayrıca, ER şaperonlarının yukarı regülasyonu, kardiyomiyositleri ER stresinin neden olduğu apoptozdan korumuştur. Bu bulgular, ER stres yanıtının kardiyomiyositlerin homeostazı için gerekli olduğunu kuvvetle önerir (203).

7. Karaciğer hastalıkları:

Hepatositler, salgı proteinlerinin güçlü sentezi için gerekli olan iyi gelişmiş bir ER yapısına sahiptir ve ER stresinin karaciğerle ilişkili hastalıklarda yer aldığı bildirilmiştir. Örneğin, alkolün ER stresi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir. Alkolün tam olarak nasıl ER stresine neden olduğu belirsizliğini koruyor olsa da; olası bir açıklama, alkolün metiyonin sentetaz ve betain-homosistein metiltransferaz gibi kükürt amino asit metabolizması için anahtar enzimlerin aktivitesini inhibe ederek güçlü bir ER stres indükleyicisi olan homosisteinin birikmesine yol açmasıdır. Alkol tarafından uyarılan ER stresi, CHOP gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hepatositlerin CHOP kaynaklı apoptozuna yol açar.

ER stresi aynı zamanda, yağ asidi sentezinin yukarı regülasyonun'dan sorumlu olan başka bir transkripsiyon faktörü olan SREBP'yi aktive ederek lipid kaynaklı apoptoz ile sonuçlanır. ER stresi hepatokarsinogeneze de yer alır. İnsan hepatoselüler karsinomunda, ATF6 ve IRE1 yolları aktive edilir ve BiP ekspresyonu belirgin şekilde artar, bu da hepatositlerin dönüşümünün ER stresini indüklediğini ve hücrelerin ER stres yanıt yollarını aktive ederek stresle başa çıktığını gösterir (203).

8. Böbrek hastalıkları:

Çeşitli faktörlerin ER stresini uyarak böbrek hasarına neden olduğu bilinmektedir. İlk olarak, analjezik ve antipiretik ilaç parasetamol (asetaminofen) böbrek tübüler hasarına neden olur ve ER stres kaynaklı apoptoz ilgili mekanizmalardan biridir.

Aslında parasetamol, CHOP indüksiyonunu ve kaspaz-12'nin bölünmesini içeren bir ER stres tepkisini indükler. İkincisi, kompleman saldırısı ayrıca ER stresini indükler ve PERK yolunu aktive ederek glomerüler epitel hücre hasarına yol açar. Üçüncüsü, salgı proteinlerinin aşırı birikimi, ER stresini uyarak podosit hasarını indükler (204).

Dördüncüsü, böbreğe özgü bir serin proteaz inhibitörü olan megsinin aşırı ekspresyonu, ER stresini ve böbrek hasarını indükler. İlginç bir şekilde, önceden BiP ekspresyonu indüksiyonu renal epitel hücrelerini renal hasara neden olan kimyasallardan korur. Bu bulgular, ER stresinin kimyasal olarak indüklenen böbrek hasarının ana nedenlerinden biri olduğunu ve ER stres yanıtının böbrek hasarına karşı bir savunma mekanizması olduğunu göstermektedir (204).

9. Viral enfeksiyon:

Hepatit B virüsü, hepatit C virüsü, hepatit D virüsü, flavivirüs, Borna hastalığı virüsü, murin lösemi virüsü ve Moloney murin lösemi gibi çeşitli virüslerin neden olduğu enfeksiyonlar virüslerini, muhtemelen viral proteinlerin şiddetli sentezinin ER'yi çok meşgul etmesi nedeniyle, ER stresini indüklediği bilinmektedir. Viral enfeksiyon üzerine hücreler, kendilerini ER stresinin neden olduğu apoptozdan korumak için ER stres yanıt yollarını aktive eder. Bir viral enfeksiyon tarafından indüklenen ER stresinin, enfekte edilen hücre tiplerine bağlı olarak nörodejenerasyon, karaciğer hasarı ve karsinogenez gibi çeşitli patogenetik etkilere neden olduğu düşünülmektedir (203).

2.3.14. Araştırılacak ER Stresi İle İlişkili Genler

Bu çalışma kapsamında akciğer epitel hücresi (BEAS2B) ve akciğer kanser hücrelerine (A549) ER stresini oluşturmak için Borik asit uygulaması yapılarak 5 adet genin ekspresyon seviyesindeki değişimler gözlenmiş ve ACTB (Beta Aktin) geni referans gen olarak kullanılmıştır. Bu genler;

- **ATF6;** Bu gen, endoplazmik retikulum (ER) stresini sırasında katlanmamış protein tepkisi (UPR) için hedef genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bir transkripsiyon faktörü olmasına rağmen, bu protein, ER'de gömülü bir transmembran protein olarak sentezlenmesi bakımından

olağandışıdır. Bir ER stres sensörü/dönüştürücü olarak işlev görür ve ER stres kaynaklı proteolizi takiben, ER şaperonlarını kodlayan genlerin promotörlerinde bulunan cis-etkili bir ER stres yanıt elemanı (ERSE) aracılığıyla bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu protein, sessiz fakat proliferatif olmayan skuamöz karsinom hücreleri için bir hayatta kalma faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu gendeki polimorfizmlerin farklı popülasyonlarda diyabet ile ilişkisi hakkında çelişkili raporlar olmuştur. Ancak başka bir polimorfizm, artan plazma kolesterol seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu genin ayrıca kistik fibroz için potansiyel bir terapötik hedef olduğu düşünülmektedir (205).

- **PERK;** PKR benzeri ER kinaz (PERK, EIF2AK3), protein translasyonunu engelleyen bir eIF2alfa kinazdır. PERK, hem entegre stres tepkisine hem de katlanmamış protein tepkisine (UPR) dahil olan bir tip bir endoplazmik retikulum (ER) zar proteinidir. Bu gen tarafından kodlanan protein, ökaryotik translasyon-başlangıç faktörü 2'nin alfa alt birimini fosforile ederek etkisizleşmesine ve dolayısıyla translasyonel başlatmanın ve global protein sentezinin baskılanmasının hızlı bir şekilde azalmasına yol açar. Bu proteinin mitokondriyal fonksiyonu modüle ettiği düşünülmektedir. Yanlış katlanmış proteinlerin neden olduğu ER stresi tarafından indüklendiği endoplazmik retikulumda (ER) bulunan bir tip-I membran proteinidir. Bu gendeki mutasyonlar Wolcott-Rallison sendromu ile ilişkilidir (205).
- **XBP1;** Bu gen, X kutusu olarak adlandırılan bir promotör elemente bağlanarak MHC sınıf II genlerini düzenleyen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu gen ürünü, aynı zamanda T hücresi lösemi virüsü tip 1 promotörünün promotöründe bir güçlendiriciye bağlanan bir hücrel transkripsiyon faktörü olarak tanımlanan bir bZIP proteinidir. Bir viral transaktivatörün DNA bağlama ortağı olarak hareket ederek viral proteinlerin ekspresyonunu artırabilir. Katlanmamış proteinlerin endoplazmik retikulumda (ER) birikmesi üzerine, bu genin mRNA'sının, endonükleaz inositol gerektiren enzim 1'in (IRE1) aracılık ettiği geleneksel olmayan bir ekleme mekanizması tarafından aktif bir forma işlendiği bulunmuştur. Eklenmiş mRNA'dan elde edilen 26 nt'lik kayıp, bir çerçeve kaymasına ve fonksiyonel olarak aktif transkripsiyon faktörü olan bir izoform XBP1(S)'ye neden olur. Eklenmemiş mRNA, XBP1(U) tarafından

kodlanan izoform, yapısal olarak ifade edilir ve ER stresinin iyileşme aşaması sırasında hedef genlerin transkripsiyonunu kapatan, XBP1(S)'nin negatif bir geri besleme düzenleyicisi olarak işlev gördüğü düşünülür. Bir XBP1 sözde geni tanımlanmış ve kromozom 5'e yerleştirilmiştir. Endoplazmik retikulum (ER) stresi sırasında UPR elemanına (UPRE) bağlanarak katlanmamış protein tepkisi (UPR) hedef genlerini indükleyerek stresle indüklenebilir güçlü bir transkripsiyonel aktivatör işlevi görür. ER stresi altında ER'nin homeostazını korumak için sırasıyla üretken katlama ve bozunma mekanizmasının kapasitesini artırmak için ER şaperonlarını ve ER ile ilişkili bozunma (ERAD) bileşenlerini kodlayan hedef genleri yukarı regüle eder. Plazma hücre farklılaşması için gerekli uyarıların varlığında immünoglobulinler ve interlökin-6 üretiminde rol oynar (Benzerlik ile). Fosfolipid biyosentezini ve ER genişlemesini indükler. Sırasıyla Akt/GSK'ye bağımlı ve/veya -bağımsız bir sinyal yolunda VEGF ile indüklenen endotel hücre (EC) büyümesine ve çoğalmasına katkıda bulunur, bu da beta-katenin nükleer translokasyonuna ve E2F2 gen ekspresyonuna yol açar. Kaspaz bağımlı bir sinyal yolunda umbilikal ven EC apoptozu ve aterosklerot gelişimini teşvik eder ve iskemik koşullar altında yetişkin dokularında VEGF'nin neden olduğu EC proliferasyonuna ve anjiyogenezine katkıda bulunur. BECN1 transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla EC'de endostatin kaynaklı otofajinin düzenlenmesinde yer alır. Tümör ilerlemesini teşvik ederek bir onkogen olarak rol oynar: epitelyal-mezenkimal (EMT) geçişi, hücre göçünü ve meme kanseri hücrelerinin istilasını indüklemek için çinko parmak proteini SNAIL transkripsiyonunu uyarır. Laktasyon sırasında lipojenik gen ekspresyonunu düzenleyerek adiposit farklılaşmasında yer alır. Protein homeostazını koruyarak substantia nigra pars compacta'nın (SNpc) her iki dopaminerjik nöronunun ve miyelom hücrelerinin hayatta kalmasında rol oynar. Yüksek karbonhidratlı bir diyetle yanıt olarak karaciğerde insülin duyarlılığını artırır ve bu da glikoz toleransının iyileşmesine neden olur. Ayrıca transkripsiyon faktörü FOXO1'in hem bağlanması hem de proteazom kaynaklı bozunması yoluyla ER stresinden ve/veya insülininden bağımsız bir şekilde glukoz homeostazını iyileştirir, dolayısıyla glukoneojenik gen ekspresyonunun baskılanmasına ve kan glukoz seviyelerinin düşmesine neden olur. Lipojenik genlerin bir alt

kümesinin ekspresyonunu ER stresinden ve UPR'den bağımsız bir şekilde düzenleyerek hepatositlerde de novo yağ asidi sentezinin indüklenmesini kontrol eder (Benzerliğe göre). Tercihen HDAC3 gen promotör bölgesini rahatsız akışa bağlı bir şekilde ilişkilendirir. BECN1 gen promotör bölgesine bağlanır. CDH5/VE-cadherin gen promotör bölgesine bağlanır. ER stresi üzerine ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlanır (205).

- **MAOA;** Bu gen, dopamin, norepinefrin ve serotonin gibi aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eden mitokondriyal enzimleri kodlayan iki komşu gen ailesi üyesinden biridir. Bu genin mutasyonu Brunner sendromu ile sonuçlanır. Bu gen aynı zamanda antisosyal davranış da dahil olmak üzere çeşitli diğer psikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Çoklu izoformları kodlayan alternatif olarak eklenmiş transkript varyantları gözlemlenmiştir. Oksijenin hidrojen peroksite indirgenmesiyle birlikte nörotransmitterler gibi birincil ve bazı ikincil aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eder ve merkezi sinir sistemi ve periferik dokulardaki nöroaktif ve vazoaaktif aminlerin metabolizmasında önemli işlevlere sahiptir. Tercihen serotoninini okside eder. Ayrıca, kinuraminin oksidatif deaminasyonunu 3-(2-aminofenil)-3-oksopropanal'e katalize eder ve bu da kendiliğinden 4-hidroksikinolin'e yoğunlaşabilir (205).
- **BETA AKTİN;** Bu gen, altı farklı aktin proteininden birini kodlar. Aktinler, hücre motilitesinde, yapısında, bütünlüğünde ve hücreler arası sinyalleşmede yer alan yüksek oranda korunmuş proteinlerdir. Kodlanmış protein, kasılma aparatının ana bileşenidir ve her yerde eksprese edilen iki kas dışı hücre iskeleti aktinden biridir. Bu gendeki mutasyonlar, insan hastalarda ayırt edici bir yüz görünümü ile zihinsel engellilik ile karakterize olan Baraitser-Winter sendromu 1'e neden olur. Bu genin çok sayıda psödojeni, insan genomu boyunca tanımlanmıştır. Aktin, hücrelerin sitoplazmasında çapraz bağlı ağlar oluşturan filamentler üretmek için polimerize olan yüksek düzeyde korunmuş bir proteindir. Aktin, hem monomerik (G-aktin) hem de polimerik (F-aktin) formlarda bulunur, her iki form da hücre hareketliliği ve kasılması gibi anahtar işlevleri yerine getirir. Sitoplazmik hücre iskeletindeki rollerine ek olarak, G- ve F-aktin ayrıca çekirdekte lokalize olur ve gen transkripsiyonunu ve hareketliliğini ve hasarlı DNA'nın onarımını düzenler. Aktin, bilinen en yüksek oranda

korunmuş proteinlerden biri olan, her yerde bulunan küresel bir proteindir. İki ana durumda bulunur: G-aktin küresel monomerik formdur, oysa F-aktin sarmal polimerler oluşturur. Hem G- hem de F-aktin özünde esnek yapılardır (205).

2.4. Bor Elementi Nedir?

Bor, periyodik cetvelde 13. grupta yer alan, atom numarası 5, atom kütlesi 10.811 g/mol ve kimyasal sembolü B olan bir metaloiddir. Bor bileşikleri yüzyıllardır bilinmektedir, ilk olarak 1808 yılında Sir Humphry Davy ve Gay-Lussac ve Thenard tarafından bir element olarak keşfedilmiştir (206).

Bor, aralarında ^{10}B ve ^{11}B 'nin en kararlı olduğu farklı izotoplara sahiptir. Bor, doğada elementel halde bulunmaz, organizmalarda fizyolojik açıdan önemli formları olan sodyum ve oksijen ile organobor kompleksleri oluşturur. Bor, hidrojen, karbon, azot veya oksijen ile karşılaştırıldığında düşük bir bolluğa sahip olmasına rağmen, çevrede yaygın olarak bulunur ve doğal olarak kayalarda, toprakta ve suda bulunur. Ortoboratlar gibi B-O veya B-N bağları içeren organobor kompleksleri biyolojik sistemlerde önemlidir. Bu organobor kompleksleri bitki, hayvan ve insan dokularında oluşur. Bir organizmada borun yaklaşık %96'sı yüksüz borik asit $\text{B}(\text{OH})_3$ ve az miktarda borat anyonu $\text{B}(\text{OH})_4^-$ [1,2,5] olarak bulunur. Borik asit, pKa'sı 9.25 olan zayıf bir Lewis asididir. Bor, ligandları ile kovalent bağ oluşturduğunda bu pKa değeri düşer ve negatif yüklü tetrahedral borat anyonu $\text{B}(\text{OH})_4^-$ [2] olur. Dünyanın başlıca bor yatakları Türkiye ve ABD'de bulunur ve ayrıca Arjantin, Şili, Rusya, Çin, Peru, Mısır, Irak, Libya, Fas ve Suriye'de bulunur (206).

Bor, kayalarda, toprakta ve suda her yerde bulunan bir elementtir. Batı Anadolu (Türkiye), Mojave Çölü (Kaliforniya, ABD) ve kuzeydoğu Çin'deki Liaoning eyaleti gibi jeotermal faaliyetler geçmiş olan kurak bölgelerde başlıca işletilebilir yataklar bulunur. Borik asit ve tuzlarının deterjan ve ağartıcılardaki klasik uygulamalarının yanı sıra, özellikle termal şoka dayanıklı borosilikat cam ve cam elyafı üretimi için bor bileşiklerinin üretimi ve kullanımı son yıllarda istikrarlı bir şekilde artmıştır.



Şekil 2.13. Bazı bor bileşikleri (208)

Bor, hayvanlarda ve insanlarda bir mikro besin maddesi gibi görünmektedir ve Dünya Sağlık Örgütü, boruyu insanlar için “muhtemelen gerekli” olarak sınıflandırmıştır. Bununla birlikte, borun biyolojik esaslılığı üzerine araştırmalar için en büyük itici güç bitki bilimidir. Borun bitkilerde ve diğer birçok organizmada temel bir element olduğu kısa sürede anlaşılmıştır. Bitki bor araştırmaları için çığır açan buluş, borun, rhamnogalakturnan II'yi cis-diol şeker gruplarıyla ester bağları yoluyla çapraz bağlayarak bitki hücre duvarlarını stabilize ettiği keşfiydi. Bu nedenle bor, bitki hücre duvarlarının mimarisi ve stabilitesi için önemlidir. Diğer araştırma kilometre taşları, Arabidopsis thaliana'dan bir borik asit kanalı NIP5;1 ve bir borik asit/borat ihracatçısı BOR1'in tanımlanmasını içeriyordu. Bor taşıyıcılarının genellikle bitki gelişimi için, örneğin köklerde ve sürgün düğümlerinde ve çiçeklenme dokularının gelişimi için önemli olduğuna dair artan kanıtlar vardır (207).

Borun Kullanım Alanları

Borik asit ve boratlar yaygın olarak antiseptik, bakterisit, sabun ve deterjan gibi temizlik maddeleri, deri ve ahşap koruyucuları, alev geciktiriciler, gübreler, böcek ilaçları ve herbisitler, kozmetik ürünler; ayrıca cam, cam elyafı yalıtımı, porselen emaye, seramik sırlar ve metal alaşımlarının imalatı da dahil olmak üzere birçok endüstriyel amaç için kullanılır (209).

2.4.1. Bor İle İlgili Toksikolojik Araştırmalar

Borik asidin yüksek pKa'sı nedeniyle, dahil edilen inorganik borat formundan bağımsız olarak (borik asit, boraks ve hayvan veya bitki dokularıyla ilişkili bor), inorganik boratların idrarda alımı, dağılımı ve atılımı neredeyse sadece ayrılmamış borik asit formu. Metabolizmanın olmaması nedeniyle, borik asidin toksikokinetiği, insanlar dahil türler arasında çok benzerdir. Borik asit antiseptik olarak kullanılmıştır. Aşırı dozlardan sonra akut toksiktir; örneğin, tesadüfen damlatılmasından sonra bir hastada öldürücülük bildirilmiştir. 30 gr borik asit tahriş edici özellikleri nedeniyle,

mevcut mesleki maruziyet limitleri, gözlerde ve üst solunum yollarında lokal duyusal tahrişe dayanmaktadır. Sıçanlarda ve farelerde gösterildiği gibi, alt solunum yollarını tahriş eden bir madde diborandır (210).

S. typhimurium ve *E. coli*'deki testler, memeli hücrelerinde gen mutasyon testleri (örn., L5178 fare lenfoması, V79 Çin hamster hücreleri ve C3H/10T1/ 2 hücre), hepatositlerde UDS, kromozomal aberasyon ve çeşitli sistemlerde kardeş kromatid değişim çalışmaları, tümü negatif sonuçlarla (SCCS 2010). V79 hücrelerinde borik asit kurşun veya kadmiyumun neden olduğu DNA hasarına karşı bile koruyucudur. İnsanlarla ilgili olarak, bora maruz kalan işçilerin sperm hücrelerinde DNA bütünlüğü (COMET testi) çalışmaları negatifti.

