

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI

**HepG2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE OUABAİNİN
ANTİKANSER ETKİSİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRES CEVABI İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Tülay ÖZDEMİR

SAMSUN /2011

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI

**HepG2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE OUABAINİN
ANTİKANSER ETKİSİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRES CEVABI İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tülay ÖZDEMİR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR

SAMSUN /2011

ÖNSÖZ

Değerli hocalarım; Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR'e, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Doç. Dr. Ramazan AMANVERMEZ, Doç Dr. Nermin KILIÇ, Yrd. Doç. Dr. Birşen BİLGİCİ, Yrd. Doç. Dr. Özgür K. TUNCEL, Yrd. Doç. Dr. Bahattin AVCI ve Yrd. Doç. Dr. Hasan ALAÇAM ve Uzm. Dr. Aynur DÜZGÜN'e uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana sağladıkları katkılar için, birlikte çalıştığım sevgili arkadaşlarım Dr. Rukiye NAR, Dr. Veli KILINÇ, Dr. Osman SALIŞ, Dr. Murat GÜNAY, Dr. Seher AYDOĞAN, Dr. Ayşegül BAHADIR, Dr. Şimal GÜRLER, Dr. Uğur DÜZ, Dr. Mesut KILIÇOĞLU, Dr. Sedat GÜLTEN'e bana sağladıkları maddi ve manevi destek için, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvar çalışanlarına yardımları için ve sevgili eşime, oğluma ve anneme her zaman yanımda oldukları için sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Not: Bu çalışma (PYO.TIP. 1901 09 001) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TABLolar	V
ŞEKİLLER	VI
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz POMPASI	4
2.1.1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz alt üniteleri	4
2.2 KARDİYOTONİK STEROİTLER (KTS)	6
2.2.1 KTS sinyal etki mekanizması hipotezleri	7
2.3 OUABAIN	9
2.3.1 Endojen ouabain	9
2.3.2 Ouabainin nanomolar konsantrasyonları ile uyarılan sinyal iletimi olayları:	11
2.3.2.1 Hücre çoğalması	11
2.3.2.2 Kalsiyum mobilizasyonu	12
2.3.2.3 Hücre sitotoksitesi ve proteaz aktivasyonu	13
2.3.2.4 MAPK sinyal yolu	14
2.3.2.5 NF-κB	15
2.3.2.6 Endotelin-1 salınımı	15
2.3.3 Ouabain-HT	16
2.3.4 Ouabain-hücre adezyonu	16
2.3.5 Ouabain-apoptoz	17
2.4 WARBURG ETKİSİ	18
2.5 2-DEOKSİGLUKOZ	19
2.5.1 2-DG ve UPR	21
2.5.2 2-DG'nin etkileri	21
2.6 ENDOPLAZMİK RETİKULUM	23
2.6.1 Endoplazmik Retikulum Tipleri	23
2.6.1.1 Düz Endoplazmik Retikulum	23
2.6.1.2 Granüllü Endoplazmik Retikulum	23

2.7 ER STRES	23
2.7.1 UPR sinyal yolları	25
2.7.1.1 PERK yolağı:	25
2.7.1.2 ATF6 yolağı	26
2.7.1.3 IRE1 yolağı	26
2.7.2 UPR ve apoptoz	27
2.7.2.1 İntrensek (mitokondriyal) apoptoz yolu	28
2.7.2.2 Ekstrensek apoptoz yolu	28
2.7.3 Kanser hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR	28
2.7.4 ER'de yerleşik proteinlerin ER'den kaçıışı	29
2.8 GLUKOZ REGÜLE PROTEİN 78 (Grp78)	30
2.8.1 Nörolojik Hastalıklarda Grp78	33
2.8.2 Grp78 varyantı (Grp78va)	34
2.8.3 Yüzey Grp78	34
2.8.4 Grp78 ve tümör progresyonu	35
2.9 GLUKOZ REGÜLE PROTEİN 94 (GRP94)	37
2.10 MURINE TUMOR CELL DNAJ-Like PROTEIN-1 (MTJ-1)	38
2.11 CCAAT/ENHANCER PROTEIN (C/EBP) HOMOLOG PROTEIN (CHOP)	39
2.12 X-BOX BINDING PROTEIN-1 (XBP-1)	41
2.13 MULTI DRUG RESISTANT GENE-1 (MDR-1)	43
2.14 MULTI DRUG RESISTANT ASSOCIATED PROTEIN-1 (MRP-1)	44
2.15 PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE-4 (Par-4)	46
2.16 HEKSOKİNAZ II (HKII)	48
2.17 HEMOKSİJENAZ-1 (HO-1)	51
2.18 CAVEOLIN-1 (Cav-1)	53
3. GEREÇ – YÖNTEM	56
3.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER:	56
3.2 KULLANILAN KİMYASALLAR	58
3.3 HepG2 HÜCRE KÜLTÜRÜ	59
3.3.1 Hücre Kültür solüsyonları	59
3.3.2 Hücre Kültür Protokolleri	61
3.3.2.1 -80 °C'de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi	61
3.3.2.2 HepG2 hücrelerinin pasajlanması	61

3.3.2.3 HepG2 hücrelerinin dondurulması	62
3.3.3 Hücre Kültür Gruplarının Medyum Hazırlığı (İlaçlı grupların medyumları)	62
3.3.4 Çalışma Gruplarının İçerikleri	63
3.3.5 HepG2 hücrelerinde proliferasyon deneyi	63
3.3.5.1 Proliferasyon takibi için E-Pleyt dizaynı	64
3.3.6 HepG2 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması	65
3.3.6.1 Hücrelerin 96 kuyucuklu pleyte ekilmesi	65
3.3.6.2 HepG2 hücre RNA izolatları için hücre ekimi	65
3.4 BİYOİNFORMATİK ANALİZ	66
3.4.1 Primer-prob Dizaynı	66
3.5 RT-PCR İLE GEN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI	73
3.5.1 RNA İzolasyon Protokolü	73
3.5.2 Numune materyali	74
3.5.3 RNA izolasyon solüsyonlarının hazırlığı	74
3.5.4 RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü	74
3.5.6 Gen ekspresyonları için RT-PCR protokolü	76
3.5.7 XBP-1 PCR protokolü	77
3.6 XBP-1 PCR-RFLP PROTOKOLÜ: FastDigest PstI ile kesim	77
3.7 ELEKTROFOREZ	78
3.7.1 Tris Baz, Borik Asit, EDTA (TBE) Elektroforez tamponu hazırlanması	78
3.7.2 pUC Mix Marker 8 Hazırlanması (Fermentase)	78
3.7.3 PCR-RFLP için %3 kompozit jel hazırlanması:	78
3.7.4 Jel elektroforezi	79
3.7.5 Agaroz jelde DNA boyanması ve görüntülenmesi	79
4. BULGULAR	80
4.1 RNA KANTİTASYONU	80
4.2 KANTİTATİF RT-PCR İLE GEN EKSPRESYON Ct DEĞERLERİ	82
4.3 KOMPARATİF Ct METODU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ	83
4.3.1 Relatif kantitasyon	83
4.3.1.1 Komparatif Ct (Threshold Siklus) Metodu	83
4.4 HEPG2 PROLİFERASYON VE CANLILIK ANALİZİ	93
4.5 RESTRİKSİYON FRAGMANI BOYUT POLİMORFİZMİ (RFLP) SONUÇLARI	95
4.5.1 XBP-1 PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	95

4.5.2 Genotiplendirme	96
4.5.3 Dansitometrik jel analizi	96
4.5.4 Rölatif IRE1� aktivitesi tayini	98
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇLAR	108

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo I PBS solüsyon hazırlığı, 1L	59
Tablo II Komplet DMEM komplet medyum hazırlığı, 100 ml	61
Tablo III Freeze medyum, 10 ml	61
Tablo IV HepG2 proliferasyon deneyi için E-pleyt dizaynı	64
Tablo V RT-PCR gen ekspresyonu için 24. saat pleyt dizaynı	66
Tablo VI XBP-1 primer dizaynı	73
Tablo VII RNA izolasyon protokolü	73
Tablo VIII RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı	74
Tablo IX RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü	74
Tablo X Gen ekspresyonları için RT-PCR protokolü	76
Tablo XI XBP-1 PCR protokolü	77
Tablo XII XBP-1 PCR-RFLP protokolü	77
Tablo XIII Elektroforez tamponu hazırlığı, 1L	78
Tablo XIV Marker-8 hazırlığı, 100 µl	78
Tablo XV RNA 24. saat kantitasyon sonuçları	80
Tablo XVI RNA 48. saat kantitasyon sonuçları	81
Tablo XVII Kantitatif RT-PCR ile gen ekspresyon Ct sonuçları	82
Tablo XVIII XBP-1 mRNA genotiplendirilmesi	96
Tablo XIX PCR-RFLP ürünlerinin dansitometrik jel analiz sonuçları	97

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1 Na/K-ATPaz pompası altüniteleri	5
Şekil 2 KTS etki mekanizması	8
Şekil 3 Ouabain kimyasal yapısı	9
Şekil 4 Ouabain sinyal iletim yolları	10
Şekil 5 Ouabain etki mekanizmaları	11
Şekil 6 2-DG yapısı	20
Şekil 7 ER stres	24
Şekil 8 UPR sinyal yolları	27
Şekil 9 Grp78 fonksiyonları	32
Şekil 10 Par-4'ün apoptotik etkisi	47
Şekil 11 HKII ile VDAC etkileşimi	49
Şekil 12 Kaveolar HO-1	53
Şekil 13 GAPDH primer-prob dizaynı	67
Şekil 14 MTJ-1 primer-prob dizaynı	68
Şekil 15 Grp94 primer-prob dizaynı	68
Şekil 16 Grp78 primer-prob dizaynı	69
Şekil 17 CHOP primer-prob dizaynı	69
Şekil 18 HO-1 primer-prob dizaynı	70
Şekil 19 Cav-1 primer-prob dizaynı	70
Şekil 20 HKII primer-prob dizaynı	71
Şekil 21 MDR-1 primer-prob dizaynı	71
Şekil 22 Par-4 primer-prob dizaynı	72
Şekil 23 MRP-1 primer-prob dizaynı	72
Şekil 24 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana bağlı Cav-1 gen ekspresyon analiz grafiği	84
Şekil 25 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana bağlı CHOP gen ekspresyon analiz grafiği	85
Şekil 26 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana bağlı Grp78 gen ekspresyon analiz grafiği	86
Şekil 27 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana bağlı Grp94 gen ekspresyon analiz grafiği	87
Şekil 28 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana	

bağlı HKII gen ekspresyon analiz grafiği	88
Şekil 29 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana	
bağlı HO-1gen ekspresyon analiz grafiği	89
Şekil 30 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana	
bağlı MDR-1gen ekspresyon analiz grafiği	90
Şekil 31 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana	
bağlı MRP-1gen ekspresyon analiz grafiği	91
Şekil 32 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana	
bağlı MTJ-1gen ekspresyon analiz grafiği	92
Şekil 33 Ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde doz ve zamana	
bağlı Par-4 gen ekspresyon analiz grafiği	93
Şekil 34 HepG2 proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği	94
Şekil 35 24. saat XBP-1 PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	95
Şekil 36 48. saat XBP-1 PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	96
Şekil 37 Kontrol grubuna oranlı 24. saat rölatif IRE1 α aktivitesi analiz grafiği	98
Şekil 38 Kontrol grubuna oranlı 48. saat rölatif IRE1 α aktivitesi analizi grafiği	98

KISALTMALAR

2-DG	2-deoksiglukoz
α2-MG	α 2-makroglobulinin
ABC	ATP binding cassette
ADPKD	Autosomal dominant polycystic kidney disease
AP-1	Activator protein 1
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
ARE	Antioksidan response element
ASK1	Apoptoz sinyal- regulating kinaz 1
ATF6	Activating transcription Factor 6
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2
BiP	İmmünglobulin ağır zincir bağlayıcı protein
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain
Cav-1	Caveolin-1
CD 69	Cluster of Differentiation 69
CHO	Çin hamster over
CHOP	CCAAT/enhance binding protein (C/EBP) homolog protein
Ct	Treshold cycle
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DLS	Digoksin benzeri bileşik
DMSO	Dimetilsülfooksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Edem	ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptör
eIF2-α	Eucaryotic initiation factor-2 alfa
EO	Endojen ouabainin
EOR	ER aşırı tepki
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER-associated degradation
Erk 1/2	Extracellular-signal-regulated kinases
ERO1	ER oxidoreductin 1
ERSE	Endoplazmik retikulum stres response elementler
ET-1	Endotelin 1

FADD	Fas Associated protein with Death Domain
FBS	Fetal Bovine Serum
GADD153	Growth arrest and DNA damage inducible gene 153
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
GLUT1	Glucose transporter 1
Grp78	Glucose-regulated protein 78 kDa
Grp94	Glucose-regulated protein 94 kDa
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz-3
HCC	Hepatoselüler Karsinom
HeLa	İnsan serviks epitelyal karsinom hücre hattı
HepG2	Hepatoselüler Karsinom hücre hattı
Herp	Homocysteine-induced ER protein
HIF	Hypoxia-inducible transcription factor
HK2	Heksokinaz 2
HO-1	Hem oksijenase 1
HSP70	Heat shock protein 70
HUAEC	İnsan göbek kordonu endotel hücreleri
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IP3	Inositol trisphosphate
IP3R	Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor
IRE1	Inositol requiring kinase 1
JIK	c-Jun-N-terminal inhibitör kinaz
JNK	c-Jun amino terminal kinaz
KTS	Kardiyotonik Steroidler
LLC-PK1	Pig renal epitelyal hücreleri
LLO	Lipid bağlı oligosakkarit
LNCaP	Human prostate cancer cells
LPS	Lipopolisakarit
LRP	Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein
LVH	Sol ventrikül hipertrofisi
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multidrug resistant
MEF	Murin embriyonik fibroblast
MEK	Mitogen-activated protein kinases

MHC I	Sınıf I major histocompatibility complex
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MRP	Multidrug resistance-associated protein
mtDNA	Mitokondrial DNA
MTJ-1	Murine Tumor cell DNAJ protein
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
Na⁺ K⁺-ATP'az	Sodyum potasyum adenzin trifosfataz
NAC	N-Asetil sistein
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat reduced form
NBD	Nükleotid binding domainleri
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ değiştirici
NEF	Nucleotid Exchange Factor
NES	Nuclear export sequence
NF-kB	Nüklear faktör(NF)-kappa Beta
NHE3	Na/H değiştirici izoform 3
NHK	Normal insan böbrek hücreleri
NLS	Nuclear localization sequences
Nrf-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
Par-4	Prostate apoptosis response
PARP	Poly (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC-12	Prostat karsinom hücre hattı -12
PC-3	Prostat kanser hücre hattı-3
PDI	Peptidil disülfid izomeraz
PERK	Protein Kinase RNA (PKR) like ER kinase
P-gp	P glikoprotein
PI3K	Fosfotidilinositol 3 kinaz
PKA	Protein Kinaz A
PKB	Protein kinaz B
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
Raf	Rat sarcoma
Ras	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
RTCA	Real Time Cell Analysis
S1P	Site 1 protease
SAC	Selective apoptosis of cancer
SERCA2	Sarkoplazmik ER Ca ²⁺ ATPaz 2
siRNA	Small interferans RNA
sit-c	Sitokrom c
SR/ER	Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum
TGF-β	Transforming growth factor beta
TMD	Transmembran domain
TNF	Tumor necrosis factor
TOP1	Topoizomeraz I
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
uORF	Upstream açık okuma çerçeveleri
UPR	Unfolded Protein Response
VDAC	Voltage-dependent anion channels
XPB1	X-Box Binding Protein 1

ÖZET

HepG2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE OUABAINİN ANTİKANSER ETKİSİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES CEVABI İLE İLİŞKİSİ

Glukoz yoksunluğu solid tümörlerin merkezinde oluşan bir durumdur ve hücrelerde katlanmamış protein yanıtını (UPR) aktive eder. 2-deoksiglukoz (2-DG), glikolizi inhibe eden ve hücre büyümesini bloklayan sentetik bir glukoz analogudur. 2-DG, protein glikozilasyon inhibisyonu yolu ile Endoplazmik Retikulum (ER) stresini uyarır.

Kardiyotonik bir steroid olan ouabain spesifik Na^+/K^+ -ATPaz inhibitörüdür. Önceki çalışmalarda insan karaciğer kanser hücrelerinde apoptoz üzerinde ouabainin bazı rolleri olabileceği gösterilmiştir. Ancak ouabain ve UPR arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, HepG2 hücrelerinde UPR, proliferasyon ve apoptoz üzerinde ouabainin olası etkilerini araştırmayı planladık. Bu çalışmada, HepG2 hücre hattında ouabainin 2-DG varlığında/yokluğunda UPR ve apoptoz üzerine farmakolojik etkisini incelemeyi amaçladık.

HepG2 hücreleri (5×10^3 /kuyucuk) 96-kuyucuklu pleytte bir gece kültüre edildi ve ardından 10 mM 2-DG varlığında veya yokluğunda 0.75 nM, 7.5 nM, 75 nM ve 750 nM ouabain ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edildi. Aynı zamanda kantitatif olarak RT-PCR ile Grp78, Grp94, CHOP, XBP-1, MTJ-1, Cav-1, HKII, MDR-1, MRP-1, HO-1, Par-4 ekspresyon düzeylerini ölçtük. IRE1 α etkinliğini belirlemek için PCR-RFLP yapıldı. HepG2 hücrelerinin sayısı, canlılığı ve çoğalması gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi.

Elektriksel impedans sinyaline dayalı olarak gerçek zamanlı hücre analizi ile gösterildiği gibi 2-DG ile beraber stres koşullarında daha fazla etkili olan ouabain 0.75, 7.5 ve 75 nM dozlarında sitotoksik etki göstermedi. 0.75 ve 7.5 nM ouabain kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDR-1 ekspresyonunu downregüle ederek ilaç direncini azalttı. Tek başına 75 nM ouabain Grp78 ekspresyonunu uyarırken 2-DG'nin uyardığı Grp78 artışını ise baskıladı, böylece HepG2 hücrelerini sitotoksositeye duyarlı kılabilmektedir. Tek başına 2-DG, HO-1 ve HKII ekspresyonunu arttırırken 2-DG ile birlikte ouabain hem HO-1 hem de HKII ekspresyonunu azalttı. Tek başına ouabain ile doza bağlı olarak Par-4 ekspresyonu upregüle oldu ve 2-DG ile kombine edildiğinde bu etki daha belirgin görüldü, böylece muhtemelen apoptozu uyarabilmektedir. 75 nM ouabain ile XBP-1 mRNA splicing aktive edildi.

Bulgularımıza göre, ouabain tipik bir UPR indükleyicisi değildir fakat glukoz açlığı durumunda HepG2 hücrelerini sitotoksositeye veya apoptoza yatkın hale getirebilir. 2-DG varlığında ouabain tarafından UPR yanıtının bozulması, kanser hücrelerini seçici olarak öldürmek için cazip bir yaklaşım olabilir ve ouabain uygulaması solid tümörlere karşı UPR hedefli ilaç geliştirmek için kimyasal bir temel sağlayabilir. Ouabainin konvansiyonel kanser tedavisine yardımcı olarak kullanımı da güncel bir araştırma konusudur.

Anahtar Kelimeler: Endoplazmik Retikulum Stresi; Katlanmamış Protein Yanıtı; Ouabain; 2-deoksiglukoz; Apoptoz

SUMMARY

ANTICANCER EFFECT OF OUABAIN IN HepG2 CELL CULTURES AND THE RELATIONSHIP BETWEEN OUABAIN AND ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS RESPONSE

Glucose deprivation is a condition that occurs in interior of solid tumors and activates the unfolded protein response (UPR) in cells. 2-deoxyglucose (2-DG) is a synthetic glucose analogue that inhibits glycolysis and blocks cell growth. 2-DG can induce Endoplasmic Reticulum (ER) stress through inhibition of protein glycosylation.