Bor bileşikleri üzerine yapılan toksikolojik çalışmaların önemli bir odak noktası, AB mevzuatları tarafından tetiklenen üreme toksikolojisi üzerinedir. Daha önceki hayvan çalışmaları, sırasıyla 17.5 ve 9.6 mg/kg vücut ağırlığı sıçan doğurganlığı ve sıçan gelişimsel toksisitesi için NAOEL'ler verdi. Bu verilere dayanarak, bor bileşiklerinin üreme toksinleri olarak sınıflandırılması gerekip gerekmediği konusunda bir anlaşmazlık vardı. Bu, insanlarda bir dizi çalışmaya neden oldu (211).

Scially ve ark. Çin'in Liaoning eyaletinde bor madenciliği veya işleminde yaklaşık 1000 erkek ve kadın üzerinde yapılan çalışmaları derledi. Bunlar, bor maruziyetinin bireysel değerlendirmelerini, üreme deneyimine ilişkin görüşmeleri ve semen analizine ilişkin verileri içeriyordu. Yüksek oranda maruz kalan işçilerde bora atfedilebilecek erkek üreme etkilerine dair hiçbir ikna edici kanıt elde edilememiştir. Bu, yine kan veya idrar bor konsantrasyonları ile olumsuz semen parametreleri arasında anlamlı bir korelasyon bulamayan mesleki bor maruziyetleri ve semen kalitesi arasındaki olası etkileşimler üzerine bir başka çalışma ile desteklenmiştir (212).

İnsan üreme toksisitesine ilişkin başka bir dizi çalışma, Türkiye'nin bor bakımından zengin, yüksek içme suyu seviyelerine sahip bölgelerinde, üreme üzerinde kesin etkiler olmaksızın gerçekleştirilmiştir. Bu dergide, borun üreme etkilerine ilişkin geniş bir insan çalışması yayınlanmıştır (211). Kişiler hem mesleki olarak hem de içme suyu yoluyla maruz kalmıştır. Bor maruziyetinin erkek üreme toksisitesi göstergeleri (konsantrasyon, motilite, sperm hücrelerinin morfolojisi ve folikül uyarıcı hormon, lüteinizan hormon ve toplam testosteronun kan seviyeleri) üzerindeki olumsuz etkileri tespit edilmedi.

Ek olarak, bor metabolizmasında rol oynayan genleri bulmak için, bor direnci veya maya hücrelerine duyarlılık kazandıran genler için bir haploid maya delesyon

koleksiyonu tarandı. 21 bora duyarlı ve 6 bora dirençli mutant bulundu. Ek olarak proteomik analizler, toksik borik asit seviyelerinin varlığında ekspresyonu artan proteinlerin olduğunu göstermiştir. Tüm bu genler ve proteinler, hücre içinde daha fazla araştırma gerektiren farklı yolları gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda bor genellikle bakteriyel ve fungal enfeksiyonları kontrol etmek için kullanılır. Borik asidin toksik aktivitesinin balık ve balık yumurtalarında saprolegniasis'e neden olan bir mantar olan *Saprolegnia*'da özellikle mitokondri ve mitokondriyal enzimler üzerinde olduğu ileri sürülmektedir. Bor ayrıca insanlar için toksik olabilir. İnsanlar, çoğunlukla meyve ve sebzelerden olmak üzere günlük olarak bor tüketir. Yüksek dozlarda tüketildiğinde gelişimsel ve üreme anormalliklerine neden olabilir (206).

2.4.2. Mikroorganizmaların Bor İhtiyacı

Bor, mikrobiyal sistemlerin fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde önemli rollere sahiptir (206). Bor içerdiği bulunan ilk doğal bileşik, gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olan antibiyotik Boromycin'dir (*Streptomyces antibioticus* tarafından üretilir). Ayrıca bakteriyel antibiyotikler olan tartrolonlarda (*Sorangium cellulosum* tarafından üretilir) borophisin, aplasmomycin (*Streptomyces griseus* tarafından üretilir) bakteriyel çekirdek algılayıcı molekül otoindükleyici AI-2; bir deniz bakterisi tarafından üretilen boron içeren siderofor vibrioferrin ve alg *Solenopora jurassica*'nın pembe renginden sorumlu olan borolitokromlarda *Azotobacter*'de bakteriyel nitrojen fiksasyonu için bor gereklidir. *Bacillus boroniphilus*, büyümesi için bora ihtiyaç duyar ve 450 mM'den fazla bora tahammül edebilir (206).

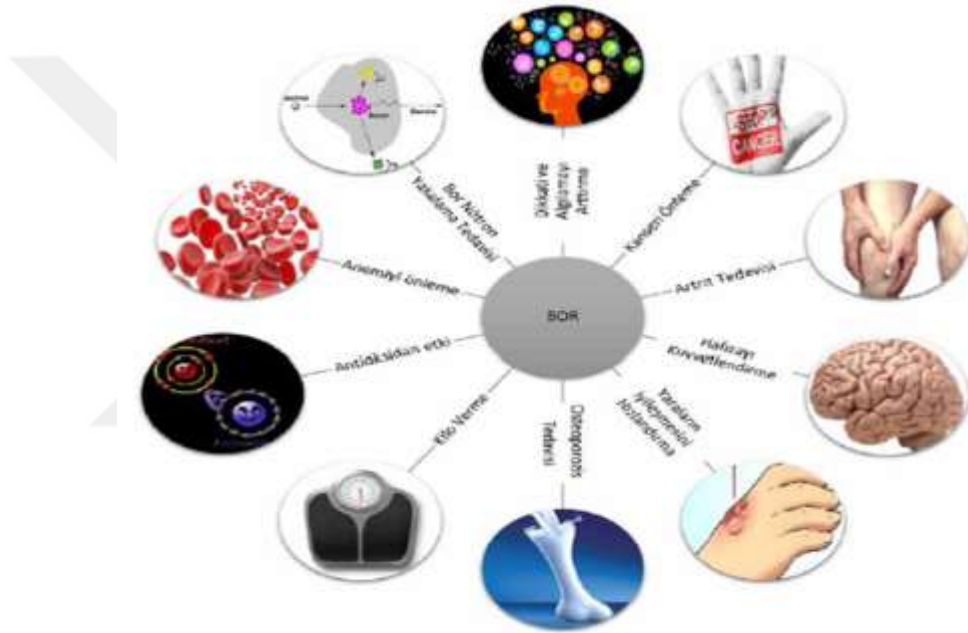
Bennett, maya hücrelerinin bor eksikliğinde bölünemeyeceğini gösterdi. Besiyerine tekrar bor eklendiğinde, maya hücreleri normal olarak çoğaldı, ancak çevrede bor seviyeleri arttığında iyi büyüyemediler. Ayrıca mayanın 80 mM borik aside kadar yaşayabildiği ortaya konmuş ve bora toleranslı bir tür olarak kabul edilmiştir. Maya, borun moleküler biyolojisini araştırmak için uygun bir modeldir (206).

2.4.3. İnsan ve Hayvan Sağlığında Borun Yeri

Bor ve bileşiklerinin insan ve hayvanların metabolizması için faydalı olduğu bir süredir bilinmektedir. Borun insan için gerekliliği bildirilmemiştir, bunun yerine DSÖ (Dünya sağlık örgütü) tarafından muhtemelen temel bir element olarak kabul edilmektedir. Steroid hormon metabolizması, sağlıklı kemik gelişimi ve hücre zarı bakımında rolleri vardır (213).

İnsanlar günlük yaşamlarında bor içeren birçok ürünü tüketirler; günde 1-7 mg bor alınabilir. Sebzelerde, meyvelerde, kuruyemişlerde ve yan ürünlerinde bol miktarda bulunur. Sağlıklı insanlarda bor seviyeleri 15 ile 80 µg/kg arasında değişmektedir. Bor, gastrointestinal sistemden tamamen emilir ve vücutta borik asit olarak bulunur. Hayvanlarda bor, karbonhidrat, mineral metabolizması, enerji tüketimi, çeşitli enzim aktivitelerinin düzenlenmesi ve embriyonik gelişimi içeren çeşitli mekanizmaları etkiler.

Bor yoksunluğu, kurbağalar, zebra balığı, sıçan ve fareler gibi organizmalarda üreme ve gelişmeyi etkiler. Kemiğin mineral kısmı esas olarak kalsiyum ve fosfattan oluşur.



Şekil 2.14. Borun sağlığını etkileri (208)

Bor, kalsiyum metabolizması ve buna bağlı olarak kemik metabolizması için faydalı bulunmuştur. Alüminyum, bor, kadmiyum, krom ve kurşun gibi kan dolaşımındaki farklı metaller, kemiğin mineral çıkarılması sırasında iskelet dokusuna afinite gösterir. Menopoz sonrası kadınlarla yapılan bir araştırma, daha fazla bor alımının daha fazla plazma östrojen ve testosteron ve daha az kalsiyum atılımına neden olduğunu göstermiştir. Menopoz sonrası dönemde kadınlarda östrojen seviyelerinin azalması nedeniyle kemik kaybı gözlemlendi. Gallardo Williams, diyetle bor artışının, plazma 17β-estradiol ve testosteron düzeylerinin yükselmesine ve idrarda kalsiyum atılımının engellenmesine yol açtığını öne sürdü (206).

Bozulmuş bağışıklık sistemine sahip farelerin diyetine borik asit eklendiğinde, farelere nakledilen insan prostat kanseri tümörlerinde büyümenin azaldığı görülmüştür.

Ayrıca doza bağımlı bir şekilde prostat kanseri hücre dizileri DU-145 ve LNCaP'nin büyümesini ve proliferasyonunu inhibe eder. Proliferasyon ve yaşlanmanın moleküler belirteçleri göz önüne alındığında, borik asidin siklinA-E, MAPK proteinlerini azalttığı ve DU-145 hücrelerinde hücre ölümü yerine yaşlanma benzeri bir morfolojiyi indüklediği bulundu. Artan borik asit konsantrasyonlarının NAD^+ 'ı bağladığı ve DU 145 hücrelerinde NAD^+ kaynaklı Ca^{2+} salınımını engellediği gösterilmiştir. Ca^{2+} kanalının inaktivasyonu nedeniyle ER Ca^{2+} seviyeleri düştüğünde; ER stresi, sitoplazmik stres granüllerinin oluşumu ve eIF2a/ATF4 yolu, fizyolojik miktarlarda borik asit ile tedavi edilen DU-145 prostat hücrelerinde buna göre uyarılır (206).

Çalışmalar ayrıca borik asit ve fenilboronik asidin aktin düzenlemesini etkilediğini ve dolayısıyla DU-145 prostat kanseri hücrelerinde hücre göçünü azalttığını göstermektedir. Fenilboronik asidin kanser hücresi göçünün daha güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur. Borik asidin sitokinezde kusurlara neden olduğu ve bu nedenle *Saccharomyces cerevisiae*'de tomurcuk boynunda hücre iskeletinin stabilizasyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Aflatoksinler *Aspergillus* mantarı tarafından üretilir. Gıda ürünlerini kontamine edebilirler ve tüketildiğinde bazıları hayvanlar ve insanlar üzerinde kanserojen etkilere sahiptir. Borik asidin, Aflatoksin B1'in neden olduğu oksidatif hasara karşı DNA için koruyucu bir ajan olma potansiyeline sahip olduğu ileri sürülmektedir.

Bor yoksunluğu insanlarda ve hayvanlarda büyümenin bozulmasına, anormal kemik gelişimine, kandaki steroid hormon düzeylerinde azalmaya, idrarla kalsiyum atılımında artışa ve makromineral durumda değişikliklere neden olur (206).

Borun kalsiyum, magnezyum, triaçilgliseroller, glukoz, amino asitler, reaktif oksijen türleri, 17β -estradiol, kalsitonin, 25-hidroksikolekalsiferol gibi hormonlar gibi diğer maddelerin metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca hayvanlarda ve insanlarda bor eksikliğinin beynin elektriksel aktivitesinde, kısa süreli hafızada ve görevleri yerine getirme becerisinde azalma ile de ilişkili olduğu, bor takviyesinin ise beyin fonksiyonlarını artırdığı bulunmuştur. Borunun bu etkileri, bor tarafından sinir-impuls iletimini sağlayan zarlardaki değişikliklere bağlanabilir (213).

2.4.4. Bor Alımı ve Taşıma Mekanizmaları

Bor homeostazını korumak için hücre içinde veya dışında taşınan bor seviyelerinin hücrel mekanizmalar tarafından düzenlenmesi gerekir. Bora doğrudan topraktan maruz kaldıkları için bor etkileri öncelikle bitkilerde gözlemlenebilir. Böylece bor taşınımı ve tolerans mekanizmaları ile ilgili birçok bitki geni tanımlanmıştır. Bitkiler boru topraktan borik asit formunda emer. Kökler tarafından alınır ve sürgünlere taşınmak üzere ksileme yüklenir. Bu uzun mesafeli taşıma sırasında bor, terleme akımlarını takip eder ve olgun yaprakların kenarlarında birikir (206).

Toprakta bor mevcudiyeti düşük olduğunda, aktif taşıma mekanizmalarının varlığını gösteren boron almak için membran proteinlerine ihtiyaç vardır. Bor taşınımı ve toleransı ile ilgili birçok bitki geni tanımlanmıştır. Borik asit, düşük bor koşullarında ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) konsantrasyon gradyanına karşı taşınır. Ayçiçeklerine benzer şekilde *Arabidopsis thaliana*, bor sınırlaması altında bir konsantrasyon gradyanına karşı ksilemde bor biriktirir. Bir bor akış taşıyıcısı olan BOR1, bu ksilem yüklemesinden sorumludur. Maya, birçok bitki bor toleranslı genin karakterizasyonu için model organizma olarak kullanılmıştır. Maya BOR1 plazma membranında lokalizedir ve borik asit akışında rol oynar. BOR1, DUR3 ve FPS1'e ek olarak, mayada bor toleransında rol oynadığı bulunmuştur. Ancak bu taşıyıcıların bor detoksifikasyonundaki işlevleri net değildir (206).

2.4.5. Bor ve Yara İyileşmesi

Bor için minimum gereksinim, hayvanlarda ve insanlarda kesin olarak belirlenmemiştir. İnsanlarda olağan diyet bor tüketimi yetişkinlerde günde 1-2 mg'dır. Analitik yöntemlerdeki gelişmeler nedeniyle bu değerler daha önce hesaplananlardan daha düşüktür (214).



Şekil 2.15. Borun en fazla bulunduğu gıdalar

İnsanlar için besinlerdeki borun ana kaynakları meyveler, sebzeler, yumrular ve içme sularıdır. Borun çözünür inorganik formlarının biyoyararlanımı yüksektir, oysa organik formları muhtemelen insanlar için mevcut değildir. Bor ve polihidroksil ligandları arasındaki kompleksler kolayca tersine çevrilir (örneğin pH'nın değişmesiyle) ve bu nedenle yutulan borun çoğu muhtemelen $B(OH)_3$ 'e dönüştürülür ve emilir. Bor, biyolojik sıvılarda esas olarak $B(OH)_3$ olarak bulunur ve çok çeşitli ligandlarla kompleksler oluşturduğu için muhtemelen spesifik bir bor taşıyıcısı yoktur. Plazmadaki bor konsantrasyonları, coğrafi bölgeye göre geniş ölçüde değişir: 15 ve 100 $\mu g/l$ arasındaki değerler çeşitli yazarlar tarafından rapor edilmiştir, oysa plazma değerlerini 300 ile 900 ng/l arasında bulmuştur topraktaki bor konsantrasyonunun yüksek olduğu öne sürdüler. Diyetle düşük bor alımı (g vücut ağırlığı başına 0.4 Ilg B'nin altında) gelişmekte olan sığınlarda büyümeyi azaltırken, bor ile desteklenmiş diyetler hayvan ve insan fizyolojisinin farklı yönlerini etkiler. Diyet diğer besinlerde de eksik olduğunda etkiler daha belirgindir (215).

2.5. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), genetik alanındaki değer ve önem kazanan buluşlardan biridir. PZR, De-oksiribo Nükleik Asit (DNA) aranması amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş, yüksek ölçüde duyarlı ve özgün bir

teknik olarak tanımlanmış ve bu tekniğin bulucusu, tanı ve araştırma olanaklarında evrime yol açan bu başarısından ötürü Nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır (216).

Bu evrimsel buluştan sonra diyagnostik mikrobiyoloji yeni bir sürece girmiş, nükleik asit amplifikasyon teknolojileri mikroorganizmaların fenotipik özelliklerinin tanımlanması temeline dayanan standart tanı tekniklerinin yerini almaya, hatta bazı mikroorganizmaların tespiti için altınstandart olmaya başlamıştır. PZR teknikleri infeksiyonların teşhisi, özel amaçlarla genlerin belirlenmesi, özel DNA parçalarının klonlanmasında önem kazanmış, bakteri kontaminasyonu, genetiği değiştirilmiş DNA'nın varlığı ve gıda içeriklerinin özgünlüğünün kontrolü gibi yeni alanlarda da incelemelere olanak sağlamıştır (217).

PZR geleneksel metotların yerini tamamen alamaz. Fakat yavaş çoğalan ve teşhisi günler/haftalar alan mikroorganizmalar ile, doğal konaklarının dışında üretilmesi çok zor olan ve bu nedenle tespit edilemeyen mikroorganizmaların teşhisinde PZR'ın kullanımı önem kazanmıştır. PZR ile yakın türler arasında ya da alt türler arasında ayırım yapılabilir ve klinik örnekler ön zenginleştirmeye gereksinim duymadan hızlı şekilde sonuca varılabilir (217). Günümüzde insan ve hayvanların hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik çalışmaları, PZR tabanlı tekniklerin uygulamaya sokulmasıyla olağanüstü bir hız ve başarı kazanılmıştır. Bakteri, virüs, mantar veya parazitin izolasyonu ve identifikasyonu için, oldukça uzun ve zahmetli bir dizi laboratuvar işleminin yapılmasını gerektiren uygulamalara PZR'ın devreye girmesiyle gerek kalmamıştır (217).

PCR, enzim katalizli DNA sentezi başlatmak ve sonlandırmak için sıcaklık döngüsünü kullanır. Her döngü şunlardan oluşur: üç aşama:

- Şablon DNA'nın ısı ile denatürasyonu (genellikle $>90^{\circ}\text{C}$)
- İki sentetik oligonükleotit primerinin denatüre şablon DNA'ya tavlanması. Genellikle 20-25 nükleotit uzunluğundaki bu primerler, şablonun DNA dizisine ilişkin önceden var olan bilgiler kullanılarak tasarlanır. İki primer, hedef DNA'nın zıt iplikçiklerindeki dizileri tamamlayıcı niteliktedir. Primerler için bağlanma yerleri, araştırmacının arzu ettiği gibi, yalnızca birkaç nükleotid veya birkaç bin nükleotid ile ayrılabilir.
- Bağlı primerlerin 3' ucunda DNA sentezinin başlatıldığı uzama. Primerlerin uzaması, termostabil bir DNA polimeraz tarafından katalize edilen enzimatik bir reaksiyonda 55°C ile 70°C arasındaki sıcaklıklarda meydana gelir (219) .

2.5.1. PZR Tekniğinin Temel Bileşenleri

PZR tekniğinde kullanılan temel bileşenler hedef materyal olarak DNA veya RNA (templeyt), taq DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksinükleotitler, tampon sıvı, pH, Mg+2 iyonlarıdır bu temel bileşenler biraraya getirilerek optimal koşullarda PZR reaksiyonu kurulur (218). PZR reaksiyonundaki optimal olmayan koşullar sadece kullanılan bileşenlerden değil birçok sebepten kaynaklanabilir. Uygun olarak sağlamayan primerlerin, zaman ve sıcaklık parametrelerinin kullanımı (özellikle annealing sıcaklığı), polimeraz enzimi kalitesi ve Mg+2 konsantrasyonu en önemli etkileyen parametrelerdendir.