Ouabain, a cardiotonic steroid, is a specific inhibitor of the Na^+/K^+ -ATPase. Previous reports have shown that there might have been some roles of ouabain on apoptosis in human liver carcinoma cells. In addition to this, the relationship between ouabain and UPR is not known well. Therefore, we have planned to investigate the possible effects of ouabain on UPR, proliferation and apoptosis in HepG2 cells. In this study, we aimed to examine the pharmacological effect of ouabain with/without 2-DG on UPR and apoptosis in HepG2 cell line.

HepG2 cells were cultured overnight in 96-well plates (5×10^3 /well) and then treated with 0.75 nM, 7.5 nM, 75 nM and 750 nM ouabain, in the absence or presence of 10 mM 2-DG during 24 and 48 hours. We also measured quantitatively expression levels of Grp78, Grp94, CHOP, XBP-1, MTJ-1, Cav-1, HKII, MDR-1, MRP-1, HO-1, Par-4 by RT-PCR. PCR-RFLP was also performed to determine IRE1 α activity. Cell number, viability and proliferation of HepG2 cells were evaluated by real time cell analyzer system.

0.75, 7.5 and 75 nM ouabain did not cause cytotoxicity whereas they were very effective under 2-DG stress conditions, as evidenced by real time cell analysis based on electrical impedance signal. 0.75 and 7.5 nM ouabain have the reducing effects on chemoresistance, as suggested by down-regulated MDR-1 expression compared with control. 75 nM ouabain alone induced Grp78 expression, paradoxically, it effectively suppressed 2-DG-induced Grp78 induction, thereby sensitizing HepG2 cells to cytotoxicity. When combined with 2-DG, ouabain decreased both HKII and HO-1 expressions as opposed to 2-DG alone. Par-4 was up-regulated dose-dependently by ouabain alone and it was more pronounced when combined with 2-DG, thereby possibly inducing apoptosis. We also showed that XBP-1 mRNA splicing was activated by 75 nM ouabain.

As a result of our findings, ouabain is not a typical UPR inducer but it can be sensitized cytotoxicity or apoptosis to HepG2 cells in glucose deprivation condition. The UPR disrupted by ouabain in presence 2-DG could be an attractive approach for killing selective cancer cell, and ouabain treatment could provide a chemical basis for developing UPR-targeting drugs against solid tumors. Ouabain as an adjunct to conventional cancer therapy also warrants vigorous investigation.

Keywords: Endoplasmic Reticulum Stress; Unfolded Protein Response; Ouabain; 2-deoxyglucose; Apoptosis

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Hücre fonksiyonlarını yürütmek için proteinler uygun biçimde katlanmış olmalıdır. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler hücre sağkalımına negatif yönde etki edebilir. Endoplazmik Retikulum (ER); hücre zarı, golgi, lizozomlar ve diğer organellere sekrete edilecek olan proteinlerin sentez edildiği ve katlandığı organeldir. ER’de protein katlanmasının çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında bozulması 'ER stres' olarak adlandırılır. Hücre ER stresi yenebilmek için dört farklı yanıt verir. İlk yanıt protein sentezinin durdurulmasıdır. İkinci yanıt, immünglobulin ağır zincir bağlayıcı protein/glukoz regüle protein 78 (BiP/Grp78) ve glukoz regüle protein 94 (Grp94) gibi ER şaperon proteinlerinin sentezini artırmaktır. Üçüncü yanıt ubiquitin-proteozom sistemi tarafından ER’de yanlış katlanmış proteinleri ortadan kaldırmak için ER degradasyon yollarının aktivasyonudur. Dördüncü yanıt ER işlevlerinde ciddi bir şekilde zarar oluştuğunda, hasarlı hücreleri ortadan kaldırarak organizmayı korumak için apoptozdur (93).

Çalışmamızda kullandığımız ouabain, kardiyotonik steroidler sınıfına ait pozitif inotropik etkileri olan bir ilaçtır. Ouabain, membran Na^+/K^+ -ATPaz pompasını doğrudan inhibe ederek hücre içi Na^+ konsantrasyonunu yükseltip plazma membranında yerleşik olan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştirici pompayı aktive ederek hücre içi Ca^{2+} artışına neden olur (45). Etki mekanizması hücre tipine ve doza bağlı olarak değişmektedir. (65) Tüm hücreler ouabain için afinitesi farklı çeşitli Na^+/K^+ -ATPaz formları içerir. Bu yüzden, ouabain kontraktiletiyi, büyüme ve farklılaşmayı dokuya özgü olarak etkiler (109). Farklı hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda ouabainin proliferatif ve apoptotik özellikleri araştırılmıştır (109, 45). Yapılan çalışmalarda farklı hücre tiplerinde kanser hücrelerinin ouabainle muamele edilmesinin apoptotik hücre ölümlerine yol açtığı gösterilmiştir (131, 51, 45, 115, 62). Ancak ouabainin bu etkilerinde katlanmamış protein cevabı (UPR) sinyal yolunun rolü olup olmadığı bilinmemektedir. Yaptığımız literatür taramasında böyle bir çalışmaya rastlamadık. Uygulanan ouabain protokolü ve dozları literatürdeki diğer kanser hücre kültürü çalışmaları esas alınarak tespit edildi (70, 86, 115, 131).

Kimyasal bir glukoz analogu olan 2-deoksiglukoz (2-DG) çalışmamızda UPR’nin aktive olduğu hipoksi-hipoglisemi modeli oluşturmak amacı ile kullanıldı. (55,

107). Ouabain ile 2-DG kombine iken UPR cevabının nasıl etkilendiği araştırıldı. 2-DG doz tespiti literatürdeki hücre kültür çalışmaları göz önüne alınarak yapıldı (42, 107).

Çalışmamızın diğer bir amacı da hepatoselüler karsinom (HepG2) hücre kültüründe adı geçen kimyasal maddeleri farklı doz ve kombinasyonlarda kullanarak antiproliferatif etkileri belirlemektir. UPR aktivasyonu ile tümör progresyonu, ilaç direnci ve invazyon arasında ilişki olduğu birçok yayında rapor edilmiştir. (94, 125, 67). Ouabainin doza bağlı olarak kanser hücrelerinde hem proliferasyonu hem de apoptozu uyardığı bildirilmiştir (25).

Hücre kültürü birçok hücre içi mekanizmaların araştırılabildiği uygun ve güvenilir çalışma koşullarını sağlamaktadır. Aynı zamanda hücreler farklı kimyasallarla muamele edilerek hücrenin vermiş olduğu organel bazındaki cevaplar da araştırılabilmektedir. Çalışmamızda hücre modeli olarak glukoz açlığı ile apoptoza dirençli hale gelen HepG2 hücre hattı seçildi (66). HepG2 hücrelerinde apoptotik olduğu daha önce gösterilmiş olan ouabain farklı süre ve dozlarda uygulanarak UPR gen ekspresyonları değerlendirildi (131).

Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), gen ekspresyon analizleri için sık kullanılmaktadır. Primer ve probler Universal Probe Library (UPL) prob dizayn programı kullanılarak belirlendi ve spesifiklikleri farklı biyoinformatik analizler ile (BLAT, Blast) değerlendirildi. Gen analizi ise kantitatif RT-PCR metodu kullanılarak tespit edildi. Sonuçların yorumlanması komperatif Ct (Threshold Siklus) metodunu kullanan bir software aracılığı ile yapıldı.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), polimorfizm analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. UPR sinyal yollarından biri olan Inositol requiring kinase 1 α (IRE1 α) aktivitesini belirlemek için esas alınan X-Box Binding Protein 1 (XBP-1) mRNA splicing (XBP-1s) düzeyi PCR-RFLP metodu ile analiz edildi. Sonuçlar dansitometrik jel analizi yöntemi ile değerlendirildi.

Bu çalışmada 2-DG modeli oluşturmak suretiyle HepG2 hücrelerinde normoksik şartlarda hipoksi-hipoglisemi şartları oluşturuldu. 2-DG modeli aynı zamanda UPR'nin aktif olduğu bir süreçtir. 2-DG modeli kullanılarak UPR modülasyonu yapan ajanlar belirlenmeye çalışılmaktadır. 2-DG ile kombine iken UPR modülasyonu yapan bir ajan tespit edilebilirse antiproliferatif, antikanser ve apoptotik etki öne çıkıyor demektir. Bu

doğrultuda ouabainin 2-DG ile kombine iken antitümöral etkisinin olup olmadığı ve varsa bu etkinin ER stres ile ilişkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

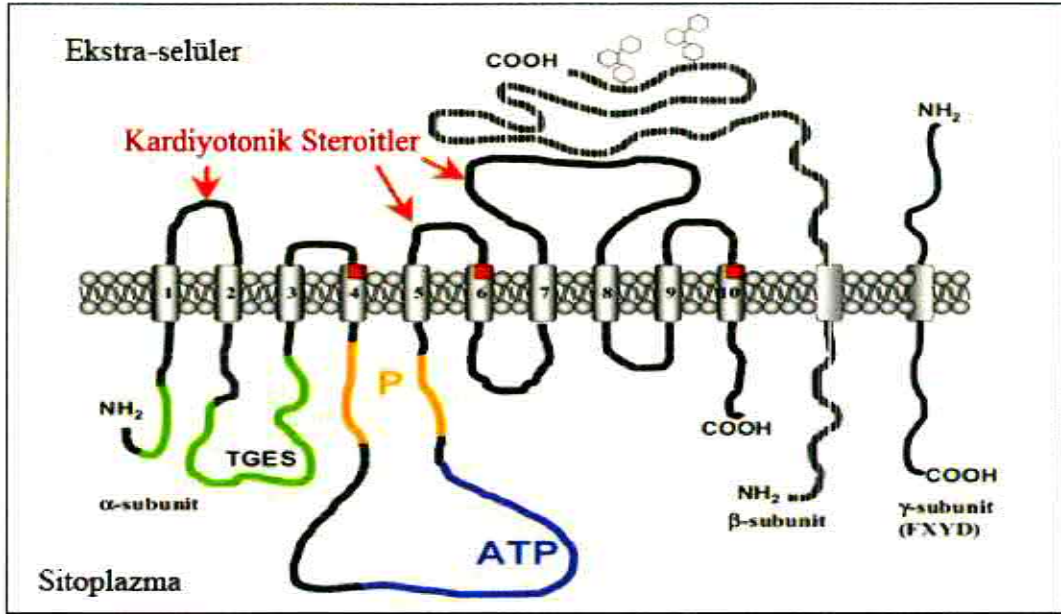
2.1 Na⁺/K⁺-ATPaz POMPASI

Na⁺/K⁺-ATPaz çoğu memeli hücrelerinde bulunan bir integral membran proteinidir. Bir adenosin trifosfat (ATP) molekülünün hidrolizi ile hücreden 3 Na⁺ çıkışı ve 2 K⁺ girişi yapan bir iyon pompasıdır. Bu pompalama süreci hücre hacminin düzenlenmesi kadar, kas ve sinir dokusunun faaliyeti için gerekli olan kimyasal ve elektriksel gradienti üretir ve özellikle aminoasitler, şekerler ve fosfat taşınması için itici bir güç sağlar (131, 72). Son 10 yıldır biriken kanıtlar Na⁺/K⁺-ATPaz'ın bir sinyal reseptörü olarak görev yaptığını göstermektedir. Na⁺/K⁺-ATPaz'ın bu kural dışı fonksiyonu protein kinazlar, membran taşıyıcıları, kanallar ve hücresel reseptörleri içeren çeşitli proteinlerle etkileşimlerine bağlıdır; ouabain gibi endojen veya eksojen kardiyotonik steroidlerin, bu reseptör/protein kompleksine bağlanması protein kinaz kaskadlarını harekete geçirerek çok sayıda ikincil haberciler oluşturur. Na⁺/K⁺-ATPaz'ın birden fazla domain üzerinden Src ile etkileşebileceği in vitro olarak gösterilmiştir. Bu etkileşim Src'yi inaktif durumda tutar; ouabainin Na⁺/K⁺-ATPaz kompleksine bağlanması etkileşimi değiştirip aktivasyon sağlar. Kültür hücrelerinde kaveola içinde Na⁺/K⁺-ATPaz reseptörü Src ile beraber bulunur. Na⁺/K⁺-ATPaz/Src kompleksi ouabain ile aktive edilince protein kinaz kaskadları aktive edilir ve ikincil haberciler oluşur (72). Normal istirahat membran potansiyeli ve çeşitli hücresel faaliyetler için sitoplazmada yüksek K⁺ ve düşük Na⁺ gereklidir. Bunun oluşturulması ve korunmasından sorumlu olan pompa tarafından iyonik homeostazın sağlanması hücre büyümesi, farklılaşması, hücre sağkalımı, hücre migrasyonunun modülasyonu ve hücre-hücre etkileşimleri için önemlidir. Hayvan ve insan kardiyositlerinde ve nöral doku plazma zarında Na⁺/K⁺-ATPaz altbirimlerinin kompleksleri fazlaca bulunur. Ayrıca insan meme kanseri hücrelerinde bulunur. Pompanın meme kanserinde tedavi edici ilaçların gelişimi için potansiyel olarak önemli bir hedef olabileceği önerilmektedir (21).

2.1.1 Na⁺/K⁺-ATPaz altüniteleri

Na⁺/K⁺-ATPaz iki majör polipeptidin farklı moleküler formları ile oluşan bir oligomerdir. Memelilerde bu majör polipeptitler dört yapısal varyantı olan alfa polipeptit ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) ve üç yapısal varyantı olan beta polipeptit ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) olarak tanımlanmaktadır. Farklı oligomerlerde alfa ve beta polipeptit beraberliği Na⁺/K⁺-

ATPaz'ın benzersiz fonksiyonel özellikleri ve doku spesifik ekspresyon paterni olan çeşitli izozimlerini oluşturur. $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformları dokularda yaygın olarak eksprese olan Na^+/K^+ -ATPaz izozimi olup böbrekte yaygın izozimdir. $\alpha 1$ ve $\beta 1$ altbirimine ilaveten böbrekte üçüncü bir gama (gama a ve gama b) polipeptit bulunur (86). N terminal kuyruktaki 2 lizin ve bir lösin içeren LKK motifi sayesinde İnozitol 1,4,5-Trifosfat Reseptör (IP3R) ile bağlanır. Bu motif tüm izoformlarda bulunur ve pompanın sinyalizasyon fonksiyonu için önemlidir (8).



Şekil1. Na^+/K^+ -ATPaz pompası altüniteleri (13)

110 kDa α altünite enzimin katalitik ünitesidir. 31.5 kDa β altünite glikoziledir. $\alpha 1$; böbrek, karaciğer, kalp, beyin, akciğer ve tüm dokularda, $\alpha 2$; beyin, damar düz kas, kalp, adiposit, kartilaj doku ve kemikte, $\alpha 3$; beyin, $\alpha 4$; testiste eksprese edilir. α altünite 10 transmembran (TM) segmente sahiptir, sodyum ve kardiyotonik steroid (KTS) için ekstraselüler segmentte bağlanma bölgesi, potasyum ve ATP için intraselüler luplarda bağlanma bölgesi içerir. Düzenleyici β altünitesi tek bir TM segmente sahiptir ve glikozilasyon bölgesi içerir ve Na^+/K^+ -ATPaz pompa aktivitesini kontrol eder. $\alpha\beta$ kompleksleri fonksiyonel dimerik üniteyi oluşturur. Gama altünite olarak bilinen FXD motifi $\alpha\beta$ kompleksinin spesifik domainleri ile ilişkili olup katalitik özellikleri modüle eder. 4α ve 3β izoformu dokular arasında KTS sensitiveleri farklı olan çeşitli $\alpha\beta$ komplekslerinin oluşumuna izin verir. Rodent böbreğindeki $\alpha 1$ izoformunun ouabaine

sensitivitesinin beyindeki $\alpha 3$ izoformuna göre daha az olduğu bulunmuştur. $\beta 1$; tüm dokularda, $\beta 2$ ve $\beta 3$; beyin, kartilaj doku ve eritrositte eksprese edilir (13).

KTS, $\alpha 1$ ekstraselüler segmentindeki spesifik bağlanma bölgesi (TM1-TM2, TM5-TM6 ve TM7-TM8) ile etkileşir. Ayrıca TM bölgesindeki (M4, M6, M10) bazı aminoasitler ouabain ile etkileşir. Ekstraselüler TM1-TM2'deki 111-122 sekanslardaki aminoasitler KTS bağlanmasında önemlidir. İzoformlardaki aminoasit sekans farklılığı sensitiviteyi farklı kılar. α subünit protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz C (PKC) ile fosforillenir (13). Pulmoner arter düz kas plazma membranındaki kaveol veziküllerinde $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\beta 1$ izoformlar, membranda ise sadece $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformlar belirlenmiştir. 40 nM ouabain ile kaveoldeki Na^+/K^+ -ATPaz enziminin % 40'ı inhibe olurken membrandaki etkilenmediği için inhibisyonunda kaveoldeki $\alpha 2\beta 1$ izoziminin etkili olduğu anlaşılmıştır. Kaveol vezikülünde Kaveolin-1 (Cav-1) ile Na^+/K^+ -ATPaz'ın kolokalize olduğu bulunmuştur (34).

Zhong-Wei ve ark. tarafından Na^+/K^+ -ATPaz $\alpha 1$ altbirim ekspresyonunun HCC dokusunda normal karaciğer dokusundan daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ouabain ve Na^+/K^+ -ATPaz $\alpha 1$ için küçük interferans ribonükleik asit (siRNA) kullanılarak HepG2 hücre çoğalması inhibe edilmiştir (131). Normal insan böbrek hücrelerine (NHK) benzer şekilde otozomal dominant polistik böbrek hastalığında (ADPKD) $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformlar varken ADPKD'de γ izoform varyantlarının arttığı bulunmuştur. Ouabain doz-cevap eğrisi ADPKD hücrelerinin NHK'ya göre % 20 daha fazla ouabain afinitesi olduğunu göstermiştir. Ancak bu afinite farklılığının izoform ekspresyon farklılığı nedeniyle olmadığı düşünülmüştür (86).

2.2 KARDİYOTONİK STEROİTLER (KTS)

Endojen dijitaler, kardenolidler ve bufadienolidler olarak iki grupta sınıflandırılır. Ouabain bir Afrika ok zehiri olan Ouabaio ağacından ve Strophanthus gratus bitkisinden elde edilir. Ouabain, digoksin ve bufalin gibi KTS'ler Na^+/K^+ -ATPaz'ın doğal inhibitörleridir (131). Kardiyak glikozitlerin intraselüler Ca^{2+} artışı ile oluşan inotropik etkisi, miyokard kasılma gücünü artırır (45).

KTS'ler, William Withering tarafından 200 yıl önce konjestif kalp yetmezliği tedavisi için ilaç olarak tanımlanmıştır (110). 1953'de Albert Szent-Györgyi, memelilerde endojen bir dijital varlığını ortaya atmıştır (111). 1953'de Schatzmann, KTS'nin sodyum pompasını inhibe ettiğini ve plazma zarında Na^+/K^+ -ATPaz'ın dijital

reseptörü olduğunu keşfetmiştir. 1957 yılında Skou tarafından, sodyum pompasının biyokimyasal eşdeğeri olarak Na^+/K^+ -ATPaz tanımlanmıştır (110). 1960'larda NCX memeli kalp kasında keşfedilmiştir. 1991'de Hamlyn ve ark. ilk olarak insan plazmasında endojen ouabaini tespit etmişlerdir. Schneider ve ark. ise ilk olarak adrenal bezlerden sentezlendiğini göstermişlerdir (111).

Kardiyak aritmiler ve çeşitli nöronal irritasyonlar gibi toksik etkileri, kardiyak Na^+/K^+ -ATPaz pompasını inhibe ederek kalp kası kasılmasını uyarıcı (pozitif inotropik) etkilerini gölgelemektedir. Terapötik ve toksik KTS konsantrasyonları arasında dar bir terapötik pencere bulunmaktadır ve doz aşımı sonucu ciddi toksisite sık görülür (110).