Mg+2 Konsantrasyonu

Tek bir reaksiyonda her örneğe farklı miktarlarda Mg+2 koyularak yapılan denemeler kısa süre içinde sonuçlandırılabilir. PZR reaksiyon karışımında ortalama 0.5-2.5 mM Mg+2 olması gereklidir. Mg+2 iyonları enzim aktivitesine, primer bağlanmasına ve DNA erime ısısına etki edebilir. dNTP'ler Mg+2 iyonunu bağladıkları için dNTP konsantrasyonundaki miktar artışı serbest Mg+2 konsantrasyonunda azalmaya yol açabileceğinden gerekli şartlarda uygun olarak miktar artırılması yapılmalıdır. Mg+2 iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz enzimi aktivitesini uyarır, çift iplikli DNA'nın erime derecesini (Tm) artırırlar ve primer templeyt DNA hibridizasyonunu sağlarlar. Bu nedenle Mg+2'un PZR'ın özgünlüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Düşük Mg+2 konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg+2 konsantrasyonu ise spe-sifik olmayan ürün oluşumuna neden olmaktadır (218).

Primerler

Primerler tekrarlanan dizilerden oluşmayan, sentetik olarak kolayca hazırlanabilen ve 15-40 oligonükleotitden oluşan primerler, kullanım amaçlarına göre değişiklik göstermektedirler. Primerlerin üzerinde bulunan baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı, başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır. Primer dizaynı yapılırken dört bazın da eşit sayıda kullanımına dikkat edilmeli, primerler tekrarlı bölgeler içermemeli ve primer çiftlerinin 3' uçları birbirlerine komplementer yapıda olmamalıdır. Primerlerin yapısında %50-60 kadar G+C bazlarının bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur. Ayrıca böyle birleşmeler, yüksek sıcaklıkta oluşturulan reaksiyon

sırasında görülebilecek non spesifik bağlanmaları da azaltmaktadır (218). Primer konsantrasyonunun genel olarak 0.1-0.5 μ M oranları arasında olması tavsiye edilmiştir.

Yüksek primer konsantrasyonları primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır bu oranlarada dikkat edilmelidir (217).

dNTP'ler

PZR'da ayrı reagent olarak kullanılan dNTP'lerin final konsantrasyonları 20-200 μ M arasında olmalı ve 4 nükleotit de aynı oranda bulunmalıdır. Hedef olmayan alanlarda yanlış bağlanmaları azaltmak için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu kullanılmalıdır. Ancak bazı mikroorganizmalar vardır ki, çoğaltılacak gen bölgesinden dolayı bazı bazların diğerlerinden az ya da çok olması gerekebilir (çok Adenin-Timin, az Guanin - Sitozin gibi). Nükleotitlerin optimal konsantrasyonunu tespit etmek için amplifiye edilecek ürünün uzunluğu, MgCl₂ ve primer konsantrasyonları, çoğaltılmış ürünün büyüklüğü ve PZR döngü sayısı dikkate alınmalıdır. Nükleotitlerin düşük konsantrasyonda kullanılması PZR'ın özgünlüğünü arttırmaktadır (217).

2.6. Western Blot Analizi

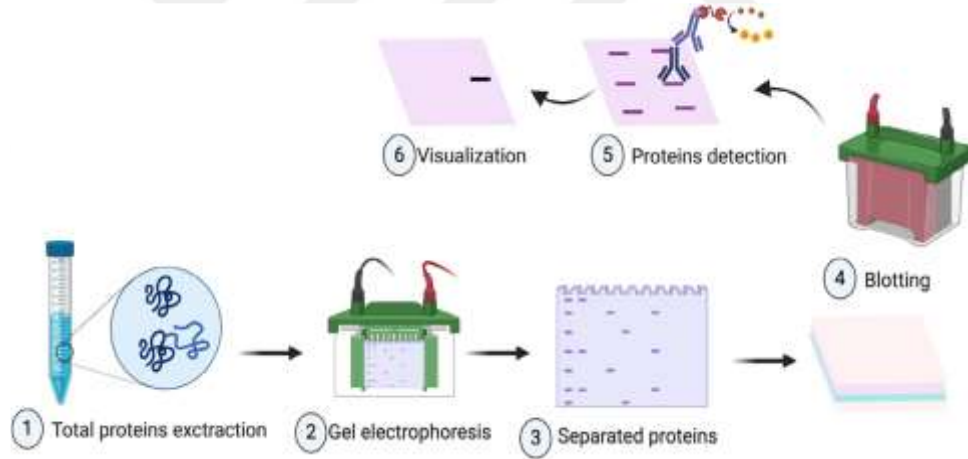
Western blot, protein-protein etkileşimlerinin yanı sıra posttranslasyonel modifikasyonların (PTM) mevcudiyetini, nispi bolluğunu, nispi kütesini, mevcudiyetini araştırmak için basit ama güçlü bir prosedürdür. Western blot'un bu uygulamaları, hem akademik araştırmalarda hem de teşhis ve terapötik testlerde değerli bilgiler sağlar. İlk olarak Towbin ve diğerleri tarafından açıklanan bu işgücü yöntemi, antikorların numune karışımında bulunan hedef antijenlerle spesifik etkileşimine dayanır. Örnek proteinler, bir protein jeli üzerinde ayrıldıktan ve zara aktarıldıktan sonra, hedef proteini bağlamak ve görselleştirmek için birincil ve ikincil antikorlar kullanılır. Western blot başlangıçta bir evet/hayır yanıtı vermeyi amaçlıyordu. Bir protein örneğinde hedef proteinin varlığı hakkında. Bu niteliksel yöntem, basit görsel değerlendirmeye hedef bantların varlığını doğrular. Sistem biyolojisi alanındaki artış ve karmaşık biyolojik sistemleri anlama ihtiyacıyla, Western Blot artık nitel veri üretmekle sınırlı değil (220).

Western blot analizinin ve diğer immünoassaylerin tekrar üretilebilirliği, bilim camiasında devam eden bir endişe kaynağıdır. İmmün lekeleme süreci, subjektif seçimler ve kullanıcı uzmanlığından etkilenen birbirine bağlı karmaşık bir dizi adımı içerir. Deneysel tasarım, metodoloji ve teknikteki farklılıklar önemli hata kaynakları olabilir. Bu değişkenlik, bir hatanın verilerin yanlış yorumlanmasına yol açabileceği Western blot verilerinin kantitatif analizi için özellikle rahatsız edicidir. Her deney için

kullanılan reaktifler ve parametrelerdeki görünüşte küçük veya önemsiz farklılıklar, sonuçlar üzerinde şaşırtıcı derecede güçlü bir etkiye sahip olabilir (221). Dikkatli deneysel tasarım ve iyi karakterize edilmiş yöntemler, yaygın tuzaklardan kaçınmak ve tekrarlanabilir sonuçlar için hangi test parametrelerinin en kritik olduğunu belirlemek için gereklidir (221).

Ancak tekrar üretilebilirlik doğruluğu garanti etmez; bir tahlil hatalı olan kesin veriler üretebilir. Doğruluk ve kesinlik, tekrarlanabilirliğin önemli ancak farklı yönleridir. Doğruluk, ölçülen değerlerin bir numunedeki hedefin veya analitin gerçek değerini ne kadar yakından temsil ettiğini gösterir (221).

Bu değerler deneysel örnekte gerçek bir değişikliği veya farklılığı yansıtıyor mu? Kesinlik, test ölçümlerinin tekrarlanabilirliğini, varyasyonunu ve hatasını tanımlar. Test birçok kez tekrarlanırsa, sonuçlar ne kadar benzer? Western blot verilerinin kantitatif analizi, bildirilen gözlemlerin deneysel numuneler hakkında anlamlı bilgiler iletmesini sağlamaya yardımcı olmak için hem kesinlik hem de doğruluk için çaba göstermelidir (221).

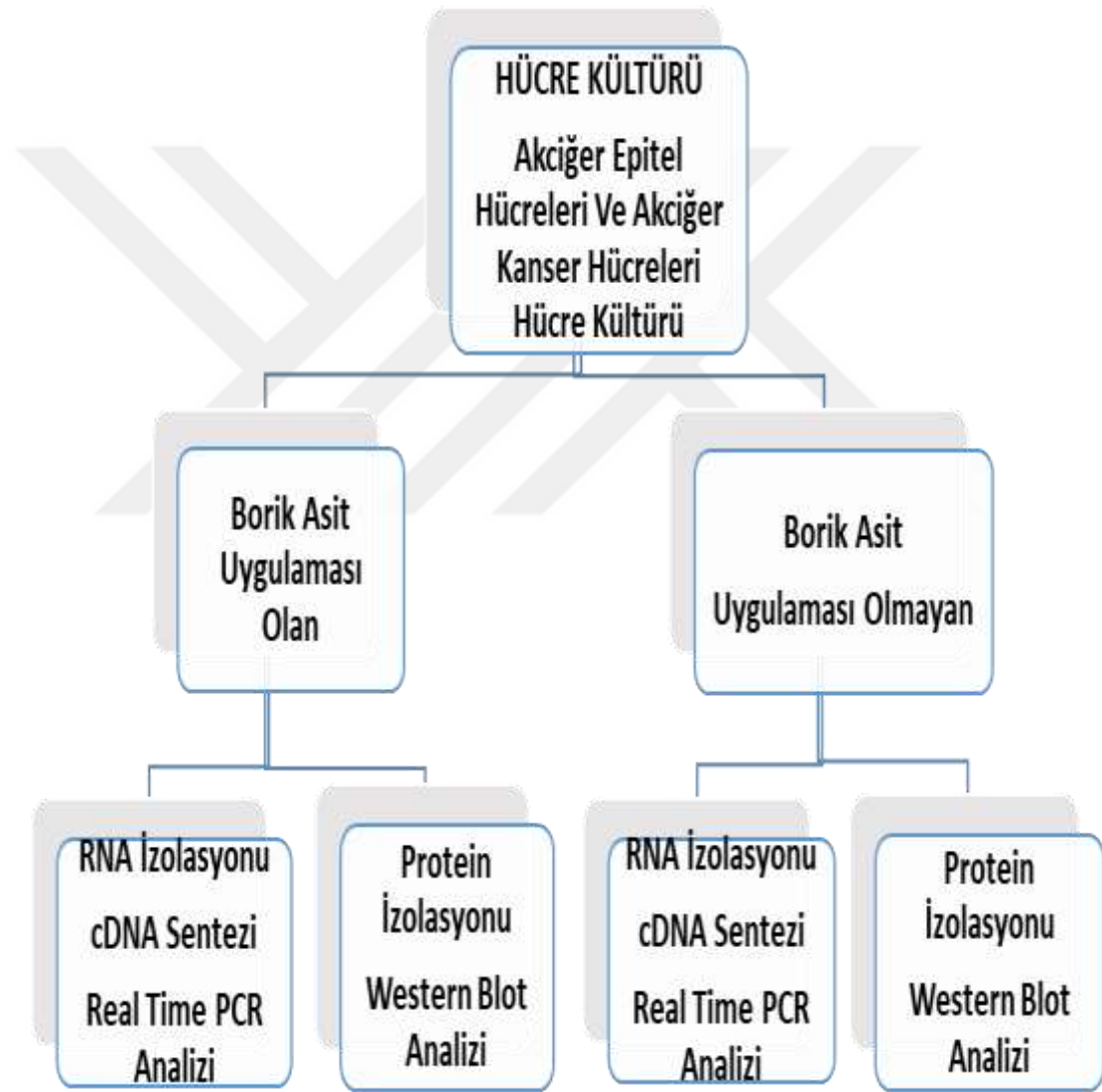


Şekil 2.16. Western blot testinin iş akışı. İzole edilmiş proteinler önce jel elektroforezi kullanılarak boyutlarına göre ayrılır. Ayrılan proteinler daha sonra bir nitroselüloz veya PVDF lekeleme zarına aktarılır. Blotlanmış membran daha sonra inkübe edilir. Birincil ve konjuge ikincil antikorlar. Son olarak, kullanılan sekonder antikora bağlı olarak, hedef protein şu şekilde tespit edilir: kolorimetrik, flüoresan veya lüminesan yöntemler

Bu gözden geçirme, Western blotlardan ölçülebilir verileri gerçekleştirmek ve toplamak için yaklaşımın adım adım takibini sağlamayı amaçlamaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, A549 ve BEAS2B hücreleri model olarak kullanılarak borik asit toksisitesine bağlı hücresel stres cevapları ya da biyolojik etki mekanizmalarının araştırılarak ve ER stresi yanıt yollarında görev alan bazı genlerin, proteinlerin ve mRNA'ların ifadelenmesi araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre istatistiksel analiz yapılacaktır. Çalışmanın iş akış planı ise Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Deneysel Çalışma İş Akış Planı

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar ve Kimyasallar

Deney çalışmaları süresince kullanılan cihazlar Tablo 3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deney aşamalarında kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
Vorteks	VWR
Mikrosantrifüj	VWR
Soğutmalı Santrifü	Nüve-NF800R
SDS-PAGE	BIO-RAD
Güç Kaynağı	BIO-RAD
Jel Görüntüleme Cihazı	Syngene
CO ₂ İnkübatör	PHCbİ - MCO
Laminar Kabin	ESCO-Sentinel GOLD
Thermal Cycler	BIO-RAD T100
Otoklav	Nüve
-80° Ultra Soğutucu	Thermo Scientific
-20° Buzdolabı	Vestel
Distile Su	Millipore
Nanodrop	Biospec
Mikroskop	BAB-TAM-F
Real-Time PCR	StepOnePlus
Hassas Terazı	Shimadzu
pH Ölçer	Metler Toledo
Isı Bloğu	Thermo Scientific
Hücre Görüntüleme Cihazı	Julı Brom Nano Entek

Deney çalışmaları süresince kullanılan kimyasallar Tablo 3.2’de verilmiştir. Deney çalışmaları sırasında kullanılan kimyasalların tamamı analitik saflıktadır ve herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmamıştır. Kullanılan tüm sulu çözeltiler distile su ve ultra-pür su kullanılarak hazırlandı.

Tablo 3.2. Deney aşamalarında kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Firma
Borik Asit	PanReac AppliChem
PBS	Nutri Culture
FBS	Capricorn
Trypsin-EDTA	Capricorn
DMEM (High Glukoz)	Sigma
DMSO	Fisher Sci
Pen / Strip	Gibco
Etil Alkol	Sigma
Metanol	Sigma
Tris-HCL	Sigma
EtBr	Sigma
Asetik Asit	Sigma
Proteaz İnhibitör Kokteyl	Sigma
Tris-Base	PanReacAppliChem
TritonX	PanReacAppliChem
SDS	PanReacAppliChem
Sodyum Klorür (NaCL)	PanReacAppliChem
Glisin	PanReacAppliChem
Tween-20	PanReacAppliChem
Bis-Acrylamide	PanReacAppliChem
Acrylamide	PanReacAppliChem
2-Mercapto Etanol	PanReacAppliChem
Sodyum Deoksikolat	PanReacAppliChem
HCL	İsoLab
Trypon Blue	BI
245 kDa Protein Ladder	Abcam
Western Blot ECL Substrat	Thermo Fisher

Deney çalışmalarında kullanılan kitler Tablo 3.3’de firmaları verilmiştir.

Tablo 3.3. Deney aşamalarında kullanılan kitler

Kit Adı	Firma
RNA İzolasyon Kiti	İnvitrogen RNA Mini Kit
cDNA Kiti	BioLabs NEW ENGLAND
RT-PCR için Syber Green	Ampliqon 2X With High ROX Master Mix Green

3.2. Metot

3.2.1. DMEM Besiyeri ve Borik Asit Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

Deney çalışmasında A549 ve BEAS2B model alınmış hücre hatları için 500 ml DMEM (H.G) ticari besiyeri %10 oranında fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 oranında

penicilin-streptomisin ile desteklenerek medium hazırlandı. Hazırlanan besiyeri hücre kültürü uygulamalarına kadar +4°C’de hazır bir şekilde saklandı.

Borik asitin hücre kültürü çalışmalarında kullanıma hazır halde bulundurmak için, hassas terazide 1.85 g katı borik asit tartıldı ve bir miktar otoklavlanmış distile su içerisinde çözdürüldükten sonra, son hacim 60 ml olacak şekilde 500 mM borik asit çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan borik asit çözeltisi, hücre kültürü uygulamalarında kullanımına kadar +4°C’de hazır bir şekilde saklandı.

3.2.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Çözdürülmesi

Çalışmada A549 ve BEAS2B hücre hatları kullanıldı. Bu hücrelerden A549 Adenokarsinom Akciğer kanser hücresi olarak, BEAS2B ise insan sağlıklı bronşial epitel hücre olarak çalışmaya dahil edildi.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri

	A549	BEAS2B
Organizma	Homo sapiens	Homo sapiens
Doku	Akciğer Kanser	İnsan bronşial / Akciğer
Hastalık	Adenokarsinom	Epitelyal
Hücre Tipi	Epitelyal	Epitelyal
Uygulamalar	Hücre Kültürü	Hücre Kültürü

Kriyojenik tüplerde -80 °C ultra dondurucuda stoklanan A549 ve BEAS2B hücre hatları üzerine 37 °C CO₂ li inkübatörde ısıtılmış besiyerinden 1 ml eklenip pipetaj yaparak hücrelerin homojen olarak çözündürüldü ve total hacim 5 ml olacak şekilde steril falkon tüplere alındı. 1000 rpm’de 7 dakika santrifüj işlemi uygulandıktan sonra üstte kalan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüp içerisinde kalan hücre pelleti üzerine 6 ml besiyeri eklenerek 25 cm²’lik kültür flasklarına transfer edildi. İnverted mikroskop yardımıyla flask içerisindeki hücreler kontrol edildikten sonra %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C’de kültüre edildi.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

Hücre kültür boyunca, 24 saatlik zaman dilimleri halinde, inverted mikroskop yardımıyla hücrelerin tutunması, gelişimi ve kontaminasyon açısından kontrolleri yapıldı. Hücreler, flaskın tabanının yaklaşık % 80’ini kapladıktan sonra pasaj için hazırlandı. Çalışma öncesi ön hazırlık aşamasında PBS, DMEM besiyeri, Tripsin-EDTA kullanıma hazır hale getirmek için 37 °C CO₂ li inkübatörde yaklaşık 45 dk

bekletildi. Bu işlem için, eski besiyeri steril serolojik pipet ile flasktan uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1.50 ml % 0.25'lik 1X Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37°C'lik inkübatörde yaklaşık 5 dk boyunca bekletildi. Flask tabanından kalkmış hücrelerin üzerine 4.50 ml taze besiyeri eklendikten sonra steril falkon tüpe alınarak 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek çöktüldü. Çöktürme sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti üzerine yeterli miktarda taze besiyeri eklenerek süspanse edildi ve diğer deneysel uygulamalarda kullanımı için hazırlandı.

Pasajlama sonrasında elde edilen hücrelerin bir kısmı diğer deneysel çalışmalarda kullanmak için ayrıldı ve kalan hücre solüsyonuna hücre kültürüne uygun %10 DMSO eklendikten sonra kriyojenik tüplere alındı. Sonraki kullanımlar için -80°C'de ve daha uzun süreli depolama için sıvı azot içerisinde saklandı.

3.2.4. Tripın Mavisi ile Hücre Sayımı ve Canlılığının Belirlenmesi

Kültürden elde edilen pelleti 5 ml besiyeri ile süspanse edildi. Tripın mavisi ile invert mikroskopta sayımı yapıp canlı hücre ve ölü hücre miktarları belirlendi. Çalışmayı yapmak için 10 µl hücre süspanسیونundan 10 µl'de Tripın mavisinden alınarak pipetaj yapılarak karıştırılıp Thoma lamı ile invert mikroskopta 10X10 kez büyütmede sayıldı ve aşağıdaki formül ile değerlendirilmesi yapıldı.

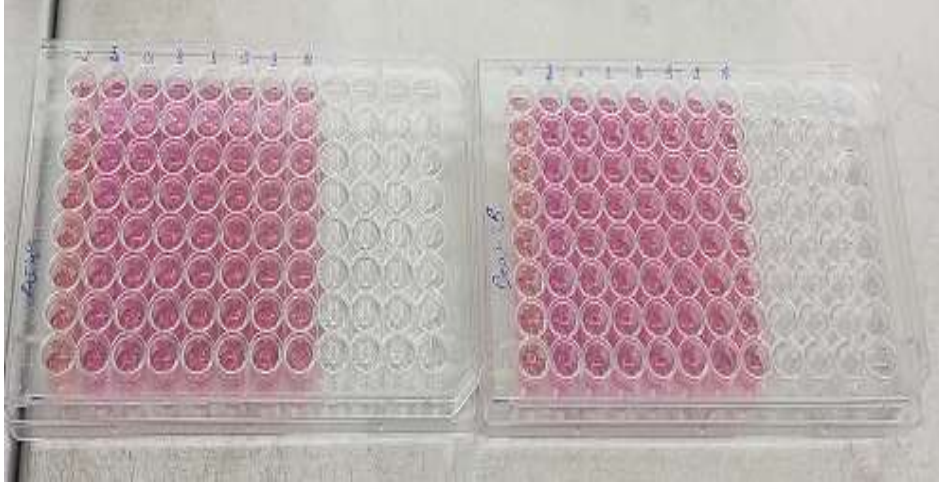
Mililitredeki hücre sayısı: Sayılan hücre sayısı x 2 x 10⁴

Canlı hücre oranı: Boyanmamış hücrelerin sayısı / Toplam hücre sayısı

3.2.5. Borik Asit Uygulaması ve Sitotoksisite Analizleri (MTT)

Çalışmada sitotoksisite analizleri için kolorimetrik yöntemlerinden biri olan MTT (3- [4,5- dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyl- tetrazolium bromide) oluşumu ölçüldü. Çalışmada hücre kültüründe süspanse olarak hazırlanan A549 ve BEAS2B hücre grupları 96 well platelere her bir kuyucuğa 10 bin hücre gelecek şekilde ekimler yapıldı ve 37 °C CO₂ li inkübatörde kültüre edildi. 24 saat kültüre sonrasında 1000 µM, 1100 µM, 1200 µM, 1250 µM, 1500 µM, 1750 µM, 2000 µM konsantrasyon grupları halinde Borik Asit uygulaması yapıldı(yapılan bu Borik Asit uygulaması 500 mM stok Borik Asit çözeltisinden alınarak uygulandı). 24 saat inkübatörde inkübe sonrasında her bir kuyucuğa 10 µl MTT eklendi ve sonrasında 4 saat inkübe için inkübatöre bırakıldı. 4 saat inkübe sonrasında, kuyucuklardaki MTT ve B.A'li eski besiyer uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenip spektrofotometrede 570 – 640 nm'de ölçüm alınıp ve IC₅₀ (hücre proliferasyonunun %50 oranında inhibe eden konsantrasyon

değeri).hesaplamaları yapılarak sitotokside konsantrasyonu belirlendi. Yapılan sitotokside çalışması Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Sitotokside MTT uygulaması

3.2.6. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

RNA izolasyonu için Invitrogen, by Thermo Scientific-PureLink RNA Mini Kit kullanıldı. Her hücre grubu için 25 cm²'lik kültür flasklarına 4x10⁵ hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonra yeterli hücre yoğunluğuna ulaşıldı ve 1250 µM konsantrasyonunda Borik asit uygulaması yapıldı 24 saat inkübe için inkübatöre bırakıldı. Deneyin 3. Günü RNA izolasyonu için flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreleri 1x PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreleri flasklarda kaldırmak için 1.50 ml 1x Tripsin-EDTA uygulandı ve 4.50 ml besiyeri ile Tripsinin işlevi durduruldu bu işlem sonrasında steril falkon tüplere alınarak 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında üst kısımdaki süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Falkon içerisindeki pellete liziz buffer eklenerek süspanse hale getirilip kit protokolü uygulandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA molekülünün saflığı ve miktarı tayin etmek üzere son kısımda kullanılan elüsyon solüsyonu blank olarak kullanıldı. İzolasyon sonrasında RNA örneklerinden 1 µl alınarak nanodrop'ta ölçümü yapılarak konsantrasyon tayini yapıldı. Spektrofotometrik olarak O.D260/230 ve O.D260/280 değerleri alınıp, 1 µl RNA miktarı nanogram birimi olarak tespit edildi. Konsantrasyonları belirlenen hücre gruplarına ait RNA'lardan cDNA sentezi için BioLabs, First Strand cDNA Synthesis Kit'i kullanıldı ve kit'e ait protokol uygulandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. cDNA sentez reaksiyon mix değerleri

	A549	A549-B.A	BEAS2B	BEAS2B-B.A
Total RNA(1-6 µl)	2.5 µl	1.5 µl	6 µl	6 µl
d(T)23VN(50µM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
UP-Su(değişken)	3.5 µl	4.5 µl	0 µl	0 µl
Total hacim	Tüm gruplar 8 µl hacimde olacak			
	65 °C' de 5dk denature edilir			
M-MuLV Reak. Mix(2x)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
M-MuLV Enz. Mix(10x)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Total hacim	Tüm gruplar 20 µl hacimde olacak			
	cDNA sentez reaksiyonu için 42°C' de 1 saat inkübasyona bırakılır			
	İnkübasyon sonrası Enzim inaktivasyonu için 80°C'de 5 dk bekletilir ve cDNA' lar - 20 de saklanır			

3.2.7. RT-PZR

RT-PZR çalışma öncesinde, reaksiyon için primer çiftlerinin bağlanma sıcaklıklarını optimizasyonu yapıldı (Tablo 3.6). Optimizasyonu yapılan primer çiftlerinin spesifik dizileri aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 3.7).

Tablo 3.6. RT-PZR için sıcaklık optimizasyonu

Primerler	Önerilen Sıcaklık	Çalıştırıldığı Aralık	Saptanan Sıcaklık
XBP1	51-55 °C	55-61°C	60°C
PERK	51-55 °C	55-61°C	60°C
MAOA	51-55 °C	55-61°C	60°C
ATF6	51-55 °C	55-61°C	60°C
ACTB	59-65 °C	55-61°C	60°C

Tablo 3.7. Genlerin bağlanma bölgelerine göre spesifik primerleri

Primerler	Ön primer (F)	Arka primer (R)
XBP1	F: TTGACCACATATATACCAAGCCC	R: GGTCACTCTTCTACAGGTTCTTCC
PERK	F: AATCATAGCTCCTTCACCACAAA	R: CATCTTCCACATCACAGTCTGTA
MAOA	F: CTTCTCCTCAGGGTTCAGCA	R: GGAAGCTGGACACTGAGGAT
ATF6	F: TCTCGTGGCCTTCTTGTTCT	R: CAACCGCTACCCACCTTTTC
ACTB	F: ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGT	R: CACCTTCTACAATGAGCTGCGTG

XBP1: X kutusu bağlayıcı protein 1, PERK: PRKR Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (ökaryotik translasyon başlatıcı faktör), MAOA: monoamin oksidaz A, ATF6: transkripsiyon aktive edici faktör 6, ACTB: PS1TP5-Bağlayıcı Protein

Primer çiftleri için çalışma aşamasında optimize edilmiş bağlanma sıcaklıkları ile PZR reaksiyonları kuruldu. PZR işlemleri Applied Biosystems StepOnePlus Real time PCR sistemine özgü yazılımı ile PZR reaksiyonu kuruldu. Optimizasyonu yapılan primer çiftleri için çalışmada kullanılan hücre gruplarından elde edilen cDNA örnekleri içeren ve içermeyen kontrol grupları için 3'er kez tekrarlı örnekler 96 well platelere girildi. PZR reaksiyonu 40 döngü olup her bir reaksiyon için kullanılan içerik bilgileri Tablo 3.8' da verilmiştir.

Tablo 3.8. RT-PZR reaksiyon konsantrasyonları

PZR Reaksiyonunun Temel Bileşenleri	
cDNA	1-2 µl(150ng)
Primer	1 µl (200 nM)
Master Mix Sybr Green High Rox	10 µl
UP-Su	7-8 µl
Total Hacim	20 µl

Tabloda verilen cDNA ve UP-Su değerleri değişkenlik göstermektedir 150 ng konsantrasyona denklik sağlanabilmesi için yapılmıştır

PZR reaksiyonu 95 °C 10 dk aktivasyon işleminin ardından, 15 sn 95 °C ve 30 sn 61 °C (ilgili primerlerin bağlanma sıcaklığı) olmak üzere 40 döngü boyunca devam etti. Amplifikasyonun sonunda gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin miktarını (kat cinsinden) belirlemek amacıyla yapılan erime eğrisi ve relatif kantitasyon analizleri Aktin Beta (ACTB) referans geni (housekeeping genes) kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. PZR döngü koşulları ise Tablo 3.9'da gösterilmiştir

Tablo 3.9. RT-PZR reaksiyonu döngü koşulları

Faz	Zaman	Isı	Döngü
Başlangıç ısısı	10 dk	95 °C	1 döngü
Denatürasyon	15 sn	95 °C	40 döngü
Annealig	30 sn	61 °C	40 döngü
Elongasyon	15 sn	72 °C	40 döngü

3.2.8. Protein İzolasyonu ve Protein Miktarının Belirlenmesi

Hücre kültürü PZR reaksiyonu için hazırlanmış hücre grupları ile aynı koşullarda hazırlandı. İmmüno blot deneylerinde kullanılmak üzere hücrelerden RIPA modified

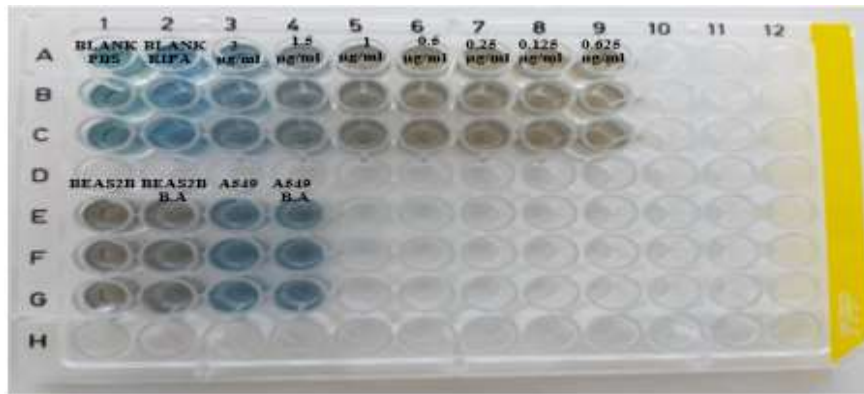
tamponu (tampon daha önceden kullanılmış ptokole uygun manuel hazırlandı Şekil 3.10) kullanarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla;

- Ortamdan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler soğuk PBS ile iki defa yıkandı.
- Hücreler üzerine RIPA Modified Lysis Buffer ilave edilerek 75 cm² lik flasttaki hücreler bir kazıyıcı yardımıyla kazındı ve pipetleme yapıp ependorf tüplerine aktarıldı (tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.).
- Örnekler buz üzerinde arada bir karıştırılarak 30 dk inkübe edildi.
- Tamamen hücre parçalanması/homojenizasyonu için 10 dk' da bir 15 saniye vorteks yapıldı.
- Örnekler +4 °C'de 12000 rpm'de 30dk santrifüj edildi ve süpernatant toplam hücresel protein olarak yeni ependorf tüplerine aktarıldı (protein lizati örneği). BCA tayini ile protein ölçümü yapıldı ABT Biosclences kit protokolü uygulandı ve spektrofotometrede 562nm ölçüm alındı ve hesaplamalar yapıldı(Şekil 3.3). Hesaplamalar sonucunda protein konsantrasyon tayinleri yapıldı Tablo 3.11' de verilmiştir.

Tablo 3.10. RIPA Modified Lysis Buffer hazırlama protokolü

RIPA Modified Lysis Buffer	
Kimyasallar	Miktarlar
Tris-HCL	50 mM
NaCL	150 mM
Tritonx	% 1
SDS	% 0.1
Sodyum deoksikolat	% 0.5
ddH ₂ O	100 ml

% 1 olarak en son proteinaz inhibitör kokteyl eklenir



Şekil 3.3. BCA ile protein konsantrasyon tayini

Tablo 3.11. Protein konsantrasyon değerleri

Hücre hatları	Protein miktarı(μg)
A549	5.11 μg
A549-B.A.	5.38 μg
BEAS2B	11.1 μg
BEAS2B-B.A.	10.1 μg

3.2.9. Western Blot (İmmünoblotlama)

Western blot immünogenetik, biyoloji ve moleküler biyoloji dallarında bir doku homojenatı veya ekstraktı numunesi içerisinde spesifik proteinlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir analitik metottur. Bizim çalışmamızda da hedef proteinle etkileşmesi amacı ile spesifik hayvan kökenli (tavşan ve fare) antikorlar kullanıldı kullanılan antikorlarla ilgili bilgiler Tablo 3.12’ de verilmiştir.

Tablo 3.12. Western Blotta kullanılan antikorlar

Antikorlar	MW(kDa)	Kaynak	Reaktivite
XBP1	45-55 kDa	Rabbit	Human, Mouse, Rat
PERK	140 kDa	Rabbit	Human
MAOA	62 kDa	Rabbit	Human, Mouse
ATF6	90-100 kDa	Mouse	Human, Mouse
ACTB	43 kDa	Mouse	Human, Mouse

Jel hazırlama

- SDS-PAGE aparatının camları sırasıyla ddH₂O ile silindi ve jelin dökülmesi için camlar ve spacerlardan oluşan aparat hazır hale getirildi.
- Jel konsantrasyonu proteinin moleküler ağırlığına göre seçildikten sonra running (depolama) jeli aparata döküldü (hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi).
- Üst yüzeyi izopropanol ile düzleştirilerek jelin hava almayıp donması için 30-40 dakika beklendi.
- Donan ayırma jelinin üzerinden membran kağıt izopropanol uzaklaştırıldı.
- Stacking (ayırma) jeli hazırlandıktan sonra aparata dökülerek tarak yerleştirildi ve donması için 30-40 dakika beklendi. Jel hazırlama temel bileşenleri Tablo 3.13’de verilmiştir.
- Camlar yürütme aparatı üzerine yerleştirilerek alt ve üst hazneler yürütme tamponu (1X SDS-PAGE Running Buffer) ile dolduruldu. Tarak donmuş

jelden yavaşça çıkartıldı ve kuyucuklar içerisinde kalan jel parçaları yüklemenden önce tampon ile temizlendi.

Tablo 3.13. Western Blod jel hazırlama temel bişenleri

Running Jel	Miktar - (%10)
1.5 Tris HCl pH 8.8	1250 µl
ddH₂O	2000 µl
30% Acryl/bis (37.5:1)	1670 µl
20 % SDS	25 µl
10% APS (Taze hazırlanmalı)	25 µl
TEMED	2.5 µl
Stacking Jel	Miktar - (%5)
1M Tris HCl pH 6.8	375 µl
ddH₂O	2088 µl
30% Acryl/bis 37.5:1	506 µl
20 % SDS	15 µl
10% APS (Taze hazırlanmalı)	15 µl
TEMED	1.5 µl

Örnek hazırlama

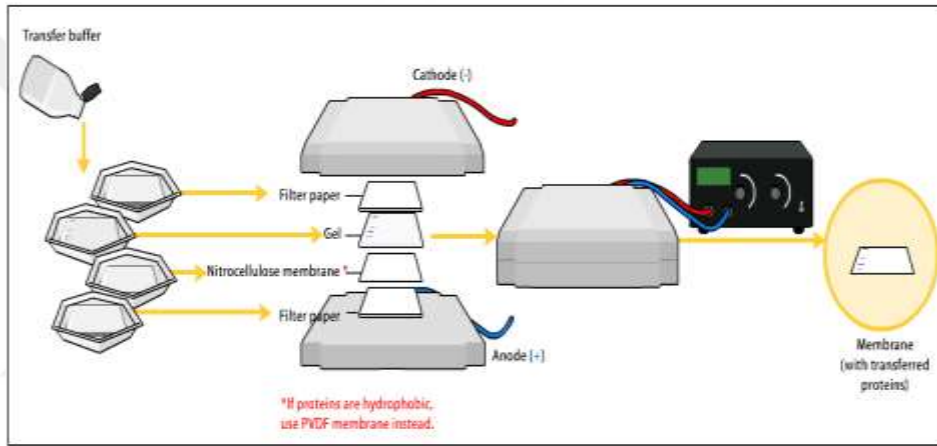
- Protein örneklerinden 100 µg proteine eşit miktarda hacim alınarak dH₂O ile 20 µl'ye tamamlandı. 20 µl tamamlanan örnekten 15 µl alınır.
- 15 µl örnek solüsyonu üzerine anyonik bir denatürasyon deterjanı olan Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) içeren 4X yükleme tamponundan (4X Laemmli sample buffer) 5 µl eklendi (kullanımdan önce gerekli hacimde 4X yükleme tamponu içerisine %10 oranında beta-merkaptoetanol eklendi ve kısa bir santrifüj yapıldı.).
- Hazırlanan örnekler 95-100 °C'de 5 dakika kaynatıldı edildi.
- Kaynatma sonrasında örnekler hazır olan jele yüklemek için rak üzerine alındı.

Proteinlerin jele yüklenmesi ve jelde yürütme

- Kaynatma sonrasında rak üzerinde bekleyen örnekler kısa bir santrifüj sonrası 15 µl hacimde jele yüklendi.
- Bir kuyucuğa protein boyutunun belirlenebilmesi ve elektroforetik yürüyüşün izlenebilmesi amacıyla moleküler ağırlık markerından (abcam 245 kDa) 5 µl yüklendi.
- Üst hazne elektrodu katod (-) ve alt hazne elektrodu anot (+) olacak şekilde oturtuldu jelde yürütme işlemi başlatıldı (100V'da ~1-2 saat)

Jelin membrana transferi

- Transfer için jel boyutundan büyük 4 adet whatman kağıdı ve bir adet jel boyutunda PVDF membran kesildi.
- İlk olarak Western-blot için transfer kağıdı 1X Semi-dry transfer tamponundan ıslatılan membranlar yarı-kuru transfer cihazı tablasına iki tanesi konuldu sonra Metanol ve transfer tamponla ıslatılmış PVDF membran ilk konulan transfer kağıdı üzerine konuldu sonrasında PVDF membran üzerine jel dikkatlice (jel ile membran arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde) yerleştirildi.
- Membran üzerine tekrar 2 adet transfer tamponuyla ıslatılmış transfer kağıdı kondu ve 7 dk transfer yapıldı Şekil 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Yarı-kuru emdirim yöntemiyle proteinlerin jelden membrana aktarılması

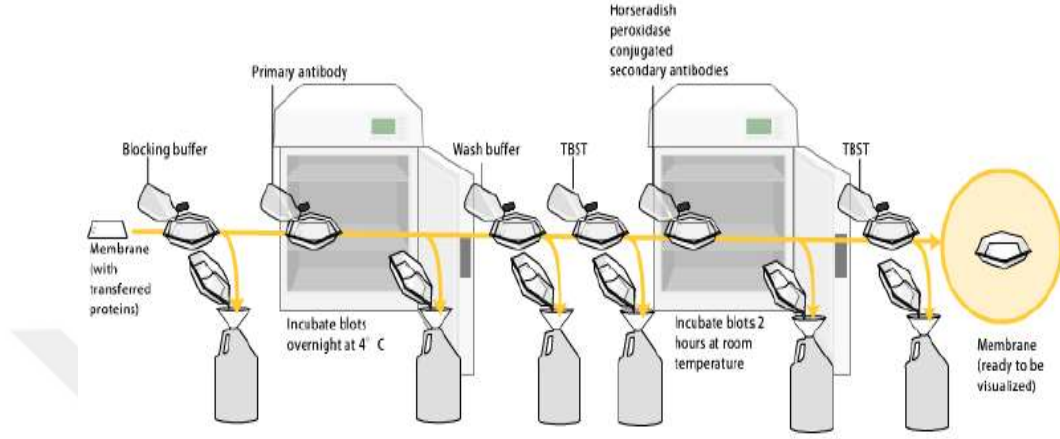
Süt tozu ile bloklama

- % 5 süt tozu ve 1x TBS-T tamponu ile hazırlanmış solüsyon içerisinde transfer edilmiş PVDF membran +15°C de çalkalamalı inkübatörde bir gece bekletildi.