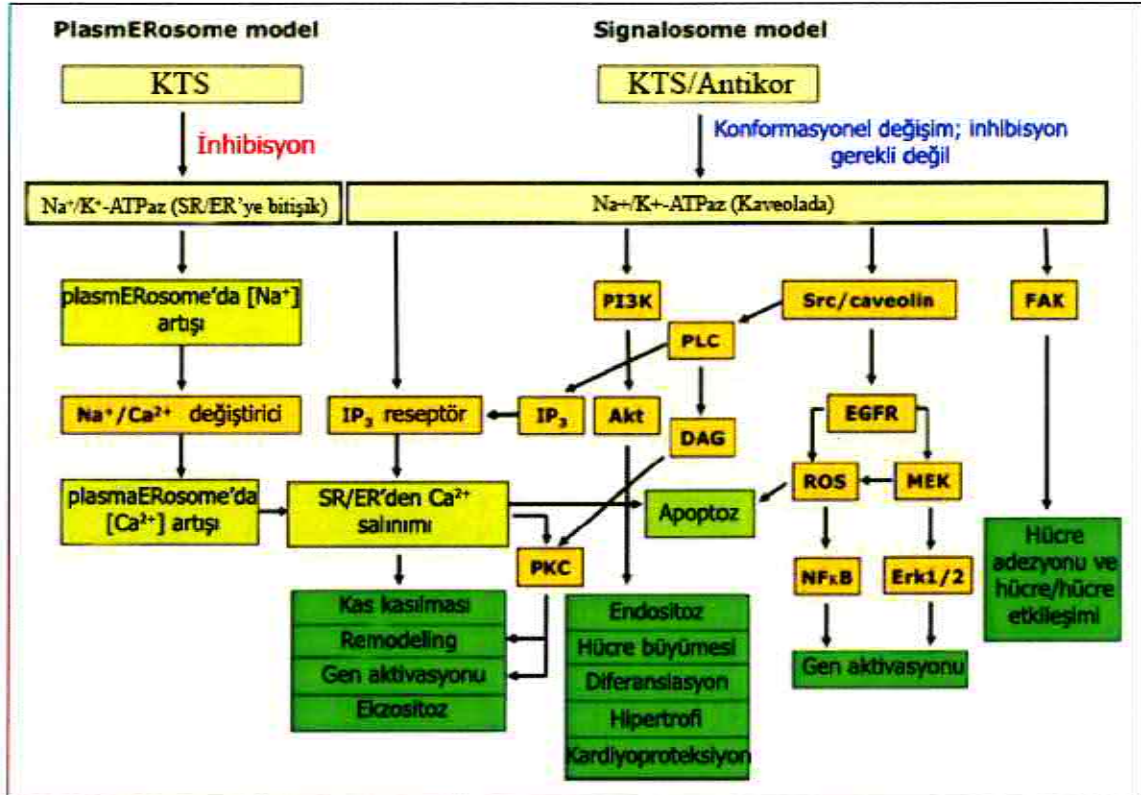
KTS maruziyeti malign meme kanser hücrelerinin, prostat kanser hücrelerinin, insan lösemi hücreleri veya nöronal hücrelerin ölümüne yol açar. Böylece konjestif kalp yetmezliği tedavisi için iyi bilinen KTS malignite tedavisi için olanak sunabilir (62).

2.2.1 KTS sinyal etki mekanizması hipotezleri

Şimdiye kadar hücresel sinyal oluşturmada KTS etkisini açıklayan iki farklı hipotez vardır. İlki, düz kas hücreleri, hipokampal nöronlar veya kemirgenlerin astrositlerinde, sarkoplazmik/endoplazmik retikulum (SR/ER) membranına yakın olan plazma membranının belirli bir alanında yerleşik $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ pompa izoformlarının (plasmERosome) inhibisyonunun KTS ile indüklendiğini varsayar. $\alpha 2$ veya $\alpha 3$ pompa izoformunun inhibisyonu NCX aktivasyonu ile plasmERosome'da Ca^{2+} artışına yol açar. Bu, SR/ER'den sitoplazmaya daha fazla Ca^{2+} salınmasını uyarır ve hücre içi sinyal kaskadı tetiklenir. Arter düz kas hücrelerinde arterioller kasılma bu yolla esansiyel hipertansiyona neden olabilir (110).

Alternatif bir model olarak sodyum pompası, ligandla etkileştiğinde düzenlenen ve birbiriyle iletişim kurabilen kaveola proteinlerinin bir üyesidir. Bu yapıya signalosome denir. Signalosome içinde lokalize olan sodyum pompaları ile KTS etkileşimleri sodyum pompasının konformasyon değişikliğine neden olabilir. Bu değişimle oluşan sinyal, SR/ER IP3R'ü ile pompa α altbiriminin amino terminal etkileşimi sonucu iletilir. Bu iletim ve Src bağımlı fosforilasyon ve fosfolipaz C $\alpha 1$ (PLC $\alpha 1$) aktivasyonu, inozitol trifosfat (IP3) oluşumunu ve ER'den Ca^{2+} salınımını artırır. Ca^{2+} yüksekliği ve PLC $\alpha 1$ üzerinden diaçilgliserol oluşumu PKC'yi uyarır. Src kinaz aktivasyonu, diğer taraftan epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) fosforilasyonu ve Rat sarcoma/Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-activated

protein kinases/extracellular-signal-regulated kinases (Ras/Raf/MEK/ERK1/2) yolunun aktivasyonuna yol açar. Bu sinyal kaskadlarının aktivasyonu sadece gen aktivasyonunu ve hücre çoğalmasını uyarmakla kalmaz, aynı zamanda Ca^{2+} bağımlı KTS etkileri (PKC aktivasyonu gibi) ve sodyum pompası etkileşimi ile oluşan Ca^{2+} -bağımsız sinyalizasyon olayları arasında da bir bağlantı sağlar (110).

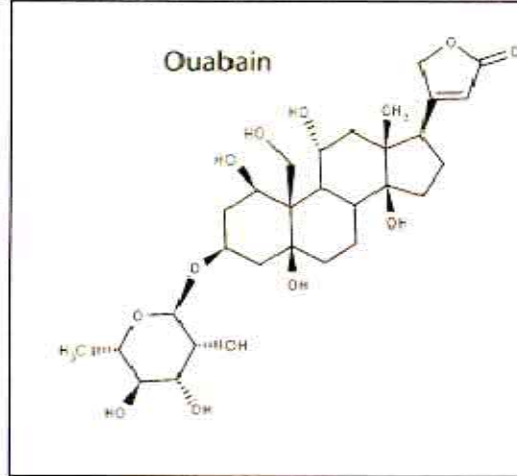


Şekil 2. KTS etki mekanizması (110)

Ras/Raf/MEK/ERK1/2 sinyalizasyon kaskadı, sodyum pompalaması olmayan mutant pompa ile KTS etkileştiği zaman da aktive edilir, bu da yerel Na^+ artışını izleyen Ca^{2+} yüksekliğinin sinyalizasyon sürecinin indüksiyonu için mutlaka gerekli olmadığını göstermektedir. $Na^+/K^+-ATPase$ α altbirimindeki PI3K bağlayıcı aminoterminal motif, yaygın gözlenen KTS bağlı PI3K/Akt kaskad stimülasyonu için moleküler temel oluşturur. PI3K/Akt kaskadı böbrek proksimal tübül hücre çoğalmasını sağlar, insan umbilikal ven endotel hücrelerini apoptozdan korur ve aynı hücrelerde endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) fosforilasyonunu uyarıp nitrik oksit (NO) ürün oluşumunu uyarır. Bu son etki KTS'ye bağlı sodyum pompa inhibisyonu ile ilişkili değildir, aksine KTS nanomolar konsantrasyonlarda % 15-20 sodyum pompası aktivasyonunu uyarır (110).

2.3 OUABAIN

Yapısal olarak KTS'ler; bir steroid çekirdek, buraya bağlanan 5 veya 6 üyeli lakton halkası (kardenolidler veya bufadienolidler) ve şeker bileşeni olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır. Ouabain için şeker bileşeni ramnozdur. Bazı KTS'lerin (geninler) şeker bileşeni eksiktir (26).



Şekil 3. Ouabain kimyasal yapısı (26)

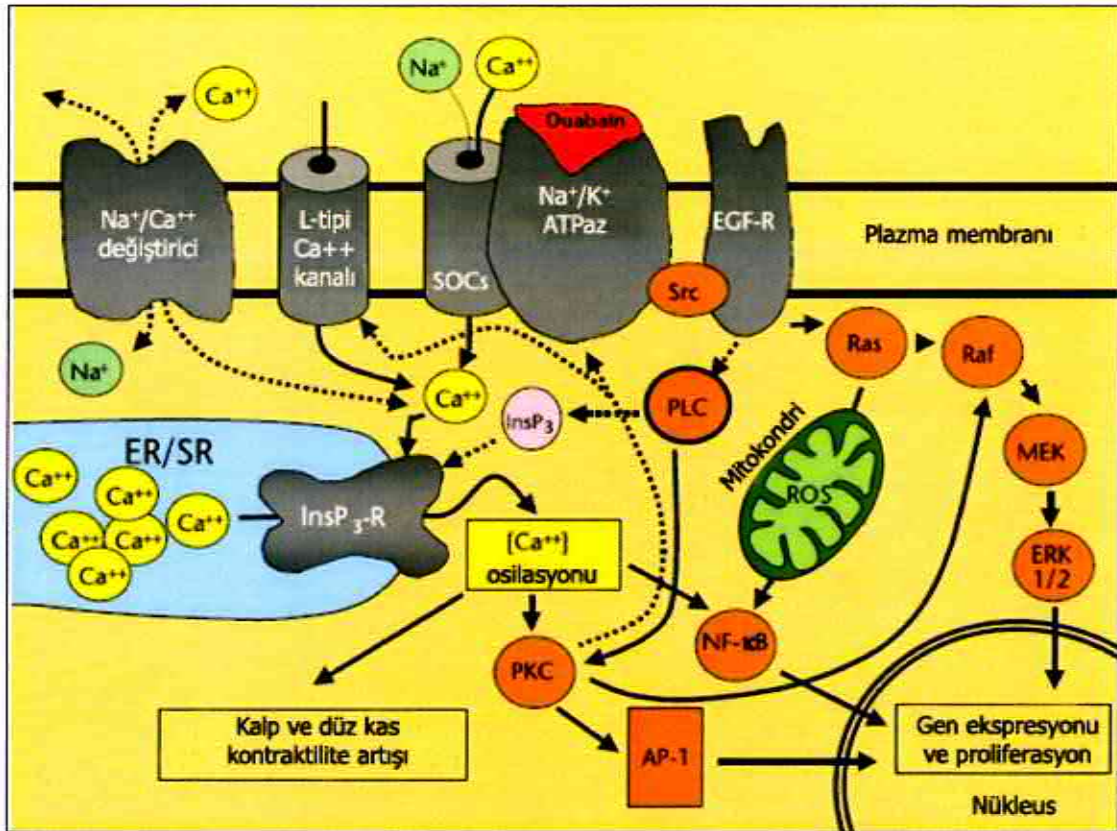
2.3.1 Endojen ouabain

İlk olarak 1991'de John Hamlyn ve ark. tarafından insan plazmasında nanomolar düzeyinde endojen ouabain olduğu bulunmuştur (44, 45). Hamlyn, eksojen ouabain ve endojen ouabainin (EO) molekül ağırlığının aynı olduğunu ve EO'nun 0,3-0,6 nmol/L fizyolojik konsantrasyonu ile aynı dozda eksojen ouabainin biyolojik özelliklerinin tamamen benzer olduğunu doğrulamıştır (131). Hem primer hem de immortal kültür hücrelerinde nanomolar konsantrasyonları çok sayıda sinyal iletimini uyarabilir. Na^+ ve K^+ geçişini etkilemeden $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ yolu ile hücre sinyal yollarını etkileyebilmektedir (45).

Ouabain, adrenal glandlarda ve hipotalamusta üretilen bir memeli hormonudur (111, 109). İlk olarak Schneider ve ark. tarafından adrenallerden sentezlendiği gösterilmiştir. Biyosentezi adrenal zona fasikülata hücrelerinde olur. Sığır adrenokortikal hücre kültüründe ouabainin adrenokortikotropin, alfa1 adrenerjik reseptör agonistleri ve anjiyotensin II ile salındığı gösterilmiştir. Köpeklerde koşu bandı egzersizi ile kanda hızla 50-500 kat arttığı, istirahathte 5-8 dakikada yarmlandığı bildirilmiştir. Sodyum imbalansı, kronik renal yetmezlik, hiperaldosteronizm, konjestif kalp yetmezliği, preeklampsi endojen ouabain konsantrasyonlarının arttığı durumlardır

(111). Memelilerde dolaşımdaki ouabain düzeyinin hücre büyüme ve diferansiyasyon artışını gerektiren gebelik, erken postnatal yaşam ve tek taraflı nefrektomi sonrası gibi durumlarda artmasının önemli olduğu bildirilmiştir. Böbrek büyümesi ve gelişmesinde düzenleyici bir rolü olabilir (70).

İn vitro olarak proliferasyonu sağlamak için gereken eksojen ouabain konsantrasyonu (100 pmol/L) gönüllü sağlıklı insan plazmasında in vivo bulunan ile aynı düzeydedir. Diğer endojen kardiyak glikozitler de memeli plazmasında tespit edilmiştir. Bunlar ouabain ilişkili digoksin benzeri bileşik (DLS) gibi kardenolidler ve marinobufagenin ve proscillaridin A gibi bufadienolidlerdir (45).



Şekil 4. Ouabain sinyal iletim yolları (109)

Aizman ve ark. düşük dozlarda ouabainin Na⁺/K⁺-ATPaz'ı kısmen inhibe ettiğini ve bir hormon gibi davranan ouabainin bir sinyal dönüştürücü ve nüklear faktör kapa beta (NF-κB) aktivatörü olarak etki ettiğini göstermişlerdir (4). Ouabain ile karmaşık hücre sinyalizasyon kaskadları uyarılmaktadır. Sıçan kalp kası hücrelerinde ouabaine bağlı hücre içi Ca⁺⁺ artışı, sırayla PKC ve Raf-ERK1/2 kinaz aktivasyonuna yol açar ve aktivatör protein 1 (AP-1)'i oluşturan transkripsiyon faktörleri c-fos ve c-jun aktivasyonu/ekspresyonuna neden olur. Bu da anormal kas hücre büyümesine yol açar.

Sıçan renal proksimal tübül hücrelerinin primer kültüründe ve böbrek hücre hattında düşük doz ouabainin intraselüler depolardan IP3R aracılığıyla yavaş kalsiyum salınımına ve transkripsiyon faktörü nüklear faktör kapa beta (NF-kB) aktivasyonuna neden olduğu ve bu yolla antiapoptotik ve proliferatif etkileri olduğu gösterilmiştir. Serum açlığı oluşturulan sıçan proksimal tübül hücrelerinde 1 ve 10 nM ouabain apoptotik etkiyi önlemiş ancak Staurosporin'in tetiklediği apoptoza etkisi olmamıştır (70).

Kometiani ve ark., Haas ve ark., Liu ve ark. ouabainin düşük konsantrasyonlarda sıçan kalp miyosit hipertrofisini ve ERK1/2 fosforilasyonunu aktiflediğini ve bu etkilerin intraselüler Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyon değişikliklerinden tamamen bağımsız olduğunu göstermişlerdir (1).

Chibalin ve ark. ouabainin düz kas hücrelerinde Src sinyal yolunu aktive ederek glikojen sentezini ve insülini uyardığını göstermişlerdir. Bu sinyal yolu dijital ilaçların iskelet kasında insülin cevabını geliştirmek için yararlı bir yan etkisi olabilir (8).

Düz kas, insan serviks epitelyal karsinom (HeLa) ve nöroblastom hücrelerinde, ouabainin apoptozu uyardığı buna karşılık, LLC-PK1 ve böbrek hücrelerinde antiapoptotik etkisi olduğu ve sıçan böbrek proksimal tübül hücrelerinde serum yoksunluğu ile uyarılan apoptozu önlediği gösterildi. Ouabainin bu etkileri muhtemelen hücre tipi, dozu, maruz kalma süresi ya da diğer faktörlere bağlı olabilmektedir (65).

2.3.2.2 Kalsiyum mobilizasyonu

Kalsiyum, çok sayıda hücresel fonksiyonları düzenleyen çok yönlü hücre içi sinyal oluşturur. Kalsiyum sinyali hücre içi depolardan veya ekstraselüler ortamdan üretilir. Kalsiyum homeostazı bir dizi reseptörler, sinyal dönüştürücüler, iyon kanalları, tamponlar, efektörler, iyon pompaları ve değiştiricilerle düzenlenir. Ouabainin hücre içi Na^+ 'u yükselterek plazma membranındaki NCX'i aktive etmesi ile intraselüler Ca^{2+} artışını etkileyebileceği düşünülmekte idi ancak, hücre içi Na^+ artışı olmadan da ouabaine yanıt olarak hücre içi Ca^{2+} 'da artış olduğu bilinmektedir. Hücre içi Ca^{2+} düzeylerindeki artış sadece pompa inhibisyonunun sonucu değildir aynı zamanda sinyal iletimi olaylarına da bağlı olabilir. İnsan prostat kanseri hücrelerinde (PC-3) hücre dışı ortamdan hücreye kalsiyum girişinde belirgin bir artış sonucu hücre içi Ca^{2+} yükselmesi olduğu gösterilmiştir. Fare timositlerinde düşük doz ouabainin uyardığı CD69 ekspresyonunu ekstraselüler Ca^{2+} şelasyonunun engelleyebilmesi, düşük doz ouabainle

Ca^{2+} artışının uyarıldığını desteklemiştir. Ayrıca, primer böbrek proksimal tübül hücrelerinde ouabainin uyardığı Ca^{2+} salınımlarının Ca^{2+} içermeyen tampon ile inkübe edilerek durdurulabileceği gösterilmiştir. Benzer olarak 1 nmol/L ouabain ile düşük frekanslı Ca^{2+} salınımları insan göbek kordonu arter endotel hücrelerinde (HUAEC) hücrelerinde de bulunmuştur. Mitokondriyal membran potansiyel kaybı, reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretimi, proteaz aktivasyonu, apoptoz, NF-kB aktivasyonu, endotelin salınımı ve MAPK aktivasyonu gibi nanomolar ouabain uygulamasının gözlenen etkilerinin çoğunun ya doğrudan ya da dolaylı olarak hücre içi Ca^{2+} 'da bir artış sonucu olduğu görülmüştür (45).

Kalsiyum normalde depolandığı ER'den tetramerik bir kalsiyum kanalı olan IP3R yolu ile salınabilir. IP3R kalsiyum konsantrasyon değişimlerine çok duyarlıdır ve hücre içi kalsiyum arttığında kanal kapanır. Bu yüzden kalsiyum salınımları ritmiktir. IP3R inhibisyonu ile ouabainin kalsiyum salınımına olan etkisi önlenebilmektedir. Na^+/K^+ -ATPaz α altünitesinin N terminal bölgesi ile IP3R etkileşir ve periyodik kalsiyum salınımlarını tetikler (8).

2.3.2.3 Hücre sitotoksitesi ve proteaz aktivasyonu

Ouabainin mikromolar düzeylerdeki yüksek konsantrasyonlarda toksik etkisi iki yolla oluşur. İlk olarak, plazma membran potansiyelinin elektrokimyasal kaybına neden olan hücre içi Na^+ birikimine eşlik eden inorganik iyon birikimi, hücre şişmesi ve nekrotik ölüme neden olur. İkinci olarak, hücre içi Na^+ artışı, bunun da sonunda hücre hasarı/ölümüne aracılık eden hücre içi Ca^{2+} 'da sürekli bir yükselmeye yol açan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değişimini etkinleştirerek sinyal iletim yollarını başlatabilir. Ayrıca, pompa fonksiyonunu önemli ölçüde inhibe eden ouabain konsantrasyonları ROS oluşumuna neden olan non-iyonik olaylar ile zarara yol açabilir ve çok sayıda protein kinaz kaskadını başlatabilir (45).

İlk 1888 yılında kristalize edildiğinden bu yana ouabain araştırmalarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen nanomolar konsantrasyonlarının sitotoksik olabileceği ancak son zamanlarda anlaşılmıştır. İnsan prostat düz kas hücrelerinde, 10 nmol/L ouabain hem laktat dehidrogenaz (LDH) salınmasında hem de sistein proteaz kaspaz-3 aktivitesinde önemli bir artışa yol açmıştır. İnsan prostat adenokarsinom PC-3 hücrelerinde, 3 nmol/L ouabain mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden olmuştur. Aynı hücrede oleandrin ve digoksin gibi kardiyak glikozitler apoptozu

uyarmıştır. Ayrıca, daha yüksek konsantrasyonlarda ouabain (100 nmol/L) kaspaz-3 inhibisyonu ile azaltılmış olan apoptozu uyatabilmektedir (45).

Dört ayrı hücre kültüründe Girardi (insan kaynaklı miyoblastik hücreler), LLC-PK1, HK-2 (insan böbrek proksimal tübül) ve sıçan primer vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) yapılan çalışmalarda ouabainin nanomolar konsantrasyonları ile 3 saat içinde kalpainin anlamlı olarak aktive edildiği bulunmuştur. Düşük doz ouabainin (10 nmol/L) Girardi hücrelerinde kalsiyuma bağımlı sistein proteaz olan kalpaini aktive ettiği bilinmektedir. Ouabaine cevapta kalpain yükselmesi Ca^{2+} influksuna ve hücre ölümüne aracılık eder. Köpek VSMC hücrelerinde 1 nmol/L ouabainin EGFR transaktivasyonu yaptığı gösterilmiştir. Bu kalpain 2 (m-kalpain) aktivasyonu için önkoşul olan ERK fosforilasyonu ile sonuçlanmıştır. Kısacası bu veriler, ouabainin düşük dozlarda (nanomolar) sitotoksik olabileceğini ve kaspaz-3 ve kalpain gibi ölüm efektörlerini etkinleştirebileceğini göstermektedir. Kalpain aktivasyonu, endojen kalsinörin inhibitörü cain/cabin1 bölünmesi yolu ile apoptoz, nekroz ve kalsiyumla harekete geçirilen hücre ölümüne yol açabilmektedir. Ouabaine bağlı hücre ölümünün (düşük veya yüksek konsantrasyonlarda) hem nekrotik hem de apoptotik yolların kombinasyonu yolu ile olduğu düşünülmektedir (45).

2.3.2.4 MAPK sinyal yolu

MAPK süper-ailesi üç sinyal yolunu içerir: ERK'lar, c-Jun N-terminal kinaz veya stres aktive kinazlar (JNK/SAPK) ve p38 ailesi kinazlar. Ouabainin nanomolar konsantrasyonlarının p42/44 MAPK fosforilasyonuna yol açan büyüme ile hücre canlılığı ile ilgili ERK1 ve ERK2 olarak da bilinen yolları aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, ouabain uygulanan sıçanlarda uygulanmamış olanlara göre daha yüksek seviyede kalp ERK1 ve ERK2 fosforilasyonu olduğu tespit edilmiştir. Sıçan kalp miyositlerinde yüksek ouabain konsantrasyonları (10-100 mmol/L) kullanılarak sinyal kaskadındaki ilerleme tanımlanmıştır. Ouabain ile tirozin kinaz Src yolu ve Ras protein (15 dk içinde) hızla aktive olduktan sonra Raf/MEK/ERK1/2 aktive olur. Ayrıca, köpek VSMC'de 1 nmol/L ouabainin ERK fosforilasyonuna neden olan EGFR'yi transaktive ettiği bulunmuştur. Ouabainin uyardığı sinyal kaskadları bazen hipertrofi ve apoptoz gelişiminde rol oynadığı düşünülen ROS üretimi ile ilişkilidir (45).

Hücre içi iyon değişikliklerinden bağımsız olarak da Na^+/K^+ -ATPaz ile ouabain etkileşimi sonucu Src/EGFR sinyal yollarının transaktivasyonu olur (131, 124). Farklı

hücre içi bölmelere ouabain sinyali iletmek için sinyal komplekslerinin sitozolik kaskadları organize ettiği ve yakındaki membran proteinleri ile etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir. Aktive Na^+/K^+ -ATPaz /Src kompleksi birçok proteinle bir araya gelip onları fosforile edebilmektedir. Bu da farklı sinyalizasyon kaskadlarının etkileşmesi ile sonuçlanmaktadır. Aktive kaskadlardan biri Src aracılı EGFR1 transaktivasyonunu içermektedir ve farklı hücre hatlarında Src/Ras/Raf/ERK'larla etkileşir. Na^+/K^+ -ATPaz'ın ouabain sinyali iletmek için Src, EGFR ve diğer proteinler ile etkileştiği gerçeği, Na^+/K^+ -ATPaz'ın kaveolada ilişki kurduğu diğer proteinler ile bir araya gelmesinden daha önce pompa sinyalizasyonu olduğunu göstermektedir (124).

2.3.2.5 NF-kB

NF-kB, bağışıklık yanıtı, proliferasyon ve apoptoz sırasında gen aktivitesini modüle eden bir transkripsiyon faktörüdür. NF-kB aktivasyonu, kaspaz aktivitesini kısıtlayan apoptoz inhibitörlerini upregüle ederek apoptozu azaltabilir (45). Normalde NF-kB sitoplazmada inaktif formda tutulur, aktive edilince nükleusa geçer. Böbrek ve endotel hücrelerinde düşük doz ouabain NF-kB'yı aktive ederek açlıkla uyarılan apoptozdan hücreleri korur (8). Primer sıçan kardiyak miyosit ve böbrek proksimal tübül hücre kültürlerinde Na^+/K^+ -ATPaz'ın inhibe edilmediği ve hücre içi Ca^{2+} 'un yükselmediği bir proses olarak ekstraselüler K^+ düşüşü ile ouabain tarafından NF-kB aktivasyonu sağlanabilmektedir. Ouabain ile NF-kB aktivasyonu muhtemelen L-tipi voltaj kanalları aracılıklı Ca^{2+} bağımlı bir olaydır. Na^+/K^+ -ATPaz ile IP3R fiziksel ilişkisi Ca^{2+} salınımlarının oluşması için çok önemlidir ve bu NF-kB aktivasyonunu başlatabilmektedir (45).

2.3.2.6 Endotelin-1 salınımı

Güçlü bir vazokonstriktör ve VSMC hücrelerinde büyümeyi düzenleyen Endotelin-1'in (ET-1) Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. ET-1'in perfüze sıçan kalplerinde ERK1 ve ERK2'yi aktive ettiği ve ouabain ile tedavi öncesi ERK fosforilasyonunda büyük bir artış olduğu gösterilmiştir. HUAEC primer hücre kültüründe sodyum pompasını inhibe etmeden 1 nmol/L ouabainin 5 dakika içinde ET-1 salınımını uyarabildiği gösterilmiştir. Endojen ouabainin vasküler etkilerinin ve esansiyel hipertansiyon patogenezinin muhtemel mekanizmasının bu olabileceği düşünülmektedir (45, 108). Düşük doz ouabainin, endotel hücrelerinden Ca^{2+} ve ET-1 salınımını uyardığı gösterilmiştir (108).

2.3.3 Ouabain-HT

Kardiyak glikozitler LLC-PK1 hücrelerinde Na^+/H^+ değiştirici izoform 3'ün (NHE3) aktivitesini ve ekspresyonunu azaltır. Düşük doz ouabain (50 ve 100 nM), Na düzeyini etkilemez iken NHE3 aktivitesini önemli ölçüde azaltır. Kaveolin-1 içermeyen LLC-PK1 hücrelerinde ouabainin NHE3 üzerindeki baskılayıcı etkisi gerçekleşmemektedir. LLC-PK1 hücrelerinde, ouabainle uyarılan Na^+/K^+ -ATPaz-Src yolu, tiroid hormon reseptörü (TR) deoksiribonükleik asit (DNA) bağlanma aktivitesinde ve transkripsiyon faktör site 1 proteaz (S1P)'da azalma ile sonuçlanır. Bu yeni bulgular, KTS aracılığında gelişen bu volüm artışı tablolarına böbrek kompensatuar yanıtının ve/veya hipertansiyonun altında yatan mekanizma olarak düşünülmektedir (92).

Üremide dolaşımdaki ouabain düzeyinin arttığı ve esansiyel hipertansiyonda sol ventrikül hipertrofi (LVH) remodelingi ile güçlü ilişkisi bilinmektedir. Hücre ölüm aracı olarak bilinen kalpain Ca^{2+} bağımlı sistein proteazdır. Deneysel üremide miyokart hasarının bir medyatörü olarak kalpainin endojen ouabain tarafından aktive edilebileceği gösterilmiştir (46).

2.3.4 Ouabain-hücre adezyonu

Tümör hücrelerinde genellikle hücre-hücre kontağı zayıftır. Larre ve ark. pompa inhibisyonu yapmayan dozlarda ouabainin hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyararak hücreler arası bağlantıyı artırdığını göstermişlerdir. Na^+/K^+ -ATPaz hücre adezyon prosesinde yer almaktadır ve ouabain hücre-hücre kontağını konneksin 32 ekspresyonunu uyararak artırabilmektedir (8).

Ouabainin yüksek dozda (1 μM) hücre dekolmanını tetiklediği gösterilmiştir ve daha düşük dozlarda tight junction (TJ) fonksiyonunu düzenleyen ERK1/2 sinyal yolu ile hücre-hücre etkileşimini düzenlemede etkili olabileceği hipotezi kurulmuştur. Hücre dekolmanı, apoptotik ölüme neden olabilir ve bununla birlikte, genellikle apoptoz hücre dekolmanı ile sonuçlanır (65).

Anoikis metastaz için fizyolojik bir bariyer olarak hizmet eder. Anoikise direnç kanser hücrelerinin dolaşımda hayatta kalmasını ve uzak organlara metastazını kolaylaştırır. Hipotonik medyunda kültüre edilen hücreler anoikise duyarlı hale gelir. Ouabain tarafından Na^+/K^+ -ATPaz pompasının inhibisyonu sonucu hücre içinde artan sodyum ozmoz yolu ile hücreye su girişine neden olur ve hücre boyutu artar. Ouabainin

oluşturduğu ozmotik stres anoikis için önemlidir. Ouabainin çeşitli hücre hatlarında hücreleri anoikise duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. Ouabainin mitokondriyal membran potansiyelini bozarak mitokondriyal kaspaz 8 ve 9 yolunu aktive etmesi ile hücreleri anoikise duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (115).

Barwe ve ark. renal epitel hücrelerde Na^+/K^+ -ATPaz pompasının α ile β altünite arasındaki bağlantının hücre motilitesinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermişlerdir. Bu etki ouabain gerektirmeksizin 3,4,5-trifosfat kinaz aktivasyonu ile olabilmektedir (8).

2.3.5 Ouabain-apoptoz

Apoptoz düzenlenmesinde intraselüler iyon akımları önemlidir. Birçok araştırmacı tarafından hücre içi Ca^{2+} değişikliklerinin genellikle hücre ölümü öncesinde olduğu ve bu değişiklikleri önlemek için antiapoptotik Bcl-2 proteininin etkili (en azından kısmen) olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonunun hücre içi K^+ seviyelerindeki düşme öncesine geldiği ve bu azalmanın inhibisyonu ile kaspaz aktivasyonunun ve hücre ölümünün bloklandığı gösterilmiştir. Önemli olan, kardiyak glikozitlerin hem Ca^{2+} artışına hem de K^+ azalmasına yol açmasıdır (83).

KTS'lerin Na^+/K^+ -ATPaz subunitinin ilk 4 ila 6 TM bölgesini hedefleyerek anti-proliferatif etki gösterdiği iddia edilmektedir. İnsan kanser hücre hatlarında yapılan in vitro çalışmalar ile ouabainin kanser hücrelerini inhibe edebildiği ve düşük dozlarda normal hücre çoğalmasını sağlayabildiği gösterilmiştir. Bunun ana nedeni kanser hücrelerinde Na^+/K^+ -ATPaz ekspresyonunun normal hücrelere göre daha fazla olması ve KTS için bağlayıcı bölge sağlamasıdır. Önceki araştırmalarda Na^+/K^+ -ATPaz $\alpha 1$ altbiriminin PC-3, insan prostat kanseri hücresi (DU 145), insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri (A549), glioblastoma hücreleri (Hs683, U87-MG, U373-MG, T98G) ve meme kanseri hücreleri (MCF-7) gibi malign hücrelerde çokca eksprese olduğu gösterilmiştir. Na^+/K^+ -ATPaz'ın potansiyel bir antikanser hedef olabileceği iddia edilmektedir (131).

Ouabainin inotropik etkileri ile ilgili dar bir terapötik indeksi olması bir anti-kanser ajan olarak gelişimini engellemiştir. Ouabain glioma gibi kanser türlerinde NF- κ B aktivasyonunu baskılamakta, apoptozu uyarmakta ve sitotoksik ilaçların proapoptotik etkilerini artırmaktadır. Son çalışmalarda spesifik siRNA kullanılarak

gerçekleştirilen $\alpha 1$ altbirim ekspresyon azalmasının, hücre içi ATP azalması aracılı aktin iskeleti dağınıklığı ve sitotoksik protofajik etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca $\alpha 1$ altbirim ekspresyon azalmasının, hücre içi Ca^{2+} ve ROS konsantrasyonunu artırma yoluyla akciğer kanseri A549 KHDAK ve glioblastom U373-MG GBM hücre morfolojisini belirgin değiştirdiği, proliferasyonun ve migrasyonun bozulmasında etkileri olduğu gösterilmiştir (131).

İnsan androjene duyarsız prostat adenokarsinomunda kardiyak glikozitlerin, oleandrin, ouabain ve digoksinin in vitro olarak mitokondriden sitokrom c (sit-c) salınımı ve sonrasında kaspaz-8 ve kaspaz-3 prosesi ile apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Oleandrinin kaspaz aktivasyonu sağladığı poly (ADP-riboz) polimerazın (PARP) kırılması ile belirlenmiştir. DNA tamiri ve diferansiyasyon sürecinde kromatin yapısını düzenleyen bir enzim olan PARP, bir kaspaz substratıdır. Proapoptotik etkiler sürekli Ca^{2+} artışı ile ilişkili bulunmuştur (83). Fitohemaglutinin (PHA) kullanılarak protoonkogen c-myc mRNA ekspresyon artışı yolu ile aktive edilen lenfositlerde ouabain apoptozu uyarmıştır (89). Ouabainin östrojen reseptör antagonisti gibi etki gösterebileceği ve meme kanserinde tedavi edici rolü olabileceği iddia edilmektedir (21). Klinik çalışmalarda digital kullanan meme kanserli hastalarda almayanlara göre daha az rekürrens ve daha iyi hayatta kalım olduğu gösterilmiştir (13).

Ouabainin pompa aktivitesini inhibe etmesi sonucu hücre içi Na^+ konsantrasyon artışı, sitomembran depolarizasyonu, voltaj bağımlı Ca^{2+} kanal aktivasyonu ve hücre içine bir Ca^{2+} akını oluşur. Yüksek hücre içi Ca^{2+} ve ROS konsantrasyon artışı ile ouabainin çift iplikçik DNA kırıklarını artırabileceği ve buna bağlı hücre apoptozunu uyurabileceği iddia edilmektedir. Hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyon artışı, Ca^{2+}/Mg^{2+} bağlı çekirdek endonükleaz aktive azalmasına, topoizomeraz I, II (TOP1, 2) aktivite inhibisyonuna ve kromozomal yapı değişikliklerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (131).

2.4 WARBURG ETKİSİ

Otto Warburg H. ve ark. 1924'de ilk olarak oksijen varlığında karaciğer kanser hücrelerinde normal karaciğer dokusuna göre glikolitik aktivitede artış görüldüğünü bildirmişlerdir. Sonraki çalışmalarında bol oksijen varlığında glikoliz artışı sadece solid tümör hücrelerinde değil kültüre lösemi hücrelerinde de gösterilmiştir. Warburg bu glikolitik aktivite artışının erken embriyonik hücrelerde gözlenene benzer olduğunu

göstermiştir. Şimdi kanser hücrelerinin hücre tipi ve hücre büyüme durumuna göre çeşitli derecelerde glikoliz artışı olduğu bilinmektedir. Aerobik koşullar altında, bazı tümör hücreleri glikoliz yoluyla ATP'lerinin % 60 kadarını üretmektedir, oysa normal hücreler ATP'lerinin çoğunu enerji kaynağı olarak glukoz, yağ asitleri ve diğer metabolik araürünleri kullanarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yoluyla elde etmektedirler (23).

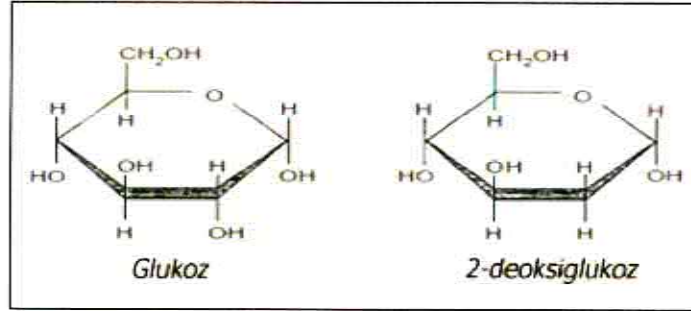
Son yıllarda Warburg etkisi altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak ve potansiyel klinik uygulamalar sağlamak için yoğun çalışmalar yapılmıştır. Neden tümör hücrelerinde glikolizin yükseldiği ve ATP üretmek için daha az enerji verimliliği olan bu yolun kullanıldığı hala açık değildir. Önerilen muhtemel mekanizmalar şunlardır; (1) mitokondrial DNA (mtDNA) mutasyonları ve delesyonlar, (2) nükleer DNA (nDNA) mutasyonları veya anormal gen ekspresyonu, (3) onkojenik transformasyon, ve (4) tümör mikroçevresinin etkisi (23). ROS oluşum bölgelerine mitokondrinin fiziksel yerleşim yakınlığı, DNA tamir kapasitesinin zayıflığı, intron içermeyen gen sekansı gibi nedenler mtDNA mutasyon sıklığını artırır. Mutasyonlar sonucu solunum zincir fonksiyonu bozulur ve glikoliz tercihi artar. Hipoksi ile uyarılan hipoksi inducible transkripsiyon faktör-1 (HIF-1), glikoliz ve glukoz alımı gibi hedeflerin gen ekspresyonunu aktive eder. İnsülin reseptör sinyalizasyonu ile aktive olan PI3K ve Akt sinyal yolu glikolizi ve glukoz alımını artırır. Yine Ras sinyal yolu glikolizi uyarır. Ayrıca Bcr-Abl onkogeni glikolizde rol oynar. Transketolaz benzeri enzim 1 (TKTL1), ksilüloz-5-fosfatı gliseraldehit-3-fosfata çevirir. İnsan kanser dokularında ekspresyonu yüksektir. Trikarboksilik asit döngüsü (TCA) siklusunun iki enzimi fumarat hidrataz (FH) ve süksinat dehidrogenaz (SDH) mutasyonları bazı herediter tümörlerle ilişkilidir (100).

Solid tümörler yavaş bölünen hücrelerin olduğu merkezi bölgeler içerir ve bunlar glikolitik inhibitörlere duyarlıdır (80).