Antikor ile işaretleme

- Süt ile blotlama yapıldıktan sonra membran 3 kez TBS-T ile 15 dk hafifçe çalkalayarak bir şekilde yıkandı.
- Primer antikor solüsyonu %5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde (20 ml) uygun dilüsyonda hazırlandı ve membran primer antikor ile gece boyu +4°C’de hafifçe çalkalayıcılı inkübatörde inkübeye bırakıldı. İşlem sonrası primer antikorlar saklandı.
- Membran primer işaretleme sonrasında TBS-T ile 3defa kısaca, 15 dakika olacak şekilde yıkandı.

- Ardından sekonder antikor solüsyonu %5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde (20 ml) uygun dilüsyonda hazırlandı ve membran sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1-2 saat inkübe edildi.
- Membran sekonder işaretleme sonrasında TBS-T ile 3defa kısaca, 15 dakika olacak şekilde yıkandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Western blot yönteminin bloklama, birincil ve ikincil antikorlar ile işaretlenmesi

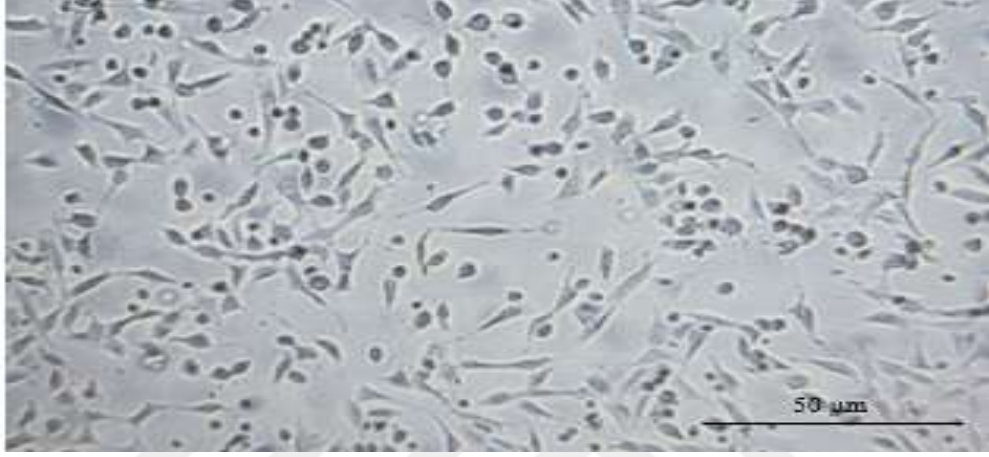
Bantların görüntülenmesi

- HRP enzimi ile işaretli ikincil antikor uygulanmış membranların kemilüminesans görüntülemesi için Western ECL Substrat (thermo) kiti kullanıldı. Substrat olarak kullanılan lüminol, HRP ve H₂O₂ varlığında okside olarak uyarılmış ürün 3- aminoftalatı oluşturur. Işıma, yalnızca enzim-substrat reaksiyonu sırasında oluşur. Yani geçici ve kısıtlı süre zarfında gözlenebilir. Substratın aşırı yoğun sinyal çıkışı pikogram düzeyindeki antijenin tespitini mümkün kılar. Sinyalin hassasiyeti, yoğunluğu ve süresi fotoğraflanarak kolaylıkla göstermektedir.
- Western ECL Substrate çalışma solüsyonları membran başına 3 ml olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılarak görüntülemeden hemen önce taze hazırlanır. Görüntüleme işlemi için membran hazırlanan substrat solüsyonuyla direkt ışıktan kaçınılacak şekilde 5 dakika inkübe edilir.
- Kemilüminesans görüntüleme için G:BOX syngene cihazı kullanıldı.
- Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra membran cihazın tablasına yerleştirilerek görüntüleme süreleri saniye ve dakika cinsinden seçilerek fotoğraflama işlemi yapıldı.

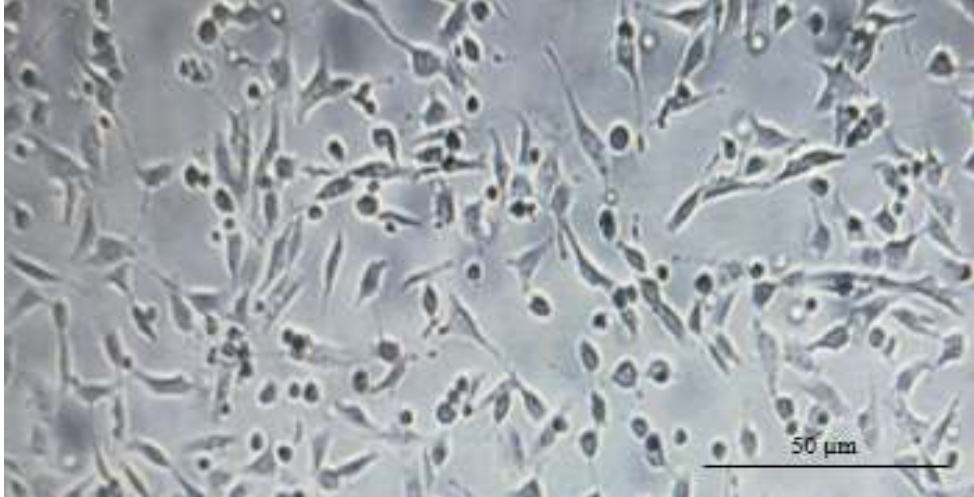
4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Morfolojik Güntüleri

Çalışmada kültürü yapılan A549 ve BEAS2B hücrelerin morfolojik görüntüleri hücre görüntüleme cihazı (Nano Entek) ile 4X büyütürük Şekil 4.1 ve 4.2 ‘te verilmiştir.



Şekil 4.1. BEAS2B hücreleri 4X (Hücre görüntüleme cihazı Julıb-Julı Brom Nano Entek ile görüntülenmiştir)



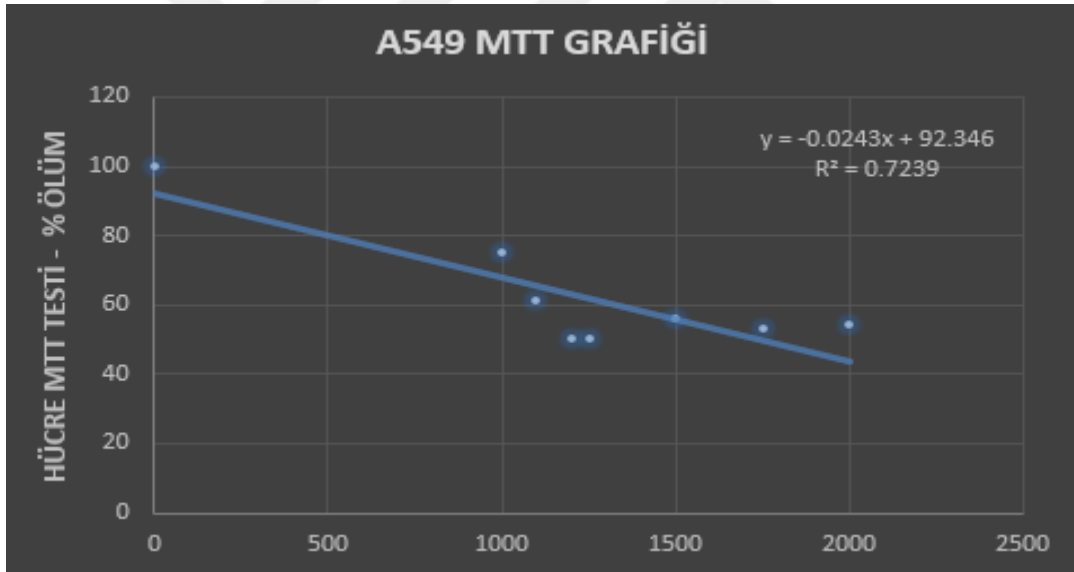
Şekil 4.2. A549 hücreleri 4X (Hücre görüntüleme cihazı Julıb-Julı Brom Nano Entek ile görüntülenmiştir)

4.2. Sitotoksosite Analizleri (MTT)

Sitotoksosite analizleri sonucu excell programı üzerinden IC50 değerleri hesaplanmış olup %'lik grafikleri çizildi sonuçlar Tablo 4.1 - 4.2' de ve Şekil 4.3 - 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.1. A549 hücre hattının MTT Sonuçlarının kontrole göre IC50 değeri

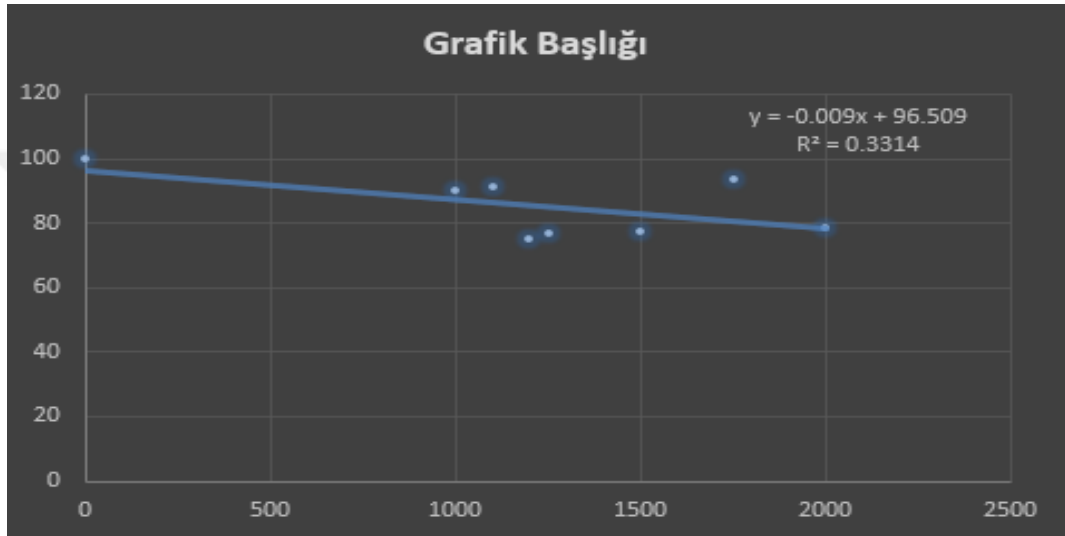
Borik Asit Miktarı (µM)	Ortalama	Kontrole Göre Oranı	% Lik değer
0	1.281333	1	100
1000	0.961333	0.750260081	75.02600807
1100	0.783333	0.611342251	61.13422506
1200	0.642	0.501040713	50.28614732
1250	0.644333	0.502861473	50.10407131
1500	0.722333	0.563735578	56.37355785
1750	0.684333	0.534078963	53.40789631
2000	0.699667	0.546046188	54.60461878



Şekil 4.3. A549 hücre hattının MTT grafiği

Tablo 4.2. BEAS2B hücre hattının MTT Sonuçlarının kontrole göre IC50 değeri

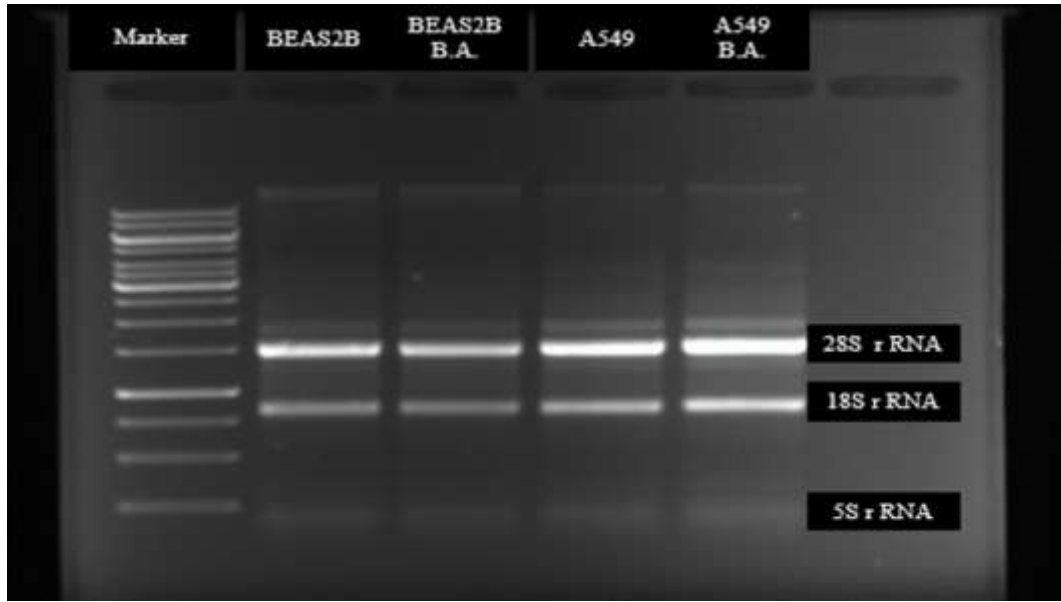
Borik Asit Miktarı (μM)	Ortalama	Kontrole Göre Oranı	% Lik değer
0	1.81933	1	100
1000	1.645	0.90418	90.4178
1100	1.66	0.91242	91.2422
1200	1.317	0.77043	77.0429
1250	1.40167	0.75357	75.3573
1500	1.41267	0.77648	77.6475
1750	1.702	0.93551	93.5508
2000	1.435	0.78875	78.8751

**Şekil 4.4.** BEAS2B hücre hattının MTT grafiği

4.3. RNA İzolasyon Kontrolü

Tablo 4.3. Hücre Kültüründen elde edilen RNA Konsantrasyonları (ng/ μl) değerleri

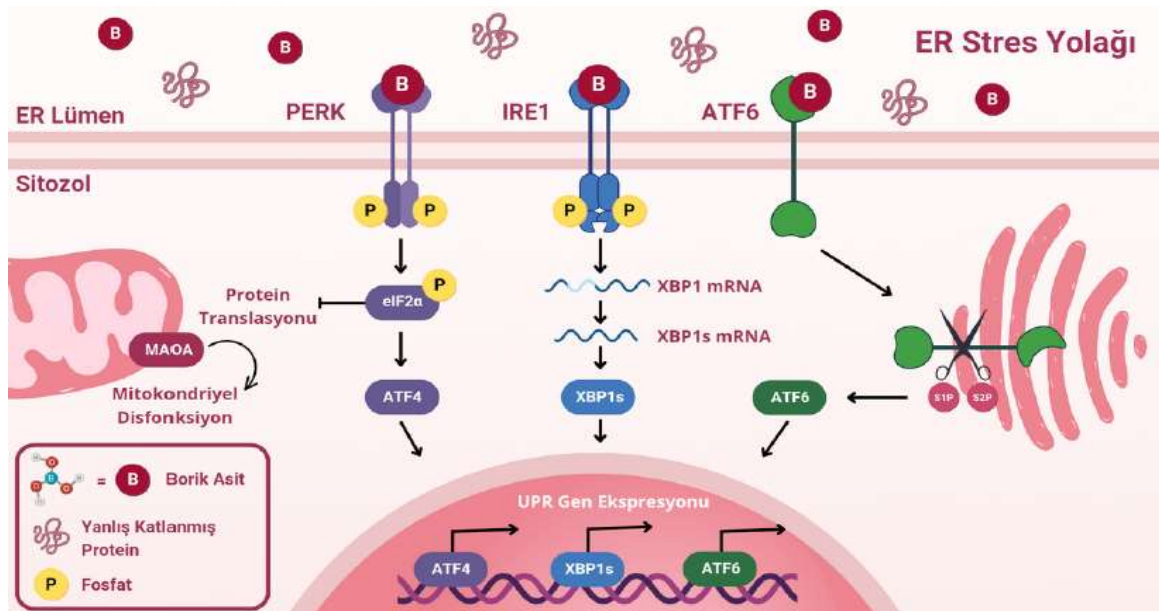
HÜCRELER				
Konsantrasyon/O.D.	A549	A549-B.A	BEAS2B	BEAS2B-B.A
ng/μl	261.134	462.327	100.860	107.273
A260	6.5533	11.5582	2.2664	2.6924
260/230	1.883	1.818	1.751	1.919
260/280	2.014	2.044	2.038	2.021



Şekil 4.5. İzole edilen RNA'ların jel elektroforez görünütüsü

4.4. ER Stresi Yolağında Yer Alan Genlerin(XBP1, PERK, MAOA, ATF6) mRNA İfadelenmesi Analizleri

ER stres yolağında rol alan bazı genlerin (PERK, XBP1, MAOA, ATF6) Borik asit muamelesi sonucu sinyal yapısı ve moleküler mekanizması Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Katlanmamış Protein Yanıt Sinyali Aktivatörü Borik asit tarafından ER Stres Sinyalinin Yapısı ve Moleküler Mekanizması.

Tablo 4.4. Tanımlayıcı İstatiksel Veriler

TANI						
KANSER(A549)				SAĞLIKLI(BEAS2B)		
	Medyan	Minimum	Maximum	Medyan	Minimum	Maximum
ACTB	27.9860	24.3363	31.6361	24.5750	24.2991	24.8508
PERK	30.1686	28.9875	31.3491	29.3077	29.2814	29.3340
XBP1	26.3532	24.0864	28.6201	24.7971	24.7125	24.8817
MAOA	25.4846	25.4615	25.5077	24.9263	23.9078	25.9448
ATF6	27.9378	27.9371	27.9386	27.1364	26.6339	27.6390
GRUP						
KONTROL				BORİK ASİT		
	Medyan	Minimum	Maximum	Medyan	Minimum	Maximum
ACTB	24.5936	24.3363	24.8508	27.9676	24.2991	31.6361
PERK	29.1344	28.9875	29.2814	30.3418	29.3340	31.3497
XBP1	24.3994	24.0864	24.7125	26.7509	24.8817	28.6201
MAOA	24.7078	23.9078	25.5077	25.7032	25.4615	25.9448
ATF6	27.7888	27.6390	27.9386	27.2855	26.6339	27.9371

Tablo 4.5. A549 ve BEAS2B Hücrelerinde, Borik Asit Muamelesi Yapılan İle Yapılmayan Kontrol Hücreleri Arasındaki Farklılık, Ortalama, Varyans ve Kat Yoğunluk p Değerleri (Gruplar arasındaki istatistiksel p değerleri, Student's T testi ile elde edilmiştir).

Grup	Ortalama(1:2)	Varyans	Gözlem	Değişken faktör	p(T<=t) tek-uçlu	p(T<=t) iki-uçlu
ACTB-A549	31.6361783 *	0.00876985*	3	2	0.0015655E	0.0031273E
Kontrol-Borik Asit	24.33634 **	0.005033 **	3			
ACTB-BEAS2B	24.2991219 *	0.01545151 *	3	2	0.17155598	0.34311192
Kontrol-Borik Asit	24.85088 **	0.008012 **	3			
PERK-A549	31.34971 *	0.019703 *	3	2	0.000488	0.000977
Kontrol-Borik Asit	28.98754 **	0.000294 **	3			
PERK-BEAS2B	29.33408 *	0.000284 *	3	2	0.389192	0.778385
Kontrol-Borik Asit	29.28143 **	0.089497 **	3			
XBP1-A549	28.62017 *	0.02373 *	3	2	0.000253	0.000506
Kontrol-Borik Asit	24.08641 **	0.005931 **	3			
XBP1-BEAS2B	24.88179 *	0.00907 *	3	2	0.16038	0.32076
Kontrol-Borik Asit	24.71258 **	0.101831 **	3			
MAOA-A549	25.46154658 *	0.503137838 *	3	2	0.450321203	0.900642405
Kontrol-Borik Asit	25.50779 **	0.163602 **	3			
MAOA-BEAS2B	25.94487317 *	0.180951218 *	3	2	0.028414068	0.056828136
Kontrol-Borik Asit	23.90784 **	0.233904 **	3			
ATF6-A549	27.93714 *	0.062011 *	3	2	0.496131	0.992261
Kontrol-Borik Asit	27.93862 **	0.002311 **	3			
ATF6-BEAS2B	26.63392 *	0.003416*	3	2	0.231732	0.463464
Kontrol-Borik Asit	27.63908 *	3.967797 **	3			

Değerler 0.05'ten küçükse anlamlı fark olduğuna eğer 0.05'ten büyük ise karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı fark olmadığına karar verilir. Kontrol(*), Borik Asit Muameli(**),
(PERK p₁=0.000488 p₂= 0.000977, XBP1 p₁= 0.000253 p₂=0.000506) p<0.05 değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmışken (MAOA p₁= 0.450321203 p₂= 0.900642405, ATF6 p₁= 0.496131 p₂= 0.992261) değerleri ile anlamlı fark saptanmadığı görülmüştür.

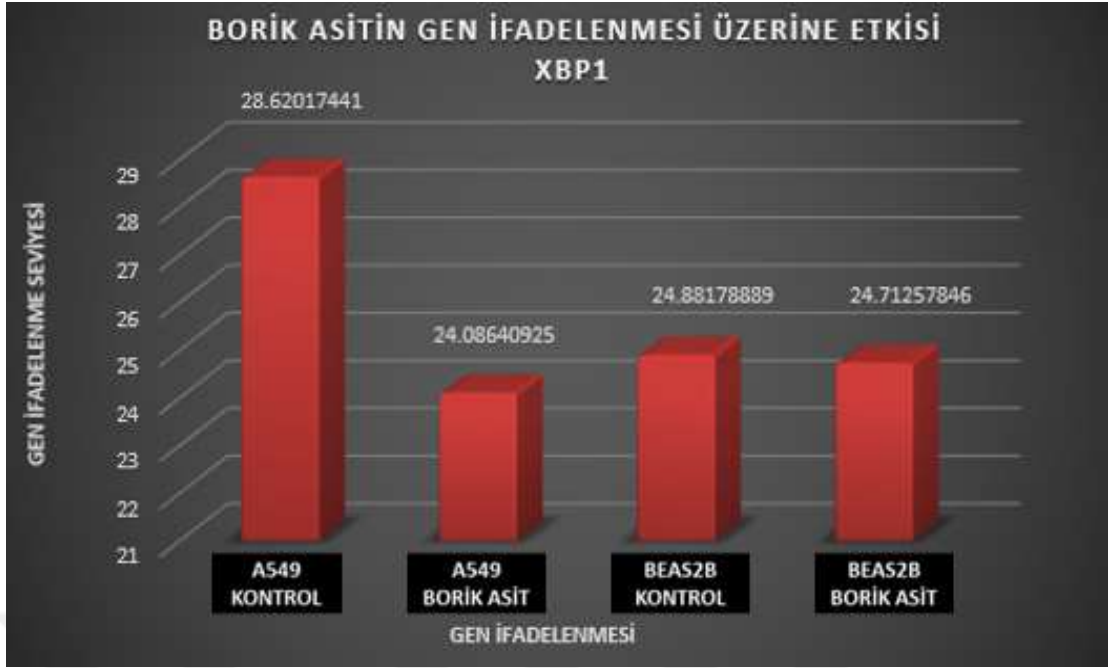
Tablo 4.6. Hücre Kültüründe İnkübatörde Uygulanan Süre, Sıcaklık ve Borik Asit Konsantrasyon Tablosu

Hücre Hatları	Bor (μM)	Süre (saat)	Sıcaklık($^{\circ}$)
A549	-	24	37 $^{\circ}\text{C}$
A549+Borik Asit	1250 μM	24	37 $^{\circ}\text{C}$
BEAS2B	-	24	37 $^{\circ}\text{C}$
BEAS2B+Borik Asit	1250 μM	24	37 $^{\circ}\text{C}$

Hücre kültüründe Borik Asit muamelesi konsantrasyonları, sıcaklık ve inkübatör süresi yukarıdaki Tablo 4.4’de verilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda uygulamalar yapıldı ve RT-PZR reaksiyonu ile gen ifadenme seviyeleri aşağıdaki Şekil (4.7 - 4.8 - 4.9 - 4.10-4.11 - 4.12)’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. ER stresine bağlı PERK geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği (kontrol gen ile ilgili bilgiler Şekil 4.9’da verilmiştir). PERK geninin 1250 μM Borik asit uygulaması sonucunda veriler elde edilmiştir.



Şekil 4.8. ER stresine bağlı XBP1 geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği (kontrol gen ile ilgili bilgiler Şekil 4.9’da verilmiştir). XBP1 geninin 1250 μ M Borik asit uygulaması sonucunda veriler elde edilmiştir.



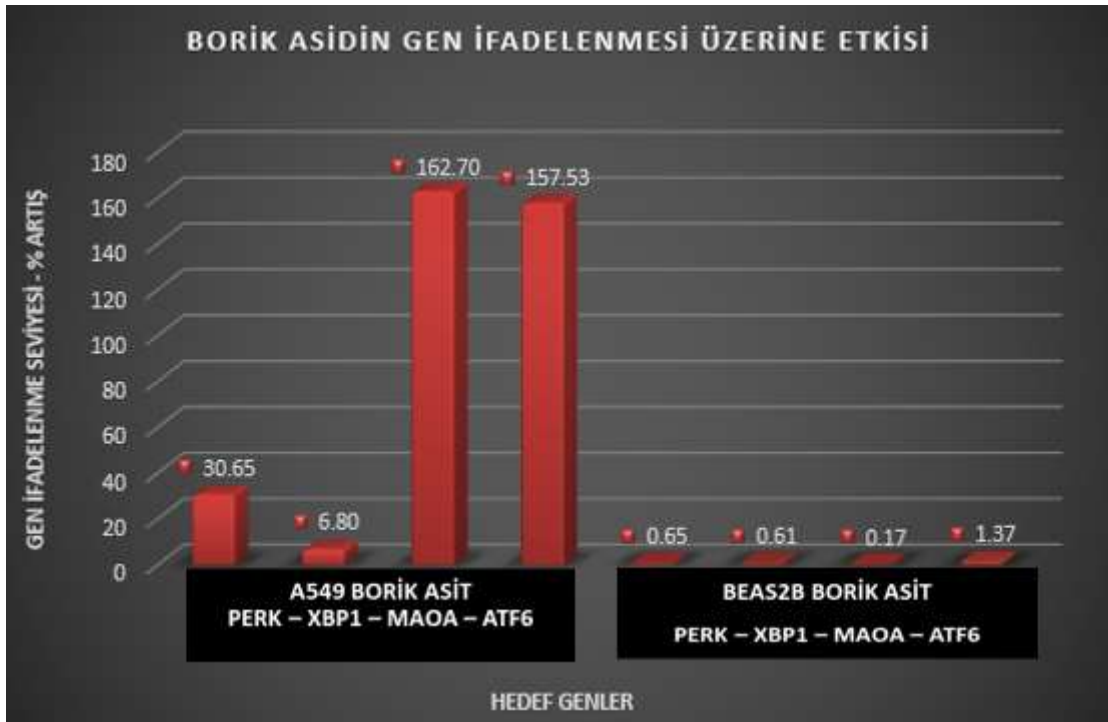
Şekil 4.9. ER stresine bağlı Beta Aktin geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği yukarıda verilmiştir. Beta Aktin geni 1250 μ M Borik asit uygulaması sonucunda veriler elde edilmiştir. (Elde bu veriler doğrultusunda Relatif Kuantatif analizler yapılmıştır.)



Şekil 4.10. ER stresine bağlı ATF6 geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği (kontrol gen ile ilgili bilgiler Şekil 4.9’da verilmiştir). ATF6 geninin 1250 μ M Borik asit uygulaması sonucunda veriler elde edilmiştir.



Şekil 4.11. ER stresine bağlı MAOA geninin, mRNA ifadenmesi ile ilgili veri grafiği (kontrol gen ile ilgili bilgiler Şekil 4.9’da verilmiştir). MAOA geninin 1250 μ M Borik asit uygulaması sonucunda veriler elde edilmiştir.

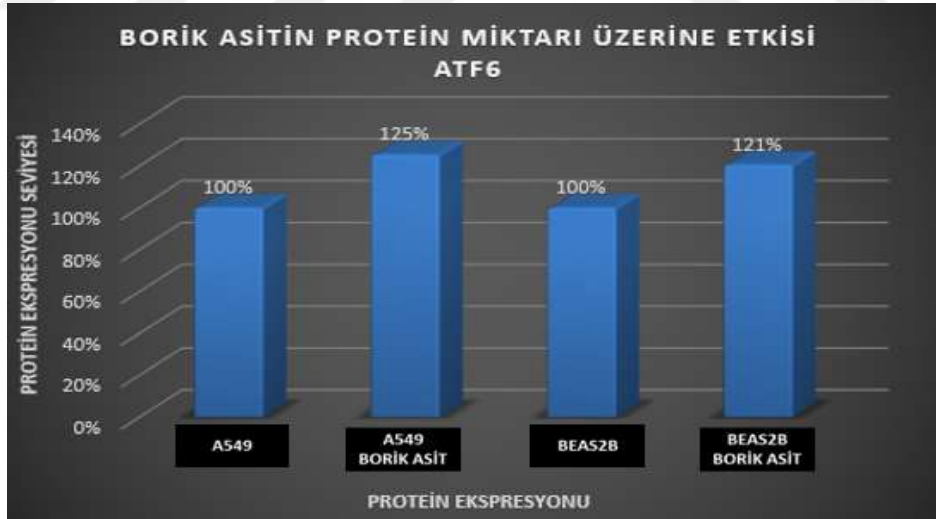
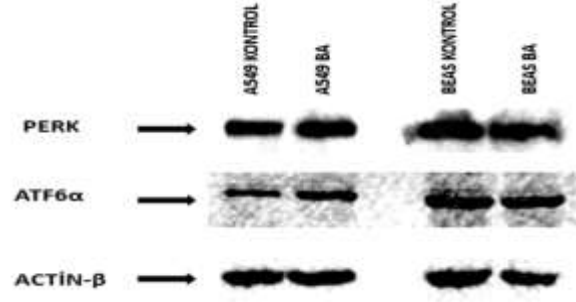


Şekil 4.12. RT-PZR sonucu genlere ve hücre hatlarına göre Relatif Kuantitatif analizleri grafiği. Borik asitin iki hücre hattı üzerinde uygulaması sonucu ER strese bağlı olarak tüm hedef genelerde, gen ifadenmesi seviyelerinin kontrole kıyasla relatif kuantatif analizlerle ilgili veriler elde edilmiştir.

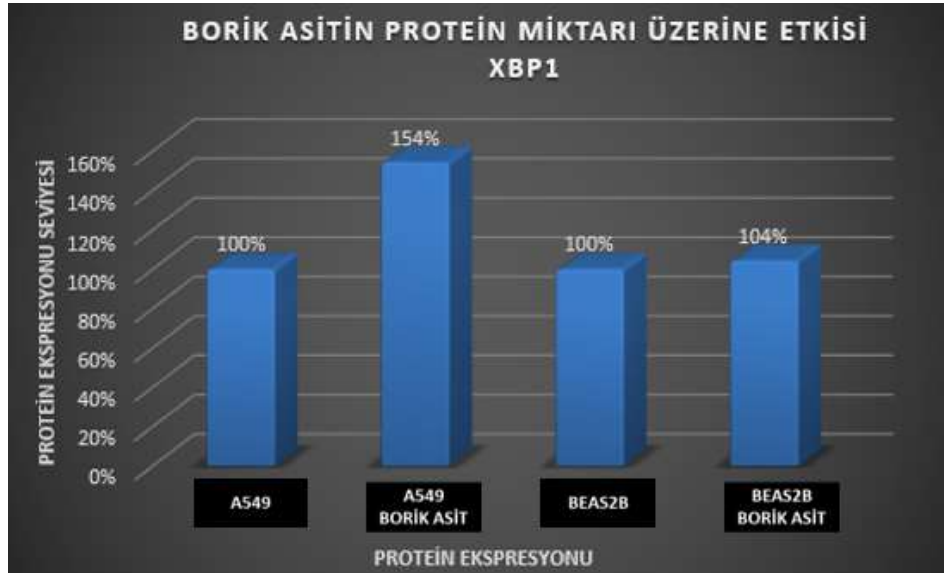
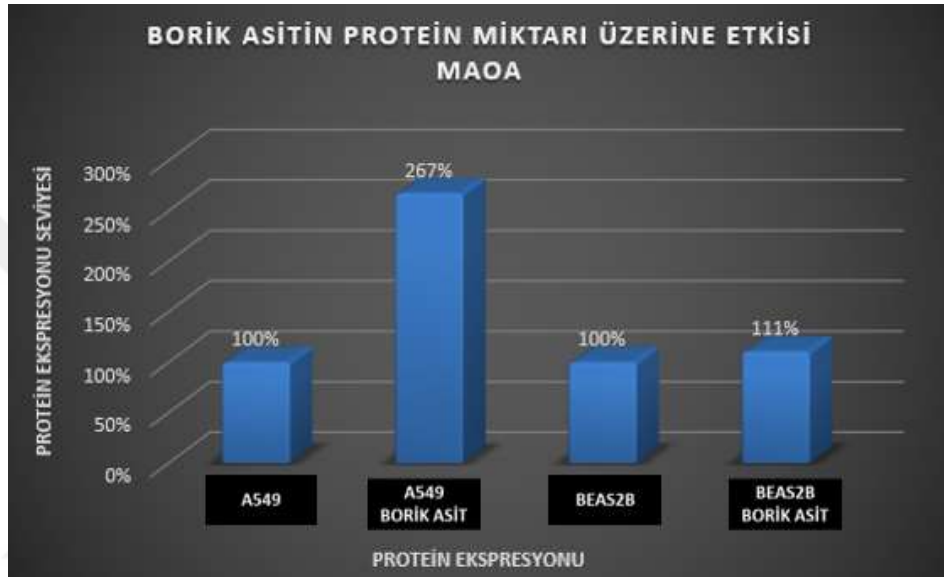
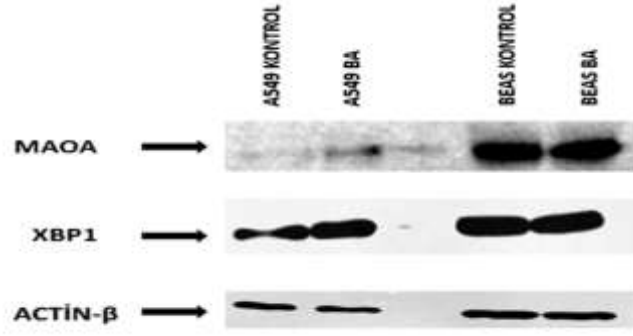
4.5. ER Stresi Yolağında Yer Alan Genlerin (XBP1, PERK, MAOA, ATF6)

Western Blot Analizleri

ER stres yolağında rol alan proteinlerin spesifik pirimer-antikorlar ile (PERK, XBP1, MAOA, ATF6) Borik asit muamelesi sonucu immünoiblotlama analizi ile protein ekspresyonu seviyelerine bakıldı.



Şekil 4.13. Western Blot analizi sonucu protein ekspresyonu miktarı grafiği (Syngene Gene Tools programında protein miktarları hesaplanmış ve kontrole oranla grafik barları oluşturulmuştur)



Şekil 4.14. Western Blot analizi sonucu protein ekspresyonu miktarı grafiği (Syngene Gene Tools programında protein miktarları hesaplanmış ve kontrole oranla grafik barları oluşturulmuştur)

5. TARTIŞMA

Endoplazmik Retikulum, hücredeki en büyük organeldir ve protein sentezi ve taşınması, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanmasının ana bölgesidir Ökaryotik hücrelerde salgı yolunun (ER-Golgi-lizozom) ilk bölmesidir. ER, nükleer zarfa uzanan sitoplazmanın büyük bir bölümünü kaplayan uzun tübüller ve düzleştirilmiş disklerden oluşan bir ağ oluşturur (2). Proteinler, benzersiz fiziksel yapılar ve hücre içi ortamdaki değişikliklerle koordinasyon ve bunlara tepki olarak çeşitli sistemlerden yapılan çalışmalar, ER'nin her biri belirli bir işlev veya işlevlerle ilişkili olan çok sayıda farklı yapısal etki alanından oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. ER'nin ana işlevlerinden biri, salgılanan ve integral membran proteinleri için protein sentezi için bir bölge ve sitozolik proteinlerin bir alt popülasyonu olarak hizmet etmektir (3).

Protein, hidrofobik kalıntıların bir uzantısı veya stop-transfer membran çapa dizisinin varlığı ile belirlenen bir integral membran proteini olacaksa, translokasyon duraklayacaktır. Öte yandan, proteinleri düzgün bir şekilde katlamaya adanmış birkaç protein ve kompleksle bile, proteinlerin bir kısmı doğal ve fonksiyonel forma ulaşamaz veya yanlış katlanır ya da kümelenir. Bu proteinler ya ER'de kalabilir ya da proteazomun aracılık ettiği ER ile ilişkili bozunma (ERAD) yoluna girebilir, bu da anormal polipeptitlerin yanlışlıkla salgı yoluna girmemesini sağlar. Yanlış katlanmış proteinlerin tanınması ve ardından bu agregatların ERAD yolu yoluyla temizlenmesi, hücresel işlevi etkilememek için sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. İlginç bir şekilde, ER stres tepki yollarının ve patolojik insan koşullarının aktivasyonu için birkaç bağlantı vardır. Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif protein yanlış katlanma hastalıkları, ER stres yanıt yollarını aktive eder. Ek olarak, diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve çeşitli kanserlerde ER stres yanıt yolunun aktivasyonu gözlenir. ER stres yanıt yollarının bu patolojilerde nasıl bir rol oynadığı aktif bir araştırma alanıdır ve stres yanıt yollarının çeşitli bileşenleri potansiyel terapötik hedefler olarak araştırılmaktadır (161). ER stres tepki yollarının ve patolojik insan koşullarının aktivasyonu için birkaç bağlantı vardır. Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sonucu ortaya çıkan ER stresi, kanser hücre çoğalması ve sağkalımı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (6, 14).

Hatalı veya yanlış katlanan ya da kümeleşen proteinler potansiyel olarak hücreler için sitotoksiktir. Hücreler bu anormal proteinlerin kontrol edilmesi ve uzaklaştırılması için kuvvetli bir kontrol mekanizması geliştirmiştir. Bu kalite kontrol mekanizmasıyla hücresel süreçler sıkı şekilde denetlenir; protein yapılarının ayırımı yapılarak yalnızca nihai formlarına ulaşmış ve fonksiyonel olarak aktif proteinlerin ER'den çıkışına izin verilir (164).

Kümeleşmeye veya agregre olmaya eğilimli hatalı katlanan ya da katlanamamış proteinler, ER'deki protein kalite kontrol sisteminde yer alan moleküler şaperonlar tarafından tanınır ve onlara bağlanıp etkisiz hale gelmeleri sağlanır. Hatalı formdaki proteinlerin ER lümeninde yığılması sonucu serbest şaperon seviyeleri azalır ve ER stresi adı verilen sürecin başlaması tetiklenir (198). Hücreler bu stres ile ER'nin protein katlama kapasitesini arttırarak ve hatalı katlanan proteinleri protein yıkım sürecine yönlendirip etkisiz hale getirerek başa çıkar. Bu amaçla hücrede UPR adı ile bilinen bir yolak devreye girer. Böylelikle katlanma süreci ve proteozoma hedeflemede görev alan proteinlerin ifadelerini arttıran özelleşmiş transkripsiyon süreci başlar (164). Ayrıca yukardaki bigilere ek olarak, ER'de yanlış katlanmış proteinler, yanlış katlanmış protein tanıma ile başlayan, ardından ubiquitinasyon, sitozole retrotranslokasyon, deglikozilasyon ve bozunma için proteazomu hedefleyen ERAD olarak bilinen bir sistem ile elimine edilir.