2.5 2-DEOKSİGLUKOZ

2-DG, glukoz analogu ve glikolizin yarışmalı inhibitörüdür (3). 2-DG'nin çeşitli zarflı virüslere karşı antiviral etkileri gösterilmiştir. 2-DG, hücre içinde heksokinaz (HK) tarafından fosforillenerek 2-deoksiglukoz-fosfata çevrilir. 2-deoksiglukoz-fosfat hücrelerin içinde birikir ve ürün inhibisyonu ile heksokinazı engeller. Hayvan çalışmalarında, 2-DG farelerde tek başına 500-2,000 mg/kg doz aralığında önemli bir

terapötik aktiviteye sahip değilken, doksorubisin veya taksol ile birlikte tedavi edici etkinliği artmıştır. 2-DG artık kanser tedavisi için diğer ajanlarla birlikte kombine edilerek klinik kullanımı denenmektedir. Bir klinik çalışmada beyin tümörü olan hastalarda radyasyon tedavisi ile birlikte 250 mg/kg 2-DG kullanımının güvenli olduğu önerilmiştir. Sitotoksite üretmek için yüksek doz 2-DG gereklidir ve in vivo olarak yarıştığı glukozun yüksek seviyede varlığı bu bileşiğin terapötik etkinliğini değiştirebilmektedir (23).



Şekil 6. 2-DG yapısı RL Aft (2002)

Aerobik glikoliz kullanan hücrelere DNA alkilleyici ajan uygulanması, PARP aktivitesini uyarır. Bu enzim glikolitik yolun bir reaksiyonunda gereken kofaktör nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD^+) hızlı tüketimine yol açar ve dolaylı olarak glikolizi inhibe eder. Böylece glikoliz inhibitörü 2-DG ile DNA alkilleyici ajan kombinasyonu cazip bir tedavi stratejisi oluşturur (100).

İnsan meme kanserinde 2-DG kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptoza ve apoptoz sürecinde PARP ile DNA kopmasına yol açar. Bu hücrelerde glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) artışı 2-DG'nin hücreye alımını artırır. 2-DG'nin kanser hücrelerinde birikme nedeni; artmış GLUT1 ile glukoz alımının artışı, artmış hücre içi HK düzeyi veya fosforillenme aktivitesi, düşük hücre içi fosfataz düzeyidir (2). Sıçan fibroblastlarında ve mürin karaciğerinde c-myc overekspresyonunun GLUT1 geninde transaktivasyona yol açtığı gösterilmiştir (90). Bazı insan kanserlerinde GLUT1 ekspresyon artışı olduğu tespit edilmiştir (132). HCC hücre kültüründe düşük glukozlu ortamda 24 saat sonra Grp78 ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır ve UPR aktivasyonu olmuştur. HCC'de Warburg etkisi ile glikolizin arttığı, GLUT1 ve fosfogliserat kinaz1 (PGK-1) düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu tümörlerde glukoz deprivasyonundan dolayı UPR aktivasyon artışının nedeni olarak glikolitik tercih oranının artışı düşünülmektedir (7).

2.5.1 2-DG ve UPR

2-DG protein glikozilasyonu için gerekli olan ATP'nin deplesyonuna yol açarak, UPR'yi uyaran N-glikozilasyonu değiştirir (29, 100). 2-DG'li hücrelerde lipitlere bağlı oligosakkaritler oluşur ve bu oligosakkaritler proteinlere transfer edilmezler. Böylece hatalı katlanan protein birikimi olur ve UPR uyarılır (55). 2-DG, belirli virüslerde asparajin N-glikozilasyonunu bozar. ER tarafından üretilen ökaryotik proteinlerin ortak oligosakkarit modifikasyonu N-glikozilasyondur. Kotranslasyonel süreç olarak glikan glukoz3mannoz9 N-asetilglukozamin2 (G3M9Gn2), bir lipit bağlı oligosakkarit (LLO) olan G3M9Gn2-PP-dolikolden, ER polipeptitlerinin uygun asparajinil kalıntılarına aktarılır. Böylece, LLO sentezinin zayıflığı anormal N-bağlı glikozilasyonla sonuçlanır ve glikan bağımlı katlama ve ER'nin kalite kontrol süreçleri bozulur. Viral glikoproteinlerde LLO sentezi üzerine 2-DG etkileri eksojen mannoz eklenmesi ile geri çevrilir. Ayrıca, bir glukoz analogu olan 2-florodeoksi-D-glukoz (2-FDG), 2-DG'den daha güçlü bir glikoliz inhibitörü olmasına rağmen nispeten LLO sentezini önlemede etkisiz ve böylece N-bağlı glikozilasyonu engellemede daha az etkilidir (63). Fibrosarkom hücreleri (HT1080), insan kolon kanser (HT-29) ve HeLa hücrelerinde 2-DG ile UPR cevabının uyarıldığı, biguanidlerin 2-DG varlığında sitotoksik etkilerini UPR'yi inhibe ederek sağladıkları gösterilmiştir (107).

2.5.2 2-DG'nin etkileri

Sitotoksiste: 2-DG in vitro olarak memeli tümör hücrelerinde sitotoksiktir, in vivo olarak tümör büyümesini inhibe etmektedir. Sıçanlarda fibrosarkoma büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (3). Hipoksik koşullarda artan HIF1 düzeyi ile hücreler 2-DG'ye daha duyarlı hale gelir ve 2-DG'nin sitotoksik etkileri artar. 2-DG ile hücre tipine ve çevresel faktörlere bağlı olarak nekroz veya apoptoz uyarılabilmektedir. Myc ekspresyon artışı olan hücrede 2-DG apoptozu uyarmaktadır (29). Meme kanser hücrelerinde (T47D) 2-DG/doksorubisin kombinasyonunun oksidatif stres ve tiyol metabolizmasını bozma yolu ile sitotoksiste yaptığı ve bunun N asetil sistein (NAC) ile geri çevrilebildiği gösterilmiştir (3). Farklı hücrelerde prokaspaz-8 prosesini uyarak TNF α ile uyarılan apoptozu artırdığı, insan prostat kanser hücre hattında TRAIL ile birlikte Akt defosforilasyonu ve inaktivasyonuna yol açarak apoptozu uyardığı gösterilmiştir (85).

Radyosensitizasyon: 2-DG insan kanser hücrelerinde radyosensitiviteyi artırmaktadır (3). 2-DG enerji açlığında DNA onarımını inhibe etmektedir. Glukoz yokluğunda nikotinamid adenin dinükleotit fosfat redükte form (NADPH) üretimi azalır ve redoks durumu değişip tiyol metabolizması bozulur, artan ROS ve oksidatif stres apoptoza duyarlılığı artırır (85, 57). Beyin tümörlerinde 2-DG, radyasyonun uyardığı sitogenetik hasarı artırmıştır (29). Transforme insan hücrelerinde 2-DG'nin tiyol metabolizmasını bozması, total hücre içi glutasyonu azaltması, NADPH'ı azaltması ve oksidatif stresi uyarması ile hücreleri iyonize radyasyonun sitotoksik etkilerine duyarlı hale getirdiği ve NAC eklenerek bunun azaltıldığı iddia edilmiştir (74).

Kemosensitizasyon: İlaçların hücre dışına atılımını sağlayan pompanın aktivitesi için ATP gerekir, 2-DG ile ATP azalması ilaç pompasının fonksiyonunu bozarak hücrede ilaç birikimine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (80). 2-DG'nin insan glioma ve skuamoz kanser hatlarında kamptotesin ve etoposid sitotoksitesini, ayrıca prostat ve pankreas hücre hattında paklitaksel, adriamisin, cisplatin sitotoksitesini artırdığı gösterilmiştir (29). A549 insan akciğer kanser hücresinde 2-DG'nin UPR'yi uyarak cisplatine (CIS) duyarlılık artışı ve apoptoz yaptığı belirlenmiştir. 2-DG ve CIS'in birlikte Grp78 düzeyinde önemli artışa neden olduğu ve kaspaz-2 aktivasyonu ile proapoptotik BAX'ın mitokondriye transloke olması sonucu sit-c salınımı, Apoptotik proteaz active edici faktör 1 (Apaf1), kaspaz-9, kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptoz geliştiği bildirilmiştir (33).

2-DG hücrede çeşitli hayatta kalım yollarını aktive etmektedir. Glikoliz veya mTOR sinyal yolunun inhibisyonundan bağımsız olarak onkoprotein PI3K/Akt yolunu aktive eder. İnsülin benzeri büyüme faktörü 1/IGF bağlayıcı protein 3 (IGF1/IGFBP3) kompleksini bozarak IGF1'i serbestleştirir ve IGF1R sinyali üzerinden MEK-ERK yolunu uyarır. Küçük hücreli dışı akciğer kanser (NSCLC) hücresinde Akt fosforilasyonunu uyarır. Raf-MEK-ERK kinaz ve bu yolun hedef proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar. 2-DG'nin Akt fosforilasyonu yapması için Src ve EGFR gerekmemektedir. Hem glikoliz hem de insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptör (IGF1R) beraber inhibe edilirse hücre ölümünde sinerjik artış olur (139). Proapoptotik BAX, BAK eksikliği olan embriyonik fare fibroblastlarında (MEF) glukoz deprivasyonu kaspaz-8 aktivasyonu yolu ile apoptozu uyarmıştır. İnsan HeLa

hücrelerinde kaspaz-8 üzerinden apoptozu uyarmıştır. Kaspaz-8 eksikliği olan tümörlerde glukoz deprivasyonuna direnç olabileceği düşünülmüştür (19).

2.6 ENDOPLAZMİK RETİKULUM

ER, hücre proteinlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan salgı ve membran proteinlerinin sentezi ve katlanması için gerekli olan perinükleer bir organeldir (67). Ökaryotik hücrelerde bulunan ER, tübül, kanal ve keseciklerin birbirlerine bağlantıları ile membranöz ağ yapısından oluşur, ayrıca ribozom ve nükleusla yakın etkileşimi vardır. Protein sentezinin kalite kontrol merkezi olarak bilinir (56).

2.6.1 Endoplazmik Retikulum Tipleri

2.6.1.1 Düz Endoplazmik Retikulum

Düz ER yüzey alanını genişleten tübül ve vezikül dallanmalarına sahiptir. Çizgili ve düz kaslarda bulunan düz ER, sarkoplazmik retikulum adını alır. Lipit-steroit sentezi, karbonhidrat metabolizması, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesi, ilaç detoksifikasyonu, reseptörlerin hücre membran proteinleri ile temasının sağlanması, glukoz-6-fosfataz enzimi ile glukoneogeneizde glukoz-6 fosfatın glukozla dönüştürülmesi gibi görevlere sahiptir (49, 56).

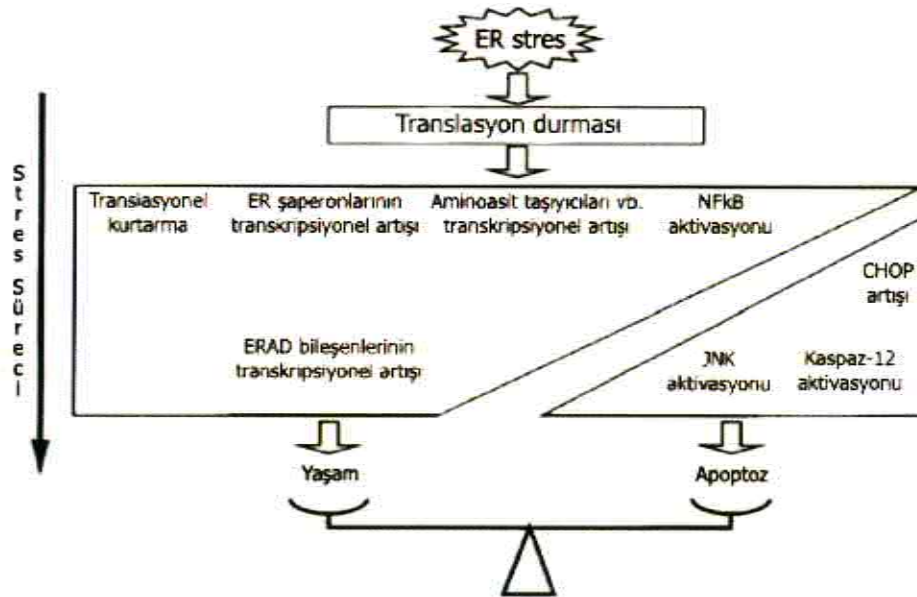
2.6.1.2 Granüllü Endoplazmik Retikulum

Protein sentezi sürecinde ribozom ile granüllü ER yakın etkileşim halindedir, sentez sona erdikten sonra ribozom ER'den ayrılmaktadır. Hücre dışına gönderilecek ve membran yapısında yer alacak proteinler burada sentezlenerek transport edilmektedir (49, 56).

2.7 ER STRES

Hücre fonksiyonlarını yürütmek için proteinler uygun biçimlerde katlanmış olmalıdır, katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinler hücre sağkalımına zararlı olabilir. ER, hücre zarı, golgi, lizozomlar ve diğerlerine sekrete edilecek olan proteinlerin sentez ve katlanma bölgesidir. Ancak ER'de protein katlanmasının çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında bozulması topluca 'ER stres' olarak adlandırılır. ER stresinin üstesinden gelmek için, bu organel en az dört cevabı içeren ER stres yanıt yolu olarak adlandırılan, spesifik bir sinyal yoluna sahiptir. İlk yanıt, yeni protein sentez yükünü azaltmayı ve daha fazla katlanmamış protein birikimini önlemeyi hedefleyen translayon durdurulmasıdır. İkinci yanıt, BiP/Grp78 ve Grp94 gibi ER şaperon

proteinleri, peptidil disülfid izomeraz (PDI) ve peptidil-prolil izomeraz dahil olmak üzere enzimleri ve sarkoplazmik ER Ca^{2+} ATPaz 2 (SERCA2) dahil ER protein katlama kapasitesini arttırmak için gereken yapısal bileşenleri kodlayan genlerdeki upregülasyondur. Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalar bu genlerin translasyon durması ile hücreyi kurtarma, aminoasit importu, glutasyon biyosentezi ve oksidatif strese karşı koruma durumlarında upregüle olduğunu göstermiştir. Sonraki aşamada ubiquitin-proteazom sistemi tarafından ER'de hatalı katlanan proteinleri ortadan kaldırmak için, ER degradasyon artırıcı mannozidaz-protein (Edem) dahil ER ilişkili degradasyon bileşenleri (ERAD) transkripsiyonel olarak aktive edilir. Ayrıca, immün ve antiapoptotik cevapların bir medyatörü olarak bilinen transkripsiyon faktörü NF-kB aktive edilir. ER'de membran proteinlerinin birikimi ile tetiklendiği için bu yol ER aşırı tepki (EOR) yolu olarak belirtilir. Bu stresin ER'den Ca^{2+} salınımına ve bunu izleyen inhibitör kappa beta (IKB) degradasyonu tarafından NF-kB'yı etkinleştiren reaktif oksijen ara ürün üretimine yol açtığı sanılmaktadır. Ancak, EOR sinyalizasyonunda Ca^{2+} geçirgenliğinin nasıl artırıldığı bilinmemektedir. NF-kB indüksiyonu için ökaryotik translasyon inisiyasyon faktörü 2 α (eIF2 α) fosforilasyonu gerekli olduğuna dair bulgular, EOR için stres iletici molekülün diğer ER stres uyarıcı transkripsiyonal program ile ortak olabileceğini göstermektedir. Dördüncü aşama, ER işlevlerinde ciddi bir şekilde zarar oluştuğunda, hasarlı hücreleri ortadan kaldırarak organizmayı korumak için apoptozdur (93).



Şekil.7 ER stres (93)

En az üç apoptoz yolunun bu apoptotik olaylarla ilgili olduğu bilinmektedir. İlki, CCAAT/enhance binding protein (C/EBP) homolog protein (CHOP) için gen transkripsiyonel aktivasyonu, ikincisi “Ire1-Tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü ilişkili faktör 2 (TRAF2)-apoptozis sinyal-regulating kinase1 (ASK1)” kompleks oluşumunda aracılık eden JNK yolu aktivasyonu, üçüncüsü ER-iliskili kaspaz-12 aktivasyonudur. Kaspaz-12'nin ER stres ile aktive edildiği ancak ölüm reseptörü aracılı veya mitokondri hedefli apoptotik sinyallerle aktive edilmediği düşünülmektedir. Sonunda her üç apoptoz yolu, ER stres sinyallerini mitokondriye ilettiği düşünülen kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olur. Ayrıca, ER stres aracılı apoptozda BAX ve BAK öldürücü rol oynar, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu CHOP'a bağlı apoptozu bloklar. Bu nedenle mitokondri, bir entegratör ve ölüm yolunun amplifikatörü olarak fonksiyon görür (93).

2.7.1 UPR sinyal yolları

Son 20 yılda UPR yanıtı ile kinaz sinyalizasyonu geliştiği ve transkripsiyon faktör kaskadlarının aktive olduğu belirlenmiştir. Çoğu çalışmada bu stres cevabının adaptif olduğu ancak CHOP ekspresyonu ile yürütülen hücre-otonom apoptozdan dolayı adaptasyona uyumsuz programlar da içerdiği sonucuna varılmıştır. UPR'nin genetik analizleri, moleküler şaperonlarla entegre sinyal kaskadları kümesi olarak bu metabolik stres yanıtının ERAD ile uyarıldığını ve global translasyonun geçici bastırıldığını kanıtlamıştır (38).

Üç tane ER transmembran proteini, ER strese duyarlıdır ve lümenenden sitoplazmaya ve nükleusa sinyal iletir: Protein Kinase RNA (PKR) like ER kinase (PERK), IRE1 ve activating transcription factor 6 (ATF6). Bu üç protein homolog lumenal domainleri sayesinde ER yerleşik şaperon BiP'e bağlanarak inaktif halde tutulur. UPR aktivasyonu BiP'in lumenal domainlerden ayrılmasına neden olur (79).

2.7.1.1 PERK yolağı:

Grp78, hücre ER stresi altında iken Ire1, PERK, ATF6 sinyal dönüştürücülerinden ayrılır. UPR bu sinyal yollarını aktive eder, Grp78 ayrıldıktan sonra, serin/treonin transmembran kinaz olan PERK otofosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlamak için dimerize olur (126). Aktive PERK genel translasyon başlama oranını azaltmak ve daha fazla protein sentezini engellemek için eIF2α'yı fosforiller (126, 112, 113, 130). Ancak, fosforile eIF2α, 5'untranslated bölgede

inhibitör upstream açık okuma çerçeveleri (uORFs) içeren mRNA'ların translasyon artışı için seçici olabilir (126). eIF2 α -bağımlı translasyonel blok, 5'untranslated bölgede (UTR) belirli regülatör sekansları taşıyan genler tarafından bypas edilebilir. Örneğin internal ribozomal giriş bölgesi (IRES) bulunan genler bu bloktan kaçabilir (119).

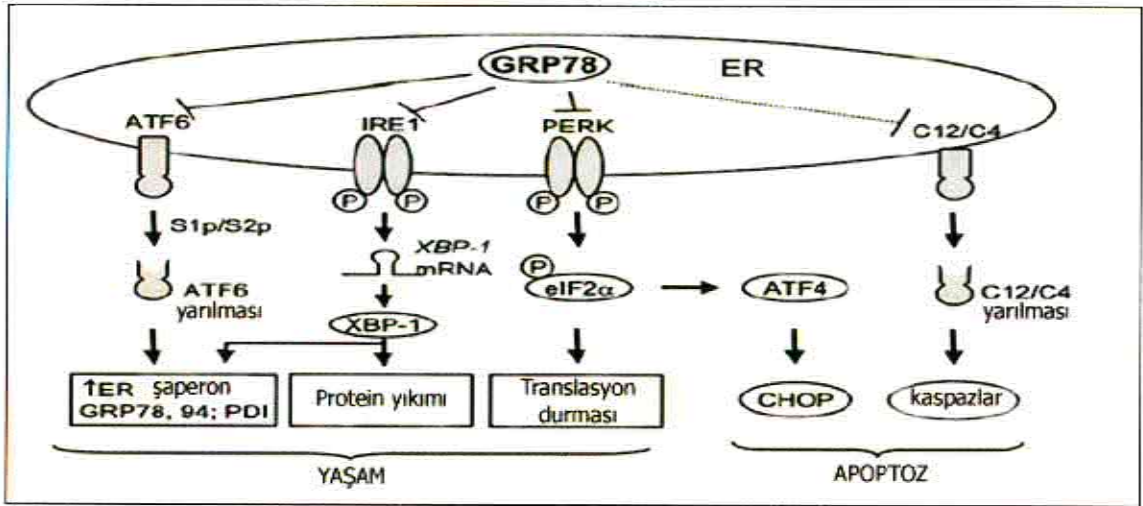
Yine PERK tarafından nuclear factor-erytroid 2-related factor 2'nin (Nrf-2) fosforillenmesi, nükleusa Nrf-2 translokasyonunu ve antioksidan protein transkripsiyonunu sağlar (112, 113). PERK aktivasyonu, CHOP ve growth arrest and DNA damage inducible gene (GADD34) gibi hedeflerin aktivasyonu ve siklin D1 downregülasyonu için gereklidir (79).

2.7.1.2 ATF6 yolağı

Basic Leucine Zipper Domain (bZIP) motifi taşıyan ATF6 Grp78'den ayrılınca ER'den golgiye yer değiştirip golgide S1 ve S2 proteazlarla kırılır, ATF6'nın aktif kırılmış formu nükleusa göç eder ve çeşitli UPR hedeflerinin promoterindeki ER stres response elemente (ERSE I ve ERSE II) bağlanıp ER katlama kapasitesini çoğaltıcı Grp78, Grp94 gibi ER şaperon proteinleri, PDI gibi katlayıcı enzimleri, XBP-1, CHOP ve Homocysteine-induced ER protein (Herp) sentezini upregüle etmek için aktif bir transkripsiyon faktörü gibi davranır (126, 112, 113). XBP-1s UPR elementler (UPRE) için daha spesifiktir (79).

2.7.1.3 IRE1 yolağı

IRE1 α ; 977 aminoasitten oluşur, pankreas ve plasentada daha fazla olmak üzere tüm dokularda eksprese edilirken, IRE1 β ; 925 aminoasit olup intestinal epitelyum hücrelerinde eksprese edilir (12). Transmembran IRE1 proteini, N-terminal ucu ER lümeninde, C-terminal ucu sitoplazmada yerleşik olup Grp78 ile kompleks halindedir. Grp78'den ayrıldığında aktive olarak endoribonükleaz aktivitesi ile XBP-1'in messenger RNA'sından (mRNA) 26 nükleotiti uzaklaştırır. Bir transkripsiyon faktörü olan kırılmış XBP-1 mRNA proteini, ER şaperonlarının ve protein degradasyonunda görevli faktörlerin sentezinde artışa yol açar (112, 113, 126). DnaJ, p58, ERdj4, EDEM ve PDI, protein katlanması ve ERAD'da rol alan bütün proteinlerin genleri hedef genleridir. ER şaperonları, katlama enzimleri ve ERAD'da yer alan proteinler ile uyarılan translasyonel ve transkripsiyonel süreçlerin geçici inhibisyonu ER'de protein agregasyonunu hafifletmek için UPR tarafından gerçekleştirilmektedir (126).



Şekil 8. UPR sinyal yolları (125)

2.7.2 UPR ve apoptoz

Ciddi ve uzun süreli ER stres altında, UPR apoptoz yolu ile hücre ölümüne özgü yolları aktive eder. ER stres altında, proapoptotik BH3 proteinlerden BAX ve BAK, ER membranında konformasyonel değişime uğrar ve m-kalpain aktivasyonu yapan Ca^{2+} 'un sitozole çıkışına izin verir ve sonradan m-kalpain prokaspaz-12'yi kırıp aktive eder ve kaspaz-3 ve kaspaz-9'u içine alan kaspaz kaskadı aktivasyonuna neden olur (126). Bu yol Apaf-1 ve mitokondriyal sit-c salıverilmesinden bağımsızdır. ER'den salınan Ca^{+2} mitokondri tarafından alınır ve iç membran potansiyeli bozulur. Sonuç olarak apoptoz başlatılmış olur (64).

Bir downstream UPR efektörü olan CHOP, Bcl-2'yi inhibe eder, büyüme arrestini uyarır, GADD34 ve ER oxidoreductin 1'i (ERO1) aktive eder ve böylece apoptozu uyarır. GADD34 upregülasyonu eIF2α fosforilasyonunda feedback inhibisyon sağladığından CHOP'un hücre ölümü ve hayatta kalmadaki rolü şartlara bağlı olabilmektedir. Aktif IRE1, c-Jun-N-terminal inhibitör kinaz (JIK)'a bağlanır ve ASK1 ile JNK'yı aktive eden TRAF2 ile etkileşir ve prokaspaz-12 ER'den serbestleşir. ER stres, BAX ve BAK'ın aktivasyonuna ve apoptoza yol açan proapoptotik apoptoz p53-upregüle modülatör (PUMA) ve NOXA'yı aktive eder (126).

Bir yıkım ve sitozolik geri dönüşüm süreci olan otofaji, , kümelenmiş proteinler ile fazla ya da arızalı organeller için bir katabolik süreçtir ve hücre yaşamını sürdürmeyi amaçlar. ER stresi otofajiyi indükler ve açlık şartlarında hücre içi kaynakların kullanımını sağlayarak hücre canlılığını teşvik eder. ER'nin önemli bir bileşeni olarak

Grp78, ER bütünlüğü ve ER stresin uyardığı otofaji için gereklidir. siRNA kullanılarak Grp78 baskılanmış hücrelerde ER yapısı bozulmakta ve otofagozom oluşumu hem ER stres hem de besin açlığı koşulları altında baskılanmaktadır (126).

Apoptozda kaspaz aktivasyonu iki genel yol aracılığı ile oluşur (83).

2.7.2.1 İntrensek (mitokondriyal) apoptoz yolu

Apoptotik uyarıların mitokondriyal homeostazı bozması sonucu sit-c'nin sitozole salınımına cevap olarak Apaf1 proteini ile oluşturduğu kompleks apoptozomdur. Kaspaz-9, apoptozomla bir araya geldikten sonra dimerizasyonla aktive edilir ve sonrasında kaspaz-3 ve kaspaz-7 sırayla devreye sokulur. Mitokondriyal yol Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir. Kaspaz-8 aktivasyonu BID'in kırılması yolu ile mitokondriyal sit-c salınımına yol açabilmektedir (83). Kanseri hücrelerinde sıklıkla antiapoptotik Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1'in ekspresyonu artmıştır veya proapoptotik BAX ve BAK'in fonksiyonu azalmıştır (19).

2.7.2.2 Ekstrensek apoptoz yolu

Fas/CD95, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), TNF gibi ekstraselüler ligandlara cevap olarak multimerik death-inducing signaling complex (DISC) ile kaspaz-8 bir araya gelerek kaspaz-8 ve kaspaz-10 aktive edilir (19, 83). Böylece ligand bağlı multimerizasyon doğrudan kaspaz aktivasyonuna yol açar (83). 2-DG, TNF ve TRAIL ile uyarılan apoptozu artırmaktadır. Prostat kanserinde glukoz açlığı TRAIL ile uyarılan apoptozu Akt inhibisyonu ile artırmıştır (85). Glukoz açlığı fibrosarkoma hücrelerinde TNF'nin uyardığı apoptozu ROS artışı ile katkı sağlamıştır (57).

2.7.3 Kanseri hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR

Kanseri hücreleri hem iç hem de dış faktörler nedeniyle ER strese maruz kalır. Kanseri hücrelerinde artmış glikolitik aktiviteli yüksek glukoz metabolizması vardır ve sıklıkla solid tümörlerin büyüme hızı, kan akımı desteğinden daha fazladır (67, 126, 71). Glukoz yoksunluğu, asidoz ve ciddi hipoksi ile karakterize ikinci bir tümör mikroçevresi oluşur (67, 126). Bu kombine faktörler ER içinde hatalı katlanan proteinlerin birikimine yol açar (67, 126, 71). Protein yükü olduğu zaman ER'nin katlama kapasitesini aşar, UPR tetiklenir. Koruyucu önlemler olarak PERK, IRE1/XBP-1 ve ATF6 sinyal yolları aktive olur, genel translasyon durdurulması, şaperonların ve katlama enzimlerinin upregülasyonu ve hatalı katlanan proteinlerin yıkımında artışla

sonuçlanır. ER stres şiddetine bağlı olarak, UPR'ye mitokondriyal yolların eşlik etmesiyle ER aracılıklı apoptotik yolların aktivasyonu sonucu hücre ölümü oluşabilir. ER stres, hem hücre ölümü hem de sağkalımının bir arada bulunduğu hücrel bozulma süreci olan otofajiyi uyarmaktadır (67).

Xenograft modellerinde XBP-1, hipoksik koşullar altında hücrenin hayatta kalımı ve tümör gelişimi için gereklidir. PERK tümör büyümesi için avantaj sağlar. Tümör mikroçevresinde diğer bir major UPR adaptif sağkalım yanıtı Grp78 indüksiyonudur (67).

Grp78'in aşırı ekspresyonu üriner ve solunum sistem tümörlerinde, meme, beyin, prostat, böbrek, mide ve HCC'de mevcuttur. Yüzey Grp78 artışı prostat, over, mide kanseri ve melanomada mevcuttur. Grp78 artışı tümör progresyonu ile ilgili olmasına rağmen tersine bir durum olarak akciğer, ösefagus ve nöroblastomda daha iyi hasta yaşamı ile korele bulunmuştur (135).

2.7.4 ER'de yerleşik proteinlerin ER'den kaışı

ER ve Golgi arasındaki dinamik ara kompartmandan şaperonları tekrar ER'ye yönlendiren reseptörleri sayesinde şaperonlar ER'de tutulur. ER reseptörleri, şaperon proteinlerin temel aminoasit dizilimlerinde kodlanmış motifleri (lumenal şaperonlar için KDEL tetrapeptit dizisi ve membrana bağlı şaperonlar için onların C terminalindeki dilizin motifler gibi) tanıyarak proteinleri ER'de tutarlar. KDEL motifleri içeren ER'de yerleşik şaperonlar Grp78, Grp94, kalretikülin ve PDI'dır. Bu ER şaperonlarının bazılarının belirli hücrelerin yüzeyinde bulunduğuna dair kanıtlar artmaktadır ve hücrel fizyolojide işlevlere sahiptirler. İnsan fibroblastlarında yüzey kalretikülin fibrinojen için bir reseptör olarak fonksiyon görür ve mitojenik etkiler için şarttır. Melanom hücrelerinin yüzeyinde bulunan kalretikülin hücre yayılmasının başlatılmasından sorumludur. PDI trombosit plazma membranında mevcuttur ve patolojik fonksiyonlarda gerekir. İmmatür CD4/CD8 timositlerde moleküler şaperon kalneksinin hücre yüzey ekspresyonu görülmektedir. Çalışmalarda hücre yüzeyinde Grp78 ekspresyonu bildirilmiştir, Grp78 mitogenez ve hücrel proliferasyon ile ilgili bir hücre yüzey reseptörüdür. Sinyal reseptörü işlevine ek olarak yüzey Grp78, sınıf I major histocompatibility complex (MHC I) antijenler ile ilişkilidir ve hem Dengue virüsü hem de Koksaki virusu için bir reseptör olarak tespit edilmiştir. ER'de yerleşik Grp78 ER'den kaçarak hücre yüzeyine transloke olmaktadır (84).

ER’de yerleşik proteinin ER’den kaçışı tüm hücre ve proteinlerin özelliği olmayıp daha ziyade seçicidir. Ayrıca, ER’den proteinlerin kaçışı devam eden protein sentezini gerektirir. Şekillendirilmiş ER proteinleri oldukça verimli korunurken bu yeni sentezlenen proteinler kaçabilmektedir. Şaperonların koşaperonlar gibi diğer proteinler ile hücre yüzeyinde birlikteliği, katlanma ve olgunlaşma sürecinde onların ER’den kaçışı ile sağlanabilir. Böylece şaperon-protein kompleksleri ER tutulumu için kritik olan domainleri engelleyebilir. ER kaçağı olan hatalı katlanmış veya yerleşik proteinler, sitoplazmik dibazik geri alma motifleri ile etkileşim yoluyla protein 1 kaplı veziküller içine geri alınır. Sitoplazmik protein olan 14-3-3, dibazik bölge ile kaplı protein 1’in ilişkisini inhibe etmek ve proteinin ER’den ileriye taşınmasına izin vermek için PKA fosforilasyonuna bağımlı bir şekilde etki yapmaktadır (84).

2.8 GLUKOZ REGÜLE PROTEİN 78 (Grp78)

ER şaperon proteini olan Grp78 ilk olarak 1977’de tanımlanmıştır. Grp78, Grp94 ve Grp58 ile birlikte keşfedilmiştir ve her üç protein de glukoz açlığı ile uyarılan hücre proteinleri olarak bilinmektedir. (67, 126, 94). Glukoz açlığındaki hücre kültürlerinde ve diğer stresle uyarılmış durumlarda Grp’ler aile olarak upregüledir. ER protein katlama makinesinin bir parçası olarak Grp78, UPR’de kritik bir role sahiptir. Hücre içi protein trafiğinin düzenlenmesinde, apoptozda, yüzey reseptör aracılı endositozda ve bir reseptör gibi fonksiyon gören hücre yüzey proteini olarak önemli görevleri vardır (94). Yeni sentezlenmiş polipeptitlerin ER membranından translokasyonu, katlanması, olgunlaşması, transportu ve retrotranslokasyonu dahil birçok hücre proteinleri için gereklidir (84). Bir hücre yüzey proteini olarak Grp78 farklı ligandları bağlar. Fonksiyonlarından biri aktive α 2-makroglobulin (α 2-MG) için bir sinyal reseptörü olarak hizmet etmektir. Hücre yüzey Grp78 çeşitli kanserlerde önemli bir otoantijendir. Protein sentez inhibisyonu ve apoptozdaki ER bazlı rolünün aksine, bir hücre yüzey reseptörü olarak Grp78 sinyalizasyonu DNA sentezi, protein sentezi ve hücre protein proliferasyonu artışı ile sonuçlanır (94).

BiP (immünglobulin ağır zincir bağlayıcı protein) veya HSPA5 olarak da isimlendirilen insan Grp78 proteini 78 kDa olup 654 aminoasitten oluşur. N-terminal ucunda ER sinyal peptit, 44 kDa ATPase domain, 20 kDa peptit-binding domain ve C-terminal ucunda KDEL motif içermektedir. Ayrıca, fonksiyonu bilinmeyen yüksek helikal ve değişken 10 kDa ağırlığında C terminal kuyruk içerir (84). Grp78, ER’de yeni

sentezlenen proteinlere geçici olarak bağlanır ve yüksek afinite ile ER'den taşımamak olan hatalı katlanan proteinlerin çıkışı önlenir (84).

Memelilerde oligomerik ve monomerik formlarda bulunur. Monomerik form biyolojik olarak aktiftir. Oligomerik form ise ATP bağlanınca aktif monomerik forma çevrilir (31).

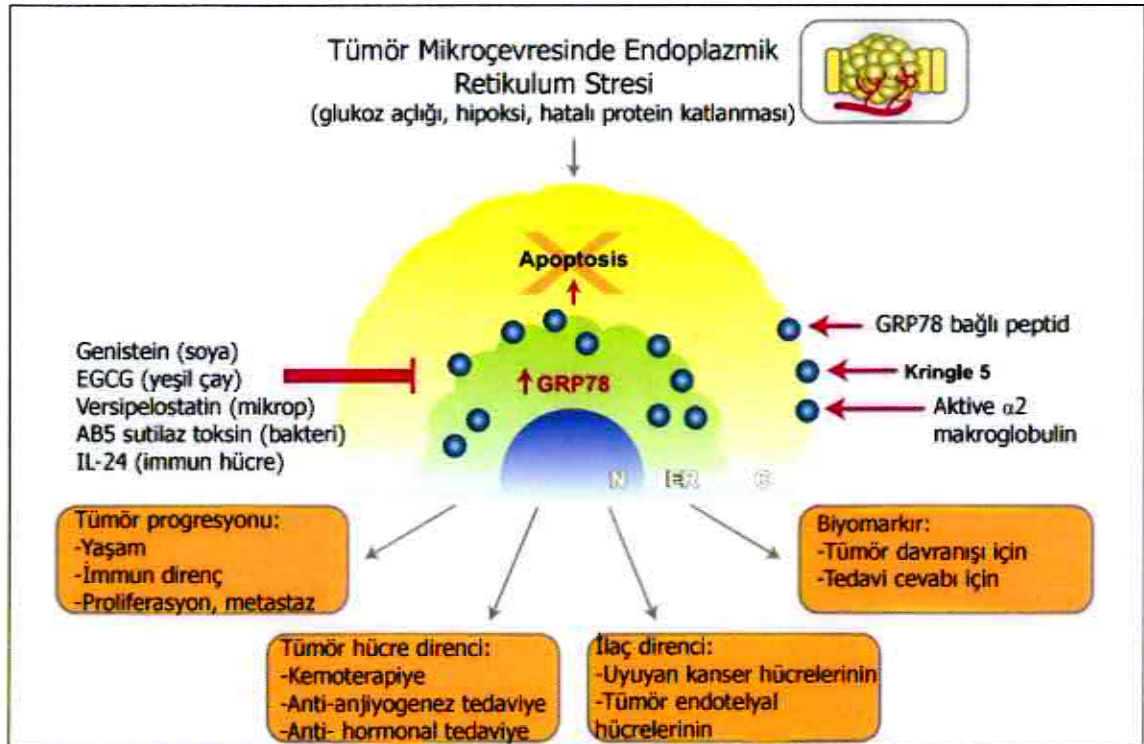
Grp78, ER stresin olmadığı hücrelerde PERK, IRE1 ve ATF6'ya bağlanarak onları inaktif formda tutar. Katlanmamış proteinler biriktiği zaman, Grp78'in onlardan uzaklaşması UPR'yi aktive etmek üzere nükleusa sinyaller göndermek için bu yolları tetikler (67). ATF6 ve ATF4 gibi transkripsiyon faktörleri tarafından Grp78 indüksiyonu ERSE sayesinde olur. 2-DG ile Grp78 ekspresyonu artmaktadır (135).

Isı şok protein 70 (HSP70) ailesinin üyesi olan Grp78'in ATP bağlı durumu katlanmamış proteinler ile ilişkisine izin veren açık konfigürasyonunu sağlar. Komplekste DnaJ kofaktörünün varlığında ATP hızla ADP'ye kataliz olur ve katlanmamış proteinin üzerine HSP70 proteini kilitlenir. Bir sonraki adımda HSP70 ATPaz, nükleotit bağlayıcı yarığın içine ATP'nin geri dönmesini sağlar ve HSP70 proteini tekrar açılıp katlanmamış proteini açığa bırakır. Nükleotit değişimini sağlayan faktörler (NEF) ve DnaJ proteinler, bağlanmayı ve HSP70 proteinlerinin salınımını sağlamak için sürekli HSP70 ATPaz döngüsünü tekrarlar (47).

A549 insan akciğer kanser hücresinde Grp78 artışı DNA TOP2 α down-regülasyonuna yol açmıştır. Bir hipotez olarak UPR sürecinde Grp78'in nükleusa transloke olduğu ve oradaki DNA tamir enzimlerinin aktivitesini doğrudan veya dolaylı etkileşimle azalttığı iddia edilmektedir (33).