Bu çalışmada ilk amacımız borik asidin ER stresine etkisinin ve mekanizmasının araştırılması olduğundan çalışmalarımıza ilk olarak borun anti-proliferatif etkileri olup olmadığını sorgulamak amacıyla sitotoksite analizleri ile başlandı ve MTT analizleri ile borik asit etkin bir anti-proliferatif ajan olabileceğine ilişkin sonuçlar elde edildi. Bu çalışmalar ile borik asitin her iki hücre hattı IC50 değerleri 24 saat için sırasıyla 1000 μ M, 1100 μ M, 1200 μ M, 1250 μ M, 1500 μ M, 1750 μ M, 2000 μ M konsantrasyon grupları denemeleri yapılarak 1250 μ M olarak belirlendi ve etki mekanizmasını araştırmak için yapılan diğer fonksiyonel çalışmalar IC50 değerine yakın konsantrasyon aralığı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tez çalışması kapsamında akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ve sağlıklı insan akciğer bronşimal hücresi olan BEAS2B hücrelerinde ER stresi borik asit uygulamaları yaparak ER stresi ve sinyalizasyon yolağı ile ilişkili genlerdeki değişimleri ve altında yatan mekanizmayı gözlemlemeyi amaçladık. Yüksek lisans çalışmalarım boyunca borik asitin ER stresi ve akciğer kanseri ve sağlıklı insan akciğer hücresi ilişkisinin araştırılmasına odaklı çalışmalar gerçekleştirildi.

Yapılan RT-PZR reaksiyonu analizi sonucunda relatif kuantifikasyon analizleri ve Western Blod analizlerine dayalı olarak borik asitin ER stresi adaptif siyal yolları proteinlerinden. PERK, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimini algılayan, ER'de bulunan bir tip-I transmembran proteindir (177). PERK'in lümen kısmı, katlanmamış proteinlerin algılanmasında yer alırken, sitoplazmik kısım bir kinaz alanı içerir. ER stresinin yokluğunda BiP, PERK'in lümen bölgesine bağlanır ve aktive olmasını engeller. ER stresine yanıt olarak BiP, PERK'ten salınır ve PERK, oligomerizasyon ve transfosforilasyon yoluyla aktive edilir (178). Aktive edilmiş PERK, ökaryotik translasyonel başlatma faktörü 2'nin (eIF2 α) a-alt birimini fosforile eder ve inaktive ederek translasyonel zayıflamaya yol açar. Buda yanlış katlanmış proteinlerin ER tarafından düzeltebilmesine zaman tanımak için genel protein sentezini azaltmaktadır. UPR'nin uyarılması, tümör hücrelerini madde kaynaklı ölüme duyarlı hale getirebilir. Sisplatin, katı tümörleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılır ve DNA'ya bağlanarak ve onarıma müdahale ederek hücreleri öldürdüğüne ve böylece hücre döngüsü durmasını ve apoptozu aktive ettiğine inanılır. Bununla birlikte, UPR'yi etkili bir şekilde indükler ve kaspaz-12'yi insan melanomu ve kolon kanseri (HCY116) sitoplazmalarında çekirdekten bağımsız bir şekilde aktive eder. Özet olarak, sisplatinin proapoptotik etkileri, DNA'ya bağlanma kabiliyeti ile ilgili değildir, fakat aynı zamanda protein katlanması üzerindeki etkilerle de bağlantılı olabilir (151). PERK genin ifadenmesi, bizim çalışmamızda da literatürle benzer şekilde A549 kanser hücresinde ER stresine dayalı UPR'nin apoptozu tetiklediği görülmüştür. Ayrıca sağlıklı hücre hattı olan BEAS2B hattında ER strese dayalı anlamlı değişiklik görülmemiştir. Bunun yanı sıra Western analizi protein seviyesindeki 0.02 kat artış kontrole göre kıyaslandığında RT-PZR sonuçlarını destekler olduğu yorumu yapılabilir.

Adaptif ER stres sinyali yollarından ikincisi olan IRE1-XBP1'dir. IRE1'in luminal alanı, PERK'inkine benzer ve katlanmamış proteinlerin algılanmasında yer alırken, sitoplazmik alan, bir kinaz alanı ve bir RNaz alanı içerir. IRE1, IRE1a ve IRE1b için iki gen vardır. ER stresi üzerine, IRE1 aktivasyonunun BiP baskılaması salınır ve IRE1, dimerizasyon ve transfosforilasyon yoluyla aktive olur (181). Aktive edilmiş IRE1a, XBP1 (x-box bağlayıcı protein 1) pre-mRNA'yı geleneksel olmayan bir ekleme mekanizmasıyla olgun mRNA'ya dönüştürür (193). Bu nedenle XBP1, pankreatik b-hücreleri, hepatositler ve antikor üreten plazma hücreleri gibi büyük miktarlarda salgı proteini üreten hücrelerin işlevi için gereklidir (196). XBP1 pre-mRNA'nın IRE1a tarafından eklenmesi, geleneksel mRNA eklenmesinden oldukça farklıdır. Bu gen, X kutusu olarak adlandırılan bir promotör elemente bağlanarak MHC-

II genlerini düzenleyen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu gen ürünü, aynı zamanda T hücresi lösemi virüsü tip 1 promotörünün promotöründe bir güçlendiriciye bağlanan bir hücrel transkripsiyon faktörü olarak tanımlanan bir bZIP proteinidir. Bir viral transaktivatörün DNA bağlama ortağı olarak hareket ederek viral proteinlerin ekspresyonunu artırabilir. Katlanmamış proteinlerin endoplazmik retikulumda (ER) birikmesi üzerine, bu genin mRNA'sının, endonükleaz inositol gerektiren enzim 1'in (IRE1) aracılık ettiği geleneksel olmayan bir ekleme mekanizması tarafından aktif bir forma işlendiği bulunmuştur. Ayrıca transkripsiyon faktörü FOXO1'in hem bağlanması hem de proteazom kaynaklı bozunması yoluyla ER stresinden ve/veya insülininden bağımsız bir şekilde glukoz homeostazını iyileştirir, dolayısıyla glukoneojenik gen ekspresyonunun baskılanmasına ve kan glukoz seviyelerinin düşmesine neden olur. Lipojenik genlerin bir alt kümesinin ekspresyonunu ER stresinden ve UPR'den bağımsız bir şekilde düzenleyerek hepatositlerde de novo yağ asidi sentezinin indüklenmesini kontrol eder (Benzerliğe göre). Tercihen HDAC3 gen promotör bölgesini rahatsız akışa bağlı bir şekilde ilişkilendirir. BECN1 gen promotör bölgesine bağlanır. CDH5/VE-cadherin gen promotör bölgesine bağlanır. ER stresi üzerine ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlanır (205). IRE1-XBP1 dalının, TRAF2'yi alarak, procaspase-4'ü ve ardından kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive ederek apoptoza bağlandığı ve böylece mitokondriden bağımsız apoptozu tetiklediği öne sürülmüştür (147).

Bizim çalışmamızda da literatüre benzer IRE1 bağlı XBP1'in gen ifadenmesi kanser hücre hattında ER strese dayalı UPR'nin apoptozu tetiklediği kontrole dayalı analizlerle ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra sağlıklı hücre hattında da ER stresine dayalı anlamlı değişiklik görülmemiştir. Western analizleri sonucunda kontrole kıyasla protein seviyesindeki 0.5 kat artışa bakılarak RT-PZR analizleri sonucunu destekler olduğu yorumu yapılabilir.

Son olarak ER stresin üçüncü sinyal yolağı ATF6 sinyalizasyonudur. ATF6, endoplazmik retikulum (ER) stresi sırasında katlanmamış protein tepkisi (UPR) için hedef genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bir transkripsiyon faktörü olmasına rağmen, bu protein, ER'de gömülü bir transmembran protein olarak sentezlenmesi bakımından olağandışıdır. Bir ER stres sensörü/dönüştürücü olarak işlev görür ve ER stres kaynaklı proteolizi takiben, ER şaperonlarını kodlayan genlerin promotörlerinde bulunan cis-etkili bir ER stres yanıt elemanı (ERSE) aracılığıyla bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (205). ER stresinin yokluğunda BiP, ATF6'nın lümen alanına bağlanır ve Golgi lokalizasyon sinyalini engelleyerek ATF6

translokasyonunun inhibisyonuna yol açar (182). Katlanmamış proteinlerin birikmesine yanıt olarak BiP, ATF6'dan ayrışır ve ATF6, veziküler taşıma ile Golgi aygıtına taşınır. Golgi aparatında ATF6, site 1 proteaz (S1P) ve site 2 proteaz (S2P) olarak adlandırılan bir çift proteaz tarafından ardışık olarak bölünür ve ATF6'nın [pATF6(N)] elde edilen sitoplazmik kısmı çekirdeğe yer değiştirir (183). Çekirdekte pATF6(N), cis-etkili bir elemente, ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlanır ve BiP, GRP94 ve calreticulin (183) gibi ER şaperon genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. ER stresine duyarsız olan bu ATF6 benzeri moleküller, ER stresi dışındaki durumlarda aktive olabilir ve ER şaperonlarının transkripsiyonunu aktive edebilir (183). Bizim çalışmamızda da literatüre benzer ATF6 geni, gen ifadenmesinde hem kanser hücre hattında hemde sağlıklı hücre hattında ER stresine bağlı olarak inaktivasyon göstererek anlamlı değişiklik görülmemiştir. İmmünoablottlama protein seviyesi sonuçlarına bakılarak da ER stresine dayalı bir anlamlı değişiklik gözlemlenmemiştir.

MAOA ve B, mitokondrinin dış zarında bulunan ve periferde dopamin bozulmasına neden olan flavoenzimlerdir. Bu gen, dopamin, norepinefrin ve serotonin gibi aminler'in oksidatif deaminasyonunu katalize eden mitokondriyal enzimleri kodlayan iki komşu gen ailesi üyesinden biridir. Bu gen aynı zamanda antisosyal davranış da dahil olmak üzere çeşitli diğer psikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Çoklu izoformları kodlayan alternatif olarak eklenmiş transkript varyantları gözlemlenmiştir. Oksijenin hidrojen peroksite indirgenmesiyle birlikte nörotransmitterler gibi birincil ve bazı ikincil aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eder ve merkezi sinir sistemi ve periferik dokulardaki nöroaktif ve vazoaktif aminlerin metabolizmasında önemli işlevlere sahiptir. Tercihen serotoninini okside eder. Ayrıca, kinuraminin oksidatif deaminasyonunu 3-(2-aminofenil)-3-oksopropanal'e katalize eder ve bu da kendiliğinden 4-hidroksikinolin'e yoğunlaşabilir (205). MAOA'nın kronik ER stresi tarafından aktive edildiğini gösteren çalışmalar vardır (222). Bunun yanı sıra MAOA geni ER stresine bağlı olarak gen ifadenmesi anlamlı değişiklik görülmemiştir. Fakat İmmünoablottlama analizleri sonucuna bakıldığında protein seviyelerindeki artış kontrole oranla 1.5 kat artması literatürü desteklediği görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda A549 ve BESA2B hücrelerinde borik asitin tek başına muamelesi kontrole kıyasla bakıldığında anlamlı bir değişiklik oluşturmaktadır. Bu değişiklik borik asitin sinyal yollarında ER stresine dayalı UPR'ye yanıt olarak apoptozu tetiklediği ve bunun yanı sıra ER stres sebebi olduğu ortaya konmuştur. Bu verilerin desteklenmesi amaçlı daha geniş gruplarda çalışılması literatüre katkı sağlayabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda daha önce araştırılmamış olan, borik asitin akciğer kanseri ve akciğer sağlıklı insan epitel hücrelerinde ER stresi üzerindeki rolü ortaya konması hedeflenmiştir. Bu kapsamda A549 ve BEAS2B hücreleri model olarak kullanılarak borik asit uygulaması yapılmış ve ER stresi etkisinin ve mekanizması araştırılmıştır. Bor biyolojik ortamlarda borik asit (H_3BO_3) formunda bulunur, yara iyileşmesi, iltihabın giderilmesi ve bağışıklık üzerinde olumlu etkileri bulunmakta ve inflamatuvar yanıtta rol almaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak. A549 ve BEAS2B hücrelerine tek başına borik asitin muamelesi kontrole kıyasla etkili bir fark yapılan RT-PZR ve Western Blot analizleri sonucunda PERK, XBP1 genlerinde ER strese bağlı olarak UPR' ye hücresel yanıt olarak apoptozu tetiklediği ve MAOA geninde borik asitin ER stresine bağlı UPR ekpiresyonunu gözlenmiştir. Diğer araştırılan genlerden ATF6' da ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Borik asite bağlı olarak ER stres genlerin, hücre – gen spesifikliğı açısından hücresel yanıtları araştırma bilmek için farklı hücre hatları üzerinde de denenmesi önerilmektedir.

Yapılan çalışma ve daha önce yapılmış araştırmalar sonucunda rapor edilmiş bilgiler göz önünde bulundurularak Borik asitin mikro besin haricinde anti-kanser ilişkisi farklı hücre hatları üzerinde deneyler yapılarak çalışmanın kapsamının genişletilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Porter KR, Claude A, Fullam EF. A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *J Exp Med* 1945, 81:233–46.
2. Reid DW, Nicchitta CV. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015, 4:221–31.
3. Westrate LM, Lee JE, Prinz WA, Voeltz GK. Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu Rev Biochem* 2015, 84:791–811
4. Baumann O, Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int. Rev. Cytol.* 2001, 205:149–214.
5. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2002, 3: 944–50.
6. Jan CH, Williams CC, Weissman JS. Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* 2014, 22: 346.
7. Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of invitro- assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 1981, 91:5516.
8. Walter P, Ibrahimi I, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 1981, 91:545–50.
9. Vander ZA, Gent J, Braakman I, Tabak HF. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* 2012, 149(2):397–409.
10. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: eRassociated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol.* 2014, 204:869–79.
11. Dianne SS, Michael DB. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. 2016, 73:79–94.
12. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine.* 2012, 18: 59-68.

13. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*.2007, 8: 519.
14. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease, *Physiol. Rev.* 2006, 86:1133–49.
15. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system, *Methods Enzymol.* 2011, 490: 71–92.
16. Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Yao J, Kitamura M. Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia, *Nucleic Acids Res.* 2006, 34:93.
17. Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response, *J. Biol. Chem.* 2000, 275(35):27013-20.
18. Rana SVS. Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Toxic Elements Review of Recent Developments. *Biological Trace Element Research.* 2020, 196(1):10-9.
19. Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Letters*, 2004, 216:21-9.
20. Kim DH, Marbois BN, Faull KF, Eckhert CD. Esterification of borate with NAD⁺ and NADH as studied by electrospray ionization mass spectrometry and ¹¹B NMR spectroscopy. *Journal of Mass Spectrometry* 2003, 38:632-40.
21. Devirian TA, Volpe SL. The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2003, 43:219-31.
22. O'Neill MA, Warrenfeltz D, Kates K, Pellerin P, Doco T, Darvill AG, Albersheim P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271:22923-30.
23. Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003, 21:2034-43.)
24. Rieter PT. The biology of cancer Genetics Seminars Oncology Nursing 2004, 20:145-54.

25. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kanser. Öner C (Editör). Genetik kavramlar. Ankara: Palme Yayıncılık;2009, 434-56
26. Park BH, Vogelstein B. Tumor-suppressor genes. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR. *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton, Ontario, 2003:87-105.
27. Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003, 21:2034-43.
28. Bauer JH, Hefand SL. New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging Cell* 2006, 5:437-40
29. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002, 4:70-6.
30. Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, Frame MC, Jeffry Evans TR, Sansom OJ. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/ senescence in pancreatic cancer. *PNAS* 2010, 107(1):246-51.
31. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17:2941-53.
32. Jensen M, Engert A, Weissinger F, Knauf W, Kimby E, Poynton C, Oliff IA, Rummel MJ, Österborg A. Phase I study of a novel pro-apoptotic drug Retodolac in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Invest New Drugs* 2008, 26(2):139-49.
33. Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Spandidos DA, Salcedo M, Bonavida B. The anti-CD20 mAb LFB-R603 interrupts the dysregulated NF- κ B/Snail/ RKIP/PTEN resistance loop in B-NHL cells: role in sensitization to TRAIL apoptosis. *Int J Oncol* 2011, 38(6):1683-94.
34. Okun I, Balakin KV, Tkachenko SE, Ivachtchenko AV. Caspase activity modulators as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 2008, 8:322-41.
35. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med* 2014, 25: 2477–87.

36. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2006, 8: 416–24.
37. Wagner W, Weidner CI, Lin Q. Do age-associated DNA methylation changes increase the risk of malignant transformation? *Bioessays* 2015, 37: 20–4.
38. Teschendorff AE, West J, Beck S. Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum Mol Genet* 2013, 22: 7–15.
39. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol* 2014, 15: R24.
40. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011, 11: 726–34.
41. Sener SF, Grey N. The global burden of cancer. *J Surg Oncol* 2005, 92: 1–3.
42. *American Cancer Society Cancer facts & figures* 2015.
43. Lauren G, Collins D, Christopher MD, Perkel R, Robert E, Enck MD. ‘Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, Pennsylvania’ Lung Cancer: Diagnosis and Management *Am Fam Physician* 2007, 75:56-63.
44. American Cancer Society. Statistics for 2006. Accessed October 6, 2006, at: <http://www.cancer.org/docroot/stt/stt> Son Erişim Tarihi 8 Ekim 2022.
45. Centers for Disease Control and Prevention. Cigarette smoking among adults—United States, 1999 *Published correction appears in MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001, 50:869-1066.
46. American Cancer Society. Statistics for 2003. Accessed October 6, 2006, at: http://www.cancer.org/docroot/stt/stt_0_2003 Son Erişim Tarihi 22 Ekim 2022.
47. Fujimoto J, Wistuba II. Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 2014, 31(4):306–13
48. Vaporciyan AA, Nesbitt JC, Lee J, Stevens C, Komaki R, Roth JA. Cancer of the lung. In: *Cancer Medicine*, 2000:92.
49. Vincent RG, Pickren JW, Lane WW, Bross I, Takita H, Houten L. The changing histopathology of lung cancer: a review of 1,682 cases. *Cancer* 1977, 39:1647-55.

50. Hoffman EF, Gilliam AG. Lung cancer mortality. Geographic distribution in the V.S. 1948-49, 69:1033,1954.
51. Israel L, Chahinian AP. Lung Cancer. *New York, Academic Press*, 1976.
52. Liebow AA, Smith DE. The Lung. Baltimore, Williams and Wilkins, 1968:400.
53. Boucot KK, Weiss W. The Philadelphia Pulmonary Neoplasm Project. *MED. CLIN. N. AMER.* 1940, 54:549.
54. Nash FA, Morgan JM, Tomkins JG. South London Cancer Study. *Brit. Med. J.* 1968, 2:715.
55. Doll R, Hill AB. Mortality in relation to smoking: 10 years observation of British doctors. *Brit. Med. J.* 1964, 1:1399.
56. Harris CC. Cause and prevention of lung cancer. *Sem. Oncol.* 1974, 1: 163.
57. Harris CC, Silverman T, Jackson R. Proliferation of tracheal epithelial cells in normal and vitamin A deficient hamsters. *J. Nat. Cancer Inst.* 1973, 51:1059.
58. Israel L, Chahinian AP. Lung Cancer. *New York, Academic Press*, 1976.
59. Kellermann G, Shaw CR, Kellermann ML. Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. *New Engl. J. Med.* 1973, 289:934.
60. Israel L. Nonspecific immunological alterations in patients with lung cancer. In Lung Cancer. *New York, Academic Press*, 1976, 160:141-55.
61. Baker RR. The clinical management of bronchogenic carcinoma. A progress report. *Johns Hopkins Med. J.* 1975, 137:208.
62. Rivera MP, Detterbeck F, Mehta AC. for the American College of Chest Physicians. Diagnosis of lung cancer: the guidelines. *Chest* 2003, 123(1):129-36.
63. Arroliga AC, Matthay RA. The role of bronchoscopy in lung cancer. *Clin Chest Med* 1993, 14:87-98.
64. Mazzone P, Jain P, Arroliga AC, Matthay RA. Bronchoscopy and needle biopsy techniques for diagnosis and staging of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002, 23:137-58.

65. Mentzer SJ, Swanson SJ, DeCamp MM, Bueno R, Sugarbaker DJ. Mediastinoscopy, thoracoscopy, and video-assisted thoracic surgery in the diagnosis and staging of lung cancer. *Chest* 1997, 112(4): 239-41.
66. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 2004, 350:379-92.
67. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. for the American College of Chest Physicians. The physiologic evaluation of patients with lung cancer being considered for resectional surgery. *Chest* 2003, 123(1):105-14.
68. Ettinger DS, Ahşap DE, Aggarmal C, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bruno D, Bharat A, Chang JY, Chirieac LR, Geter S, Hennon M, Lin J, Lackner RP, Lanuti M, Leal TA, Patel SP, Shapiro TA, Riely GJ, Yang SC, Hughes M. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer *J Natl Compr Canc Netw* 2019, 17(12):1464-72.
69. Sandler AB, Gray R, Brahmer J, Dowlati A, Schiller JH, Perry MC. Randomized phase II/III trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) trial E4599. Accessed October 6, 2006, at: <http://www.asco.org/portal/site/ASCO/menuitem>.
70. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997, 111:1710-7.
71. Göksel T. Akciğer kanseri. Türk Toraks Derneği yayınları. Tam metin http://www.toraks.org.tr/kisokulu4-ppt-pdf/Tuncay_Goksel.pdf Son Erişim Tarihi 14 Kasım 2022.
72. Rosai J. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. *Lab Invest* 2007, 87(5):403-8
73. Kadota K. Reevaluation and reclassification of resected lung carcinomas originally diagnosed as squamous cell carcinoma using immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol* 2015, 9:1170-80
74. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008, 359(13): 1367-80.

75. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2013, 31(8):992–1001.
76. DelaCruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med* 2011, 32(4):605–44.
77. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart, 4th edn. IARC WHO Classification of Tumours. *J Thorac Oncol* 2015, 10(09):1243-60.
78. Shimosato Y. Prognostic implications of fibrotic focus (scar) in small peripheral lung cancers. *Am J Surg Pathol* 1980, 4(4):365–73.
79. Russell PA. Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol* 2013, 8(4):461–8.
80. Travis WD. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013, 137(5):685–705.
81. Rekhtman N. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 2011, 24(10):1348–59.
82. Lu L, Ladinsky Ms, Kirchhausen T. Cisternal organization of the endoplasmic reticulum during mitosis. *Mol Biol Cell* 2009, 20:3471–80.
83. Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 2014, 1837:461-9.
84. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med*. 2015, 372(12):1138–49.
85. Spencer BG, Finnie JW. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cell Survival and Death *J. Comp. Path.* 2020, 181:86-91.
86. Goyal U, Blackstone C. Mechanisms underlying ER network formation / *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, 83: 2492–8

87. Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2006, 18:444–52.
88. Firtina Z, Duncan MK. Unfolded Protein Response (UPR) is activated during normal lens development. *Gene Expr Patterns* 2011, 11:135–43.
89. Hayashi A, Kasahara T, Iwamoto K. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. *J Biol Chem* 2007, 282:34525–34.
90. Tavender TJ, Bulleid NJ. Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal* 2010, 13:1177–87.
91. Brown MK, Naidoo N. The UPR and the anti-oxidant response: relevance to sleep and sleep loss. *Mol Neurobiol* 2010, 42:103–13.
92. Mao HZ, Ehrhardt N, Bedoya C. Lipase maturation factor 1 (lmf1) is induced by endoplasmic reticulum stress through activating transcription factor 6alpha (Atf6alpha) signaling. *J Biol Chem* 2014, 289:24417–27.
93. Fernandez A, Matias N, Fucho R. ASMase is required for chronic alcohol induced hepatic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cholesterol loading. *J Hepatol* 2013, 59:805–13.
94. Li Y, Zhu W, Tao J. Fasudil protects the heart against ischemia-reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress and modulating SERCA activity: the differential role for PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signaling pathways. *PLoS ONE* 2012, 7:e48115.
95. Prins D, Groenendyk J, Touret N. Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57. *EMBO Rep* 2011, 12:1182–8.
96. Li L, Tan H, Gu Z. Heat stress induces apoptosis through a Ca²⁺(+)-mediated mitochondrial apoptotic pathway in human umbilical vein endothelial cells. *PLoS ONE* 2014, 9:e111083.
97. Hong M, Luo S, Baumeister P. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2004, 279:11354–63.

98. Deniaud A, Sharaf EL, Dein O. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 2008, 27:285–99.
99. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006, 147:943–51.
100. Jonathan AK, Timothy SB. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of fibrotic disease *Clin Invest*. 2018, 128(1):64–73.
101. Wei Y, Wang D, Topczewski F. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 291:E275–E81.
102. Zhang LH, Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer. *J Cell Biochem* 2010, 110:1299–305.
103. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001, 107:881–91.
104. Walter P, Ibrahimi I, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 1981, 91(2):545–50
105. Gilmore R, Blobel G, Walter P. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* 1982, 95(2):463–9
106. Deshaies RJ, Sanders SL, Feldheim DA, Schekman R. Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 1991, 349(6312):806–8.
107. Evans EA, Gilmore R, Blobel G. Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83(3):581–5
108. Blobel G. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77(3):1496–500

109. Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, 5(5):a013201.
110. Seiser RM, Nicchitta CV. The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. *J Biol Chem* 2000, 275(43):33820–7.
111. Jagannathan S, Reid DW, Cox AH, Nicchitta CV. De novo translation initiation on membrane-bound ribosomes as a mechanism for localization of cytosolic protein mRNAs to the endoplasmic reticulum. *RNA* 2014, 20(10):1489–98.
112. Cui XA, Zhang H, Palazzo AF. p180 promotes the ribosome-independent localization of a subset of mRNA to the endoplasmic reticulum. *PLoS Bio* 2012, 10(5):e1001336.
113. Zand A, Gent J, Braakman I, Tabak HF. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* 2012, 149(2):397–409.
114. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 2009, 16(6):574–81.
115. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: eRassociated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol* 2014, 204(6):869–79.
116. Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer cell*. 2014, 25:563-73.
117. Chitnis N, Pytel D, Diehl JA. UPR-inducible miRNAs contribute to stressful situations. *Trends Biochem Sci*. 2013, 38:447-52.
118. Tang CH, Ranatunga S, Kriss CL, Cubitt CL, Tao J, Pinilla-Ibarz JA, Del Valle JR, Hu CC. Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *The Journal of clinical investigation*. 2014, 124:2585-98.
119. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013, 12:703-19.
120. Cubillos-Ruiz JR, Silberman PC, Rutkowski MR, Chopra S, Perales-Puchalt A, Song M, Zhang S, Bettigole SE, Gupta D, Holcomb K, Ellenson LH, Caputo T, Lee AH, Conejo- Garcia JR, Glimcher LH. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell*. 2015, 161:1527-38.

121. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, Zhang F, Ye J, Koumenis C, Cavener D, Diehl JA. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*. 2010, 29:3881- 95.
122. Hart LS, Cunningham JT, Datta T, Dey S, Tameire F, Lehman SL, Qiu B, Zhang H, Cerniglia G, Bi M, Li Y, Gao Y, Liu H, Li C, Maity A, Thomas-Tikhonenko A. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *The Journal of clinical investigation*. 2012, 122:4621-34.
123. Feng YX, Sokol ES, Del Vecchio CA, Sanduja S, Claessen JH, Proia TA, Jin DX, Reinhardt F, Ploegh HL, Wang Q, Gupta PB. Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2alpha and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer discovery*. 2014, 4:702-15.
124. Chitnis NS, Pytel D, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA. miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner. *Mol Cell*. 2012, 48:353-64.
125. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol*. 2012, 197:857-67.
126. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007, 446:153-8.
127. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M, Anderson KC, Ardlie KG, Auclair D, Baker A, Bergsagel PL, Bernstein BE. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011, 471:467-72.
128. Chevet E, Hetz C, Samali A. Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis. *Cancer discovery*. 2015, 5:586-97.
129. Ghosh R, Wang L, Wang ES, Perera BG, Igbaria A, Morita S, Prado K, Thamsen M, Caswell D, Macias H, Weiberth KF, Gliedt MJ, Alavi MV, Hari SB, Mitra AK, Bhatarai B. Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*. 2014, 158:534-48.

130. Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, Harding H, Novoa I, Varia M, Raleigh J. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*. 2005, 24:3470–81.
131. Goldstein MG, Li Z. Heat-shock proteins in infection-mediated inflammation-induced tumorigenesis. *J Hematol Oncol*. 2009, 30 (2):5.
132. Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett*. 2002, 514:122–8.
133. Fu Y, Wey S, Wang M, Ye R, Liao CP, Roy-Burman P, Lee AS. Pten null prostate tumorigenesis and AKT activation are blocked by targeted knockout of ER chaperone GRP78/BiP in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105:19444–9.
134. Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*. 2003, 38:605–14.
135. Backer JM, Krivoshein AV, Hamby CV, Pizzonia J, Gilbert KS, Ray YS, Brand H, Paton AW, Paton JC, Backer MV. Chaperone-targeting cytotoxin and endoplasmic reticulum stress-inducing drug synergize to kill cancer cells. *Neoplasia*. 2009, 11:1165–73.
136. Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, Mori K, Glimcher LH, Denko NC, Giaccia AJ. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*. 2004, 64:5943–47.
137. Romero-Ramirez L, Cao H, Regalado MP, Kambham N, Siemann D, Kim JJ, Le QT, Koong AC. X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas. *Transl Oncol*. 2009, 2:31–8.
138. Spiotto MT, Banh A, Papandreou I, Cao H, Galvez MG, Gurtner GC, Denko NC, Le QT, Koong AC. Imaging the unfolded protein response in primary tumors reveals microenvironments with metabolic variations that predict tumor growth. *Cancer Res*. 2010, 70:78–88.

139. Sequeira SJ, Ranganathan AC, Adam AP, Iglesias BV, Farias EF, Aguirre-Ghiso JA. Inhibition of proliferation by PERK regulates mammary acinar morphogenesis and tumor formation. *PLoS One*. 2007, 2:615.
140. Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, Ron D, Urano F. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*. 2010, 5:9575.
141. Roybal CN, Yang S, Sun CW, Hurtado D, Vander Jagt DL, Townes TM, Abcouwer SF. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem*. 2004, 279:14844–52.
142. Ozawa K, Tsukamoto Y, Hori O, Kitao Y, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S. Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. *Cancer Res*. 2001, 61:4206–13.
143. Ranganathan AC, Zhang L, Adam AP, Aguirre-Ghiso JA. Functional coupling of p38-induced upregulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res*. 2006, 66:1702–11.
144. Avivar-Valderas A, Salas E, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Nagi C, Debnath J, Aguirre-Ghiso JA. PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Mol Cell Biol*. 2011, 31:3616–29.
145. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, Zhang F, Ye J, Koumenis C, Cavener D, Diehl JA. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*. 2010, 29:3881–95.
146. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*. 2007, 13:365–76.
147. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Yau GDY, Kaufman RJ. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell*. 2007, 13:351–64.

148. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105:10519–24.
149. Yang W, Tiffany-Castiglioni E, Koh HC, Son IH. Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett*. 2009, 191:203–10.
150. Blais JD, Addison CL, Edge R, Falls T, Zhao H, Wary K, Koumenis C, Harding HP, Ron D, Holcik M. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Mol Cell Biol*. 2006, 26:9517–32.
151. Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, Takano Y. Over-expression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum Pathol*. 2008, 39:1042–9.
152. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 2000, 150:887–94.
153. Christopher J. Guerriero and Jeffrey L. Brodsky Department of Biological Sciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania The Delicate Balance Between Secreted Protein Folding And Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation In Human Physiology *Physiol Rev*.2012, 92(2):537–76.
154. Fisher EA, Ginsberg HN. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem*. 2002, 277:17377–80.
155. Hampton RY. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2002, 14:476–82.
156. Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS, Yuan LC, Klausner RD. Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell*. 1988, 54:209–20.
157. Meigs TE, Simoni RD. Regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in permeabilized cells. *J Biol Chem*. 1992, 267:13547–52.
158. Sommer T, Jentsch S. A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1993, 365:176–9.

159. McCracken AA, Brodsky JL. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol.* 1996, 132:291–8.
160. Qu D, Teckman JH, Omura S, Perlmutter DH. Degradation of a mutant secretory protein, alpha1- antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Biol Chem.* 1996, 271:22791–5.
161. Brodsky JL. The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem J.* 2007, 404:353–63.
162. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* 1983, 306:387–9.
163. Melnick J, Dul JL, Argon Y. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature.* 1994, 370:373–5.
164. Nishikawa SI, Fewell SW, Kato Y, Brodsky JL, Endo T. Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol.* 2001, 153:1061–70.
165. Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature.* 2009, 458:453–60.
166. Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 1996, 273:1725–8.
167. Wang X, Herr RA, Rabelink M, Hoeben RC, Wiertz EJHJ, Hansen TH. Ube2j2 ubiquitinates hydroxylated amino acids on ER-associated degradation substrates. *J Cell Biol.* 2009, 187:655– 68.
168. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* 1999, 96:635–44.
169. Clague MJ, Urbé S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell.* 2010, 143:682–5.

170. Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*. 2009, 137:133–45.
171. Scott DC, Schekman R. Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins. *J Cell Biol*. 2008, 181:1095–105.
172. Wang Q, Liu Y, Soetandyo N, Baek K, Hegde R, Ye Y. A ubiquitin ligase-associated chaperone holdase maintains polypeptides in soluble states for proteasome degradation. *Mol Cell*. 2011, 42:758–70.
173. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009, 78:477–513.
174. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters KJ, Finley D, Dikic I. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*. 2008, 453:481–8.
175. Maytal-Kivity V, Reis N, Hofmann K, Glickman M. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem*. 2002, 3:28.
176. Swanson R, Locher M, Hochstrasser M. A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/ endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev*. 2001, 15:2660–74.
177. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000, 6:1099–108.
178. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000, 2:326–32.
179. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003, 11:619–33.

180. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 2005, 307: 935–9.
181. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 1999, 10:3787–99.
182. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 2002, 277:13045–52.
183. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 1998, 273:33741–9.
184. YeJ, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 2000, 6:1355–64.
185. Anderson RG. Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol* 2003, 13:534–9.
186. Haze K, Okada T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 2001, 355:19–28.
187. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH & Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006, 124:587–99.
188. Kondo S, Murakami T, Tatsumi K, Ogata M, Kanemoto S, Otori K, Iseki K, Wanaka A, Imaizumi K. a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol* 2005, 7:186–94.

189. Nagamori I, Yabuta N, Fujii T, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y, Nojima H. Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells* 2005, 10:575–94.
190. Raggo C, Rapin N, Stirling J, Gobeil P, Smith-Windsor E, O'Hare P, Misra V. Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol Cell Biol* 2002, 22:5639–49.
191. Stirling J, O'Hare P. CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol Biol Cell* 2006, 17:413–26.
192. Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, Kamigori Y, Nomura- Furuwatari C, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. Translational control by the ER transmembrane kinase / ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol* 2001, 3:158–64.
193. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002, 415:92–6.
194. Kaneko M, Nomura Y. ER signaling in unfolded protein response. *Life Sci* 2003, 74:199–205.
195. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003, 23:7448–59.
196. Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J* 2005, 24:4368–80.
197. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. pXBP1 (U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1 (S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol* 2006, 172:565–75.
198. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, La Vail MM, Walter P. IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response. *Science New York, N.Y.*, 2007, 318(5852):944-9.

199. Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Stroud RM, Walter P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:18773–84.
200. Dorner AJ, Wasley LC, Raney P, Haugejorden S, Green M, Kaufman RJ. The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J Biol Chem* 1990, 265:22029–34.
201. Brostrom MA, Prostko CR, Gmitter D, Brostrom CO. Independent signaling of grp78 gene transcription and phosphorylation of eukaryotic initiator factor 2 alpha by the stressed endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995, 270:4127–32.
202. Ikeda J, Kaneda S, Kuwabara K, Ogawa S, Kobayashi T, Matsumoto M, Yura T, Yanagi H. Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 230:94–9.
203. Yoshida, H. ER stress and diseases. Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University. 2007, 1742-4658.2007.05639.
204. Asmellash S, Stevens JL, Ichimura T. Modulating the endoplasmic reticulum stress response with trans-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane prevents chemically induced renal injury in vivo. *Toxicol Sci* 2005, 88:576–84.
205. GeneCards: The human gene database. www.genecards.org Son Erişim Tarihi 9 Eylül 2022.
206. Uluisik I, Karakaya HC, Koc A. The importance of boron in biological systems. *J Trace Elem Med Biol*. 2018, 45: 156-62.
207. Zhang Q, Chen H, He M, Zhao Z, Cai H, Ding G, Shi L, Xu F. The boron transporter BnaC4.BOR1;1c is critical for inflorescence development and fertility under boron limitation in Brassica napus. *Plant Cell*. 2017,1:2987.
208. Kuru R, Yarat A. Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış. *Clin Exp Health Sci* 2017, 7: 107-14
209. Uluisik I, Kaya A, Fomenko DE, Karakaya HC, Carlson BA, Gladyshev VN, Koc A. Boron stress activates the general amino acid control mechanism and inhibits protein synthesis. *PLoS One*. 2011, 6(11): 27772.

210. Hauck G, Henn R. Histopathologische und chemischtoxikologische Befunde bei einer akuten tödlichen Borsäurevergiftung. *Arch Toxikol* 1969, 25:83–8.
211. Duydu Y, Bas,aran N, Üstündağ A, Aydın S, Ündeğer Ü, Ataman OY, Aydos K, Düker Y, Ickstadt K, Waltrup BS, Golka K, Bolt HM. Is boric acid toxic to reproduction in humans? Assessment of the animal reproductive toxicity data and epidemiological study results. *Curr Drug Deliv* 2016, 13(3):324–9.
212. Scially AR, Bonde JP, Brüske-Hohlfeld I, Culver BD, Li Y, Sullivan FM. An overview of male reproductive studies of boron with an emphasis on studies of highly exposed Chinese workers. *Reprod Toxicol* 2010, 29:10–24.
213. Cui Y, Winton MI, Zhang ZF, Rainey C, Marshall J, De Kernion JB, Eckhert CD. Dietary boron intake and prostate cancer risk, *Oncol. Rep.* 2004, 11(4):887–92.
214. Naghıı MR, Samman, S. The role of boron in nutrition and metabolism. *Progress Food Nutr. Sci.* 1993, 17:331-49.
215. Clarke WB, Weber CE, Koekebakker M, Barr RD. Lithium and boron in human blood. 1. *Lab. Clin. Med.* 1987, 109:155-8.
216. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986, 51:263-73.
217. Sachse K. Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular Biotechnology*, 2004, 26:61-79.
218. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63:3741-51.
219. Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of GC-rich templates. *Cold Spring Harb Protoc* 2019, (2).
220. Towbin ST, Gordon HJ. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979, 76(9):4350-4.
221. Janes KA. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting, *Sci. Signal.* 2015, 8:2.

222. Deshwal S, Forkink M, Hu CH, Buonincontri G, Antonucci S, Di Sante M, Murphy MP, Paolocci N, Mochly-Rosen D, Krieg T, Di Lisa F, Kaludercic N. Monoamine oxidase-dependent endoplasmic reticulum-mitochondria dysfunction and mast cell degranulation lead to adverse cardiac remodeling in diabetes. *Cell Death Differ.* 2018, 25(9):1671-85.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş





EK-2. Etik Kurul Kararı