Etoposid gibi TOP inhibitörleri dahil olmak üzere birçok sitotoksik ilaç, programlanmış hücre ölümünü başlatabilir. Etoposid gibi DNA hasarlayıcı maddeler p53 aracılı kaspaz hücre ölüm sinyalizasyon kaskadı yolu ile hücre ölümünü tetikleyebilmekte ve sonuçta sit-c serbestleşmesi ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır. Kaspaz-3 sitozolde bulunurken aktif kaspaz-7 mitokondri ve ER zarları ile ilişkilidir. Çin hamster over (CHO), insan lösemi ve mesane kanseri hücre hatlarında, Grp78 overekspresyonunun doğrudan sitotoksik ilaca bağlı apoptoza direnç ile korele olduğu gösterilmiştir. Etoposid ile aktive edilen kaspaz-7'yi Grp78'in aşırı ekspresyonu baskılamaktadır. 'Grp78 gibi ER lümeninde bulunan bir protein sitoplazmadaki kaspaz aktivasyonuna nasıl müdahale edebilir' sorusuna cevap olarak Grp78'in bir ER

transmembran protein subpopülasyonu tahmin edilmektedir. Grp78'in prokaspaz-7 ile fiziksel ve fonksiyonel etkileşimi ATP bağlayıcı domaine bağımlıdır. Grp78'in artmış ekspresyonunun hem CHO hem de insan mesane tümör hattı (T24/83) hücrelerinde etoposide, doksorubisine ve kamptotesine daha fazla direnç sağladığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada Grp78'in artmış ekspresyonu, TOP2 protein düzeylerini ve hücre siklus dağılımını değiştirmemiştir, Grp94 ekspresyonunu etkilememiştir. PARP ve ER transmembran protein sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1, kaspaz-7'nin substratlarıdır. Fare meme tümör hücrelerinde (EMT6) TOP2 düzenleyici ajan olan teniposide karşı direnç yol açan birincil yol NF-kB aktivasyonu olabileceği düşünülmüştür ve glikozidaz I ve II'yi inhibe ederek oligonükleotit modifikasyon reaksiyonlarını bloklayan kastanospermin tarafından Grp78 mRNA indüksiyonu, teniposide karşı sağkalım avantajı sağlamamıştır (105).



Şekil 9. Grp78 fonksiyonları (67)

İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde (293T) Grp78'in sitozolik, nüklear ve ER transmembran fraksiyonları bulunmuştur. Grp78'in kaspaz-7 ve kaspaz-12 ile kompleks oluşturarak ölümü önlediği gösterilmiştir (104).

ER fonksiyonu ve homeostazını bozan fizyolojik stres ile nörotoksosite, miyokart infarktüsü ve damar sertliği gibi patolojik durumlarda, doku ya da organ hasarını önlemek için Grp78 indüklenir. Fare gelişimi sırasında, homozigot Grp78 aleli bozulması erken embriyonik ölümle sonuçlanır (67, 126). Grp78 ekspresyonu beyin, akciğer ve kalp gibi yetişkinlerin major organlarında düşük bazal seviyede tutulmasına rağmen tümörlerde güçlü bir artış vardır. Metastatik kanser hücre hatlarında yüksek olduğundan tümör metastazı için önemli olabileceği düşünülmektedir. Grp78 baskılanması xenograft modellerinde büyüme ve metastazı ve invitro tümör hücre invazyonunu inhibe etmektedir (67).

Grp78 başlıca ER şaperonu olmasının yanı sıra bir ana UPR regülatör proteindir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle Grp78'in erken embriyonik gelişimde, yaşlanma sürecinde ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarda önemli bir rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır. Diğer bir önemli keşif hücre çoğalması ve yaşamını etkileyen insulin/IGF-1 sinyal yolları tarafından Grp78 düzenlenmesidir. Fare kanser modelleri, hücre kültür çalışmaları ile birlikte Grp78'in tümörögenез ve tümör anjiyogenезinde kritik rolünü doğrulamaktadır. Yine bu çalışmalar Grp78'in onkojenik PI3K/Akt sinyalini baskılama yeteneğini göstermektedir. Yüzey Grp78'in keşfi kanser hücrelerinde ve ER stres altındaki hücrelerde yeni bir tedavi stratejisi sunmaktadır (101).

2.8.1 Nörolojik Hastalıklarda Grp78

Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda ER stres ile ortaya çıkan hatalı katlanmış proteinlerin birikimi söz konusudur (125). Nörodejeneratif hastalıklar sıklıkla protein kalite kontrolünde fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir. Fare modelinde Grp78 azalması ile serebellar dejenerasyon artışı arasındaki ilişki gösterilmiştir. ER protein kalite kontrolünün serebellar purkinje hücre yaşamı için kritik olduğu gösterilmiştir (126).

Grp78/BiP eksitotoksosite ve apoptoza karşı nöronları korumaktadır. Grp78 ekspresyonunun iskemik hasara karşı astrositleri koruduğu gösterilmiştir. Grp78 ER'den mitokondri içine net Ca^{2+} akışını azaltmaktadır, serbest radikal üretimini azaltıp stres sonrası mitokondriyal membran potansiyelini ve solunum aktivitesini korumaktadır (91).

2.8.2 Grp78 varyantı (Grp78va)

Nükleus ve mitokondride de bulunduğu bildirilen Grp78'in son zamanlarda alternatif splicing (intron 1 kalıcı) ve alternatif translasyon ile oluşturulan sitoplazmik Grp78 izoformu olduğu belirlenmiştir (136, 87). Biyoinformatik ve biyokimyasal analizler Grp78va ekspresyonunun ER stres tarafından artırıldığını ve özellikle insan lösemi hücrelerinde ve lösemi hastalarında artmış olduğunu ortaya çıkarmıştır. Lumenal bir ER proteini olan Grp78'in aksine, ER sinyalizasyon peptidinden yoksun olan Grp78va sitozoliktir. Grp78 etkilenmeden siRNA tarafından endojen Grp78va'nın spesifik baskılanması sayesinde Grp78va'nın ER stres altında hücre canlılığını sağladığı ve ayrıca PERK sinyalizasyonunu düzenleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (87).

2.8.3 Yüzey Grp78

Son zamanlarda, Grp78 hücre membranı üzerinde karakterize edilmiştir. Tapsigargin uygulanan rabdomiyosarkom hücrelerinin flow sitometrik incelenmesi ısı şok proteininin hücre yüzey ekspresyonunu göstermiştir. Membran ile ilişkili Grp78'in fonksiyonu içinde çeşitli sinyal iletim kaskadlarına katılımını göstermiştir, bu yollar büyümeyi tetikleyici ve antiapoptotiktir (94).

Yüzey Grp78 ekspresyonu ER stresi ile veya ER stresinden bağımsız olabilmektedir. C-terminal KDEL motif delesyonu yüzey Grp78 prezentasyonunu etkilemektedir. Sekrete Grp78'in tekrar hücre yüzeyine bağlanabileceği iddia edilmektedir. Son zamanlarda PC-3 hücrelerinde yüzey Grp78 lokalizasyonu için tümör supresör Par-4'ün gerektiği bildirilmiştir (136).

Hücre yüzey Grp78, prostat, over ve mide kanseri olgularında önemli bir otoantijendir ve doku faktörünün (TF) prokoagülan aktivitesinin inhibisyonu ve endotel hücrelerinde anjiyogenez dahil çeşitli fizyolojik süreçlere katılmaktadır. MHC-1 antijenler ile ilişkili bulunmuştur ve Cocksackie A9 virüs ve Dang virüs serotip 2 için hücre yüzeyinde bir reseptördür. Plazminojen kringle 5 (K5) ve mikrop plazminojen için bir reseptördür ve hücre yüzey voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC) ile ilişkili bulunmuştur. N ve C terminal bölgeleri membranın dışında bulunmaktadır (36).

Vasküler endotelyum gibi birkaç hücre tipinde Grp78'in düşük yüzey ekspresyonu bildirilmiştir. Grp78 hücre yüzeyinde diğer proteinler ile bir kompleks oluşturabilmekte ve sinyal iletiminde önemli bir rol oynayabilmektedir. Son zamanlarda

birkaç Grp78 bağlayıcı protein tanımlanmıştır. Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) ile α 2-MG'nin bağlanmasıyla uyarılan sinyal iletimi için yüzey Grp78 esansiyeldir. Yüzey Grp78 bir reseptör gibi α 2-MG aktivasyonu ile prostat kanserinin metastazında ve hücre hayatta kalımının sağlanmasında gerekli olabilmektedir. Cripto gibi diğer yüzey proteinleri yüzey Grp78'e bağlanır. Bu kompleks Transforming growth factor beta (TGF- β) sinyalizasyonunu inhibe ederek tümör büyümesini artırabilir. Son zamanlarda vasküler endotelial hücrelerin yüzeyinde glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlı T-kaderin ile Grp78 ilişkisi keşfedildi, bu da endotelial hücre hayatta kalımını etkileyebilmektedir. Ayrıca kanser hastalarının serumunda yeni keşfedilen 82 kDa'luk bir tümör spesifik Grp78 varyantının antikor bazlı tedaviler için hedef olabileceği düşünülmektedir (125).

2.8.4 Grp78 ve tümör progresyonu

Birçok malignanside güçlü Grp78 indüksiyonu oluşur. Ayrıca, Grp78'in tümör büyümesi ve survival anahtarı olan bir dizi fizyolojik olayda gerekli olduğu gösterilmiştir. Wang ve ark. kötü diferansiye ve ileri evre akciğer adenokarsinomlarında yüksek Grp78 ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir ve benzer gözlemler özofagus adenokarsinomunda da elde edilmiştir. İnsan fibrosarkom hücre kültüründe hipoksik stres, Grp78 ekspresyon artışına yol açmaktadır. Melanoma hücrelerinde Grp78 ekspresyon artışının apoptoza rezistans sağladığı gösterilmiştir (94).

Tümör büyümesinde Grp78'e bağımlı mekanizmalar üç yönde değerlendirilmektedir. İlki, Grp78 etkinliğinin baskın olmadığı Grp78 gen heterozigotluğu durumunda tümöral hücre çoğalmasının inhibe olması Grp78'in hücre büyümesi için kritik öneme sahip olduğunu desteklemektedir. Bu Grp78'in büyüme faktör sekresyonu ve/veya büyüme faktörü reseptörlerinin olgunlaşmasındaki şaperon işlevleri nedeniyle olabilir. Grp78 son zamanlarda hücre yaşama ve çoğalmasına yol açan Akt sinyalini artırmak için ligandlarla etkileştiği yer olan tümör hücrelerinin yüzeyinde keşfedilmiştir. İkincisi, in vitro hücre kültüründe de gözlemlendiği gibi, heterozigot farelerden alınan tümör hücrelerinde baskın etkinin oluşmadığı CHOP upregülasyonu, tümör hücrelerini apoptozdan korumaktadır. Üçüncüsü, anjiyogenez solid tümörlerin büyüme ve hayatta kalması için gereklidir. Grp78 heterozigositesinin normal organ ve dokularda anjiyogenezi etkilemeyip tümörlerde belirgin olarak azaltması tümör anjiyogenezinin Grp78'e bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bunun

aynı mekanizmalarla olup olmadığını belirlemek için diğer kanser modelleri de kullanılmaktadır (126).

Grp78, kaspaz aktivasyonunu bloklamak ve apoptoz inhibisyonu sağlayıp hücre hayatta kalımını artırmak için doğrudan apoptotik yolun araçları ile etkileşebilmektedir. Tümör progresyonunda tümör hücre ölümünün inhibisyonu kadar proliferasyon da gereklidir, Grp78'in antiapoptotik özellikleri kanser progresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Grp78 kanser hücre hayatta kalımı için önemli olan stres ile uyarılmış otofaji ve ER bütünlüğü için gereklidir. Grp78 düzeylerinin kemoterapiye duyarlılık için diagnostik bir marker olduğu kadar prognostik bir marker olabileceği iddia edilmektedir. Meme kanserinde Grp78 ekspresyon düzeylerinin doksorubisin (adriamicin) bazlı kemoterapiye duyarlılığın yeni bir göstergesi olduğu bildirilmiştir. Prostat kanserinde antiapoptotik ve tümör yaşamını sağlayıcı özellikleri incelenmiştir; Grp78 ekspresyonu hem kastrasyona dirençli prostat kanserinden (LNCaP) türemiş C42B hücre hattında hem de androjenden yoksun LNCaP hücrelerinde artmıştır. Artmış Grp78 düzeyi daha fazla rölatif tümör riski veya rekürrensi ve uzamış tümör yaşamı ile ilişkili bulunmuştur. Grp78 protein ekspresyonu malign prostat kanser dokularında benign prostat dokuya göre önemli derecede yüksektir. Ekspresyon yoğunluğu hasta hayatta kalımı ile ters ve klinik rekürrens ile doğru ilişkilidir. Grp78 ekspresyon düzeylerinin prognostik bilgi sağlayabileceği ve moleküler tedavi için Grp78'in potansiyel bir hedef olabileceği iddia edilmektedir. Grp78'in artmış ekspresyonunun meme, prostat, akciğer kanseri ve glioma dahil çeşitli kanserlerde kanser malignansı, metastaz ve ilaç direnci ile korele olduğu bulunmuştur. İnsan meme kanser modelinde yüksek Grp78 düzeylerinin etoposid ile uyarılan apoptozu baskıladığı, Grp78 baskılandığında hücrelerin apoptoza duyarlı hale geldiği gösterilmiştir, bu durum mesane kanser hücrelerinde de gözlenmiştir. Grp78'in aşırı ekspresyonu glioma hücre modelinde kemoterapotik ajan olan temozolomide yüksek direnç sağlamıştır. Grp78 geninin baskılanması glioma hücrelerini temozolomid, 5-florourasil ve apoptozu uyarıcı CPT-11'e duyarlı hale getirmiştir. ER ile ilişkili BIK ve kaspaz-7 gibi proapoptotik faktörlerin aktivasyonunu bloklama ve stres ile uyarılan otofaji için Grp78 gerekliliği sitoprotektif etkilere dendir ve hücrenin sağkalımını arttırmaktadır (125).

2.9 GLUKOZ REGÜLE PROTEİN 94 (GRP94)

Grp94 1977'de Ira Pastan tarafından glukozsuz medyumda kültüre edilmiş olan tavuk embriyo fibroblastlarında keşfedilmiştir. Grp94 ER'de en fazla miktarda bulunan glikoproteindir, sadece vertebralılarda tanımlanmıştır. Embriyonik gelişim süreci, proteinlerde hatalı katlanma, indirgeyici ajanlar (homosistein, ditiyotritol), glikozilasyon antagonistleri (tunikamisin, 2-DG), solid tümör mikroçevresi (hipoksi, glukoz açlığı), ER kalsiyum azalması, tümör gibi ER stres uyarıcıları Grp94 artışına yol açmaktadır. Grp promoter bölgesinde bulunan ERSE, ER stres ile aktive olan IRE1, ATF6, tirozin kinazlar ile etkileşebilmekte ve sonuçta Grp gen aktivasyonu olmaktadır (68). Grp94'ün protein katlayıcı şaperon, kalsiyum bağlama, apoptoz düzenlenmesi, immünite (MHC sınıf I moleküllere antijenik peptit sunumu), proteolitik yıkım için proteozoma protein sunumu, protein katlanmasının kalite kontrolü ve sitoproteksiyon gibi fonksiyonları vardır (68, 9, 138).

HSP90 ailesinden olan 782 aminoasitten oluşan ve 94 kDa dimerik bir glikoprotein olan Grp94, Endoplazmin, CaBP4 ve gp96 olarak da isimlendirilmektedir. N terminal ATPaz domain, koşaperona bağlanan middle domain ve C-terminal dimerizasyon domaininden meydana gelir. Grp94 tek kopya gendir ve kromozom 12'de (q24.2-q24.3) bulunmaktadır. Vertebralılarda korunmuştur ve tüm hücrelerde eksprese edilir. Grp78 gibi KDEL motifi sayesinde ER'de kalması sağlanmaktadır. Hepatositler tarafından sekrete edilmekte, tümörlerde yüzey proteini olarak da bulunmaktadır. Virüs ile enfekte hücrelerden elde edilen Grp94'ün viral epitoplara taşıdığı rapor edilmiştir. Düşük pH ve viral enfeksiyon durumlarında ekspresyonu uyarılmaktadır (9).

T hücre immünizasyonu için MHC sınıf I antijenlere peptit taşıyıcıdır. Hepatositler tarafından sekrete edilen fraksiyonu, tümör hücre hattında yüzey protein olarak bulunmaktadır ve timositlere spesifik erken gelişim evresinde plazma membranında yer almaktadır. Bu lokalizasyonların önemi henüz bilinmemektedir (9).

Farelerde yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonda Grp94-peptit preparatlarının kullanımı ile oluşan immünizasyon sonucu tümör büyümesinin inhibe edilebileceği iddia edilmektedir. İleride hasta spesifik kanser tedavisinin bir parçası olan immünoterapide şaperon bazlı aşı kullanımı gündeme gelebilecektir (54).

Hipokside, glukoz açlığında ve kanserlerde (oral, akciğer, ösefagus, kolon kanseri) Grp94 aşırı eksprese edilmektedir. Sıçan mide karsinomunda progresyon ve metastazla ilişkili olduğu gösterilmiştir (138, 22).

2.10 MURINE TUMOR CELL DNAJ-Like PROTEIN-1 (MTJ-1)

DnaJ/Hsp40 ailesinin tüm üyeleri Hsp70 proteinleri ile bağlanabilen J domainine sahiptir. Bu korunmuş domain ko-şaperon fonksiyonları için gereklidir (102).

DnaK ve DnaJ E. Coli'de şaperon proteinlerdir, ökaryotlarda DnaK homoloğu bir aile (HSP70 ailesi) ve birkaç DnaJ benzeri protein tarif edilmiştir. Mayada protein yapısının ve oligomerizasyonunun yönlendirilmesinde DnaJ benzeri proteinlerin HSP70 aile üyeleri ile işbirliği yaptığı gösterilmiştir. Genel olarak DnaJ benzeri proteinlerin aminoasit dizisi HSP70 ailesi kadar iyi derecede korunmuş değildir. Ancak, tüm DnaJ benzeri proteinler genellikle N terminalde veya yakınında lokalize J alanı olarak adlandırılan iyi korunmuş 70 aminoasit dizisi içerir. J domaininin, DnaJ benzeri proteinler ve HSP70 homologları arasında fonksiyonel etkileşimin bir alanı olduğu düşünülmektedir (16).

Fare hücrelerinin nüklear ve mikrozomal fraksiyonlarında zenginleştirilmiş olan fare MTJ-1 proteini, varsayılan bir membran DnaJ benzeri protein olarak tespit edilmiştir. Tüm dokularda yaygın olarak eksprese edilir. Fare transmembran protein MTJ-1'in lumenal J domaini (J-MTJ-1) fare BiP/Grp78 ile etkileşime girmektedir. J-MTJ-1 BiP/Grp78'in ATPaz aktivitesini uyarıp polipeptide bağlanarak protein katlanmasına yardımcı olmaktadır. J domaini MTJ-1 ile BiP/Grp78 etkileşimi için yeterlidir (24).

MTJ-1 bir lumenal J domain, bir membran domain ve mikrozomlarda ribozomların protein translasyonu ile yakın temas kuran bir sitozolik domain içermektedir. MTJ-1 DnaK benzeri şaperonların ribozomlarla bir araya gelmesine ve ribozomlar ile DnaK gibi şaperonlar arasındaki transmembran sinyalizasyona aracılık etmektedir. Koşaperonlar da şaperon gibi faaliyet gösterebilmekte ve kısmen katlanmış ya da katlanmamış polipeptitlere bağlanarak onların agregasyonunu engelleyebilmektedirler (84).

DnaJ proteinlerinin bir sınıfı olarak MTJ-1, genellikle protein katlama ve taşıma trafiğine yardımcıdır. Neoplazide MTJ-1'in rolü tam olarak karakterize edilmemiştir. Günümüzde bu DnaJ benzeri proteinin hücre yüzey Grp78 sinyalizasyonunu değiştirme

yeteneği bulunabileceği öngörülmektedir. Kanserde hücre yüzey Grp78'in MTJ-1 gibi diğer proteinlerle ilişkisi hücre çoğalmasını uyarmaktadır (94).

Hücre yüzey Grp78'in ER'de yerleşik MTJ-1 ile kompleks oluşturduğu varsayılmaktadır (84, 94). Primer kutanöz malign melanomda Grp78 ekspresyonunun, MTJ-1 ekspresyonu ile ve çeşitli klinikopatolojik parametrelerle korele olduğu bulunmuştur. Grp78 ekspresyonu tümörün invazyon derinliği ve tümör hücrelerinin hayatta kalımı ile doğru orantılıdır. Orta düzeyde MTJ-1 ekspresyonunun azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu saptanmıştır. MTJ-1'in Grp78 üzerinde tümör saldırganlığının artırılmasında değişiklik yapıcı etkisi olduğu iddia edilmektedir (94).

Uma Kant Misra ve ark. tarafından MTJ-1 ko-şaperonunun, Grp78'in hücre yüzeyine translokasyonu ve membrana iliştirilmesi sırasında da fonksiyon gördüğü iddia edilmiştir. Fare makrofajları kullanılan çalışmada Cell ELISA yöntemi ile yüzey Grp78, immünopresipitasyon ile plazma membranındaki Grp78 ve MTJ-1 araştırılmış ve MTJ-1 mRNA ve protein düzeylerine de bakılmıştır. Çalışma sonucunda murin peritoneal makrofaj hücrelerinde Grp78 ile MTJ-1'in membranda ko-lokalize olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca MTJ-1 gen ekspresyonu engellendiğinde yüzey Grp78 yüzey lokalizasyonunun inhibe olduğu rapor edilmiştir (84).

Yüzey Grp78'in ligandlarından biri de $\alpha 2$ -MG'dir ve aynı çalışmada MTJ-1 ekspresyon inhibisyonunun Grp78- $\alpha 2$ -MG kompleks oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Ancak Grp78 mRNA ekspresyonu etkilenmemektedir. Çalışma ile Grp78'in yüzeye translokasyonunda ve membranda lokalize kalmasında MTJ1'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir (84).

2.11 CCAAT/ENHANCER PROTEIN (C/EBP) HOMOLOG PROTEIN (CHOP)

C/EBP transkripsiyon faktörleri ailesinin üyeleri ile dimerize olan CHOP (GADD153) bir memeli nüklear proteinidir. CHOP normal büyüme koşullarının yokluğu, besin yoksunluğu, akut faz yanıtı ve hücrelerin bazı toksinler ile karşılaşması sırasındaki stres tarafından indüklenmektedir (123).

İnsan CHOP proteini 29 kDa ağırlığında olup 169 aminoasit rezidüsü içerir ve C/EBP ailesinin ilk belirlenen üyesidir. GADD genleri (GADD34, GADD45 ve GADD153) genotoksik stres ve büyümeyi inhibe eden sinyaller ile indüklenen genler grubudur. C/EBP hücre farklılaşması ve çoğalması gibi fizyolojik süreçlerle ilgili çeşitli genleri düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin oluşturduğu bir ailedir. CHOP proteini,

N-terminal transkripsiyon aktivasyon domaini ve C-terminal bZIP olarak bilinen iki fonksiyonel alan ve ayrıca p38 MAPK ailesinin substratları olan iki komşu serin kalıntısı (79 ve 82) içermektedir. bZIP domaini CHOP ile indüklenen apoptoz için önemlidir, yüksek oranda korunmuş olan bu domain C/EBP üyelerinin homodimer ve heterodimerler oluşturmasını sağlamaktadır. Ayrıca CHOP, AP-1 kompleksine bağlanarak AP-1'in transkripsiyon aktivasyonunu artırabilmektedir. Böylece, CHOP'un hem bir C/EBP fonksiyon inhibitörü olarak hem de diğer genlerin bir aktivatörü olarak çift yönlü bir rol oynayabileceği iddia edilmektedir (93).

CHOP, DNA bağlama ve dimerizasyon domainleri yapısal olarak benzer olduğu için bZIP protein ailesinin bir üyesidir. Bu domainler bazik aminoasit dizisinden oluşmaktadır, bunu protein dimerizasyonu için bir yüzey oluşturan ve lösin fermuar denilen yedili lösin tekrarları takip etmektedir. bZIP proteinler en az üç altgruptan oluşur: siklik adenosin monofosfat (c-AMP)-duyarlı CREB/ATF faktörler, AP-1 kompleksine katılan erken cevap Jun ve Fos proteinleri ve C/EBPler. bZIP ailesi içindeki proteinler kolayca homodimer ve heterodimer form oluşturmaktadır ve böylece spesifik DNA kontrol dizileri ile etkileşip transkripsiyonu düzenleyen transkripsiyon faktörü komplekslerinin çeşitliliğini sağlamaktadır. CHOP'un C/EBP ile kararlı heterodimerler oluşturarak gen transkripsiyonunun baskın bir inhibitörü olarak fonksiyon görmesine ve C/EBP'nin DNA'ya bağlanmasını engellemesine rağmen, sonraki çalışmalar CHOP-C/EBP heterodimerlerinin yeni DNA hedef dizilerini tanıma ve böylece gen transkripsiyonunu aktive etme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (122).

CHOP, bu ailenin diğer üyeleri ile dimerize olarak onların DNA'ya bağlanma ve transaktivasyon özelliklerini değiştirmektedir. DNA hasarı veya ER stres sonucu büyümeyi durdurup apoptozu uyardığı için diğer bir adı da 'growth arrest ve DNA damage inducible gene'dir (GADD153). CHOP, bazı tümör dokularında ve hepatoma, nöroblastoma, miyeloid, kolon gibi kanser hücre hatlarında eksprese edilmektedir. Ekspresyon düzeyi insan kolorektal kanser invazifliği ile koreledir. Ayrıca proliferasyon olan çoğu hücrede ekspresyonu düşük seviyede iken oksidatif stres, DNA hasarı ve ER strese maruz kalan farklı dokularda ekspresyonu dikkat çekecek şekilde upregüledir (48).

Transkripsiyon faktörü CHOP başlangıçta genotoksik stres tarafından indüklenebilmesi temeline dayalı olarak izole edilmiştir. Sonradan besin yoksunluğu, hipoksi ve ER'de hatalı protein katlanması gibi hücresel stresi kışkırtan çeşitli çevresel sinyallerin CHOP gen ekspresyonunu tetiklediği gösterilmiştir. CHOP ekspresyonunun hücre bölünme döngüsünün kontrolünde rol oynadığı ve aşırı ekspresyonunun büyüme arresti ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Ayrıca adiposit farklılaşması inhibisyonuna ve programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır. Farelerden elde edilen embriyonik fibroblastlarda CHOP geninin bozulması ile kısmen apoptoz uyarılarına direnç olduğu gösterilmiştir (122).

CHOP belirli genlerin transkripsiyonunu etkinleştirmek için doğrudan AP-1 ailesi transkripsiyon faktörleri c-Jun ve c-Fos ile etkileşmektedir. Böylece C/EBP ailesinin bir üyesi olan CHOP ile bZIP protein ailesinden olan AP-1 etkileşmektedir. Fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (NIH/3T3) stres indüksiyonu CHOP-DNA bağlanmasında artışa neden olmaktadır. CHOP, C/EBP proteinlerin bazı hedef genleri aktive edici yeteneğini inhibe etmekte bazen de doğrudan aktivatör olarak görev yapmaktadır (123).

ER stres sırasında, CHOP esas olarak PERK ve ATF4'ün aktivasyonu yoluyla uyarılmaktadır. CHOP'un N terminal kısmı CHOP fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemlidir. N terminal domain sadece protein degradasyonu için değil aynı zamanda transaktivasyonu ve histon asetilaz olan p300 ile etkileşimi için gereklidir. CHOP bazik bölgesi diğer C/EBP ailesi proteinlerine göre daha az korunmuş olduğundan, DNA bağlanma aktivitesinden yoksundur. Homodimer oluşturamayan CHOP diğer C/EBP proteinlerinin de bu yeteneğini inhibe etmektedir. Öte yandan, benzersiz bir DNA sekansına bağlanan CHOP-C/EBP heterodimeri bildirilmiştir (88).

Son zamanlarda yapılan bir fare modeli çalışmasında serbest kolesterolün ER stresi uyardığı ve CHOP'un aterosklerotik plak rüptüründe rol aldığı gösterilmiştir. Serbest kolesterol peritoneal makrofajlarda ER stres-CHOP-BAX aracılı apoptozu uyarmıştır. Bcl-2 aile üyesi bir proapoptotik olan BAX'ın, sitozolden mitokondriye translokasyonu ve aktivasyonu CHOP aracılı apoptoz için önemlidir (120).

2.12 X-BOX BINDING PROTEIN-1 (XBP-1)

XBP-1, ilk olarak DQwl ilişkili antijen (HLA-DRA) promoterindeki bir x-box dizisine bağlanması ile tespit edilmiştir. XBP-1 tüm hücrelerde eksprese edilen

CREB/ATF transkripsiyon faktör ailesine ait lösin fermuar proteindir. Farelerde XBP-1 geninin bozulması dramatik olarak şiddetli anemi ve erken embriyonik ölümle sonuçlanan hepatosit gelişim bozukluğu yapmaktadır. Fare  alı malarında B hücre gelişiminde XBP-1'in rolü olduğu gösterilmiştir. B hücrelerinde plazma hücre farklılaşmasını uyarmak için k rpılmı  XBP-1s salgı yolundaki protein üretimini artırma ve ER zarlarını ve diğer organelleri genişletme yeteneğine sahiptir ancak tek başına yeterli değildir (79).

XBP-1, B hücreleri plazma hücrelerine farklıla mak için aktive olduğunda uyarılmaktadır. IgM salgılama kapasitesi ortadan kaldırılmış olan B hücrelerinde, XBP-1'in normal olarak farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir, B hücrelerinde XBP-1'in bu aktivasyonunun farklılaşmaya bağımlı bir olay olduğu, salgılanan IgM'in bol sentezinden kaynaklanan UPR sonucu olmadığı iddia edilmiştir. XBP-1 olmadan, B hücreleri B-hücre reseptör aracılı sinyal etkinliğinde başarısız olmuştur (50).

Plazma hücre diferansiyasyonu B lenfosit induced maturation protein-1 (Blimp-1) ve XBP-1 tarafından düzenlenmektedir ve bu süreçte UPR kritik bir rol oynamaktadır. B hücreleri farmakolojik uyarılarla UPR'nin her üç yolunu da aktive ederken diferansiyasyonda PERK yolu çalışmamaktadır. Lipopolisakkaritle (LPS) uyarılan kültür hücrelerinde diferansiyasyona cevapta önce XBP-1 k rpılmasına yol açan IRE1 aktive edilmiş, ancak kısmen gerçekleşen PERK fosforilasyonu, eIF2 'yı veya CHOP ve GADD34'  aktive etmede yetersiz kalmış ve sonradan ATF6 aktivasyonu olduğu belirlenmiştir (79).

Sıçan pankreas ada hücrelerinde yapılan çalışmada XBP1 aşırı ekspresyonunun glukoz ile uyarılan insülin sekresyonunu bozdu u ve   hücre apoptozunu artırdığı gösterilmiştir, ancak siklopiazonik asit ile ER stres oluşturulan sıçan fibroblast hattı 208F'de apoptozu uyarmadı ı belirlenmiştir. IRE1 tarafından oluşturulan XBP-1s, katlanma sağlayan  aperonların ve hatalı katlanan proteinleri yıkıma u ratan ERAD bileşenlerinin üretimini artırır. İntrensek mitokondriyal apoptoz yolunun uyarılması ile proapoptotik BAX proteini mitokondriye geçer ve BAK ile oligomerize olup mitokondri dış membranında geçirgen bir kanal oluşumunu sa lar ve mitokondriden sitozole sit-c'nin salınmasına ve kaspaz kaskadının aktivasyonuna yol açar. XBP-1s'in karaciğer ve plazma hücrelerinin gelişimi için gerekli olduğu, adacık hücrelerinin normal gelişimi için gerekmediği ve en son olarak nöronlarda elzem olmadığı iddia edilmektedir (6).

Memelilerde UPR sinyali yoluyla, ER membranında lokalize olan IRE1'in dimerizasyonu sağlanarak protein kinaz ve endoribonukleaz faaliyetleri etkinleştirilmektedir (11). Aktive IRE1 tarafından, XBP-1 mRNA'sı iki bölgeden kırılarak 26-bazlık intron bölgesi çıkarıldıktan sonra RNA ligaz aktivitesi tarafından parçalar birleştirilir (11, 76). Bu splice reaksiyonu fonksiyonel bir XBP-1 transkripsiyon faktörü üretimini sağlayarak ER şaperonlarının ve katlanmaya yardımcı olan enzimlerin (PDI gibi) artışına neden olmaktadır (76). Ancak, hücresel konum ve XBP1 mRNA kırılması için gerekli fizyolojik süreçler tam olarak anlaşılamamıştır. UPR sinyali yokluğunda kimyasal uyarı ile sağlanan IRE1 dimerizasyonunun aktive XBP-1 mRNA kırılması için yeterli olduğu ve XBP-1 mRNA kırılmasının sitoplazmada gerçekleştiği gösterilmiştir (11).

2.13 MULTI DRUG RESISTANT GENE-1 (MDR-1)

Kromozom 7q21.1'de lokalize olan MDR-1 geni tarafından kodlanan P-glikoprotein (P-gp) ilk olarak dirençli CHO hücrelerinde Juliano ve Ling tarafından izole edilmiştir (118). P-gp 170 kDa ağırlığında olup 1280 aminoasit içermektedir (118, 75).

ATP binding cassette (ABC) taşıyıcılar ailesi, transmembran domainler (TMD) ve nükleotit binding domainler (NBD) içermektedir ve üç üyeden oluşmaktadır: P-gp (ABCB1), MRP-1 (ABCC1) ve ABCG2 (MXR). İyon, şeker, aminoasit, lipid, toksin ve antikanser ilaç taşımaktadırlar (128). MDR-1 organik katyonların spesifik taşıyıcısıdır (15).

P-gp her birinde 6 hidrofobik transmembran heliks bulunan 2 tane TMD ve yüksek oranda korunmuş 1 tane NBD içermektedir. Akciğer, plasenta, testis, adrenal bez, karaciğer, pankreas, kolon, jejunum, beyin, lenfosit gibi bariyer ve sekretuar fonksiyonu olan normal hücrelerde eksprese edilir (118). Renal tübüller, kan-beyin bariyeri, hepatik safra kanallarında ve kolon villuslarındaki bazı epitelyal hücrelerin apikal membranında normal olarak bulunmaktadır ancak bu hücrelerdeki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (17, 75). P-gp, antrasiklinler, epipodofillotoksinler ve vinka alkaloidleri gibi antikanser ilaçlar; antibiyotikler; antiretroviral ilaçlar; analjezik ve antiinflamatuvar ilaçlar; immunosupresif ilaçlar; antiaritmik ve kardiyoaktif ilaçlar (digoksin, verapamil) dahil endojen metabolitleri ve ksenobiyotikleri substrat olarak tanımaktadır (106). P-gp, vinblastin, vinkristin, doksorubisin, daunorubisin, etoposid,

teniposid, paklitaksel, taksanlar gibi antitümör ilaçlara direnç oluşumunu sağlamaktadır (121, 15). P-gp ile oluşan direnç, verapamil, pimoziid, siklosporin A, kinolon, eritromisin, rezerpin, tamoksifen gibi inhibitörlerle geri çevrilebilmektedir (118). PKC inhibisyonu, P-gp artışını önlemekte ve NF-kB ile de MDR-1 regülasyonu yapılabilmektedir (128).

Bir transmembran proteini olan P-gp, ilaçların enerjiye bağımlı olarak hücreden dışarıya pompalanmasını sağlar. Artmış P-gp düzeyi kolon, böbrek ve adrenal kanserlerde ilaç direnci oluşturmaktadır. MDR-1 promoter aktivitesi antikanser ilaçlar, DNA hasarlayıcı ajanlar, ısı şoku, serum açlığı ve UV radyasyon ile uyarılmaktadır (121).

Multifonksiyonel bir protein olan P-gp sadece hidrofobik bileşikler dışarı atan bir pompa olarak etki etmeyip aynı zamanda membran kompozisyonunu düzenlemekte ve hücre şişmesi ile uyarılan Cl⁻ kanal aktivasyonunu artırarak iyon transportunu değiştirmektedir (17).

P-gp, fazlaca bulunduğu dokularda (bağırsak, karaciğer ve böbrek gibi) tedavi etkinliğini değiştiren ilaç emilimini ve atılımını güçlü bir şekilde etkileyebilmektedir. Tümör hücrelerindeki aşırı P-gp ekspresyonu çoklu ilaç direncinin mekanizmasıdır. P-gp substratlarının çoğu P-gp indükleyicisi olarak etki ederek kendi dışarı atılımlarını artırmakta ve hücre içi birikimlerini sınırlandırmaktadırlar. Örneğin rifampin, digoksin, ouabain, palitoksin. Digoksin ve ouabainin MDR-1 gen ekspresyonunu artırıcı etkilerinin kalsiyum artışına bağlı olduğu iddia edilmektedir fakat mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir (106). Ouabain çeşitli antikanser ajanların sitotoksitesini inhibe etmektedir fakat bu hızlı etkinin P-gp aktivitesi ile ilişkili olmadığı iddia edilmiştir. Ouabain tarafından uyarılan MDR-1 gen transkripsiyonu sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu artıran tapsigargin ile artmış, kalsiyum şelatörü BAPTA ile baskılanmıştır. Sonuç olarak MDR-1 gen transkripsiyonun uyarılmasında Na⁺/K⁺-ATPaz inhibisyonu ile sitozolik kalsiyum konsantrasyonu artışı rol oynamaktadır (17).

2.14 MULTI DRUG RESISTANT ASSOCIATED PROTEIN-1 (MRP-1)

ABC taşıyıcılarının diğer major grubu MRP ailesidir. 190 kDa ağırlığında ve 1531 aminoasit içeren membran proteini MRP, 1992'de Cole ve ark. tarafından bulunmuştur. 16p13.1 kromozom bölgesinde kodlanan MRP-1 plazma, ER ve golgi membranında lokalizedir (75, 15, 118). Akciğer, testis, böbrek, düz kas, epitelyal ve

hematopoetik hücreler ve kan-beyin bariyeri endotelinde eksprese edilmektedir ve hücrel lokalizasyonu bazolateral membrandır (118, 75, 15). MRP-1 proteini ile P-gp %15 homoloji göstermektedir. Epitelyal dokularda ekspresyonu fazla olup malignansilerde proliferasyon ile ekspresyonu değişmektedir. MDR ve MRP proteinleri normalde karaciğerde eksprese edilmekte ve hepatosit kanaliküler membranında kolefilik organik iyonların (safra asitleri gibi) biliyer ekskresyonunu düzenlemektedirler (15). Jedlitsky ve ark. MRP'nin, glutatyon, glukuronid ve sülfatlı konjuge bileşikleri taşıyabileceğini göstermişlerdir (75).

MRP daha fazla kistik fibroz transmembran regülatör gen ürünü CFTR ile ilişkilidir. MRP ailesinin orijinal üyesi MRP-1 olup homologları MRP 2-9'dur. MRP-1 ile diğer MRP'lerin (MRP 2-6) sekansları ancak % 34 ve 58 ortaktır. Genel membran topolojisinin MRP ailesinin bütün üyelerinde benzer olduğu düşünülmektedir (75). MRP, 17 transmembran heliks içeren 3 TMD'ye sahiptir. N terminalde 5 transmembran heliks içeren ilave bir TMD bulunmaktadır (128). Bu ek domain MRP ailesinin organik anyon afinitesinde belirgin bir role sahiptir. MRP homologlarının hiçbirinin ilaç direnci ile ilişkisi MRP-1 gibi açık olarak bilinmemektedir. MRP, 12 potansiyel glikozilasyon bölgesi içerir ancak bunların işlevi için önemli olmadığı düşünülmektedir. Öte yandan, MRP fosforilasyonunun transport fonksiyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir. Tüm ABC taşıyıcılarının gerçek transport mekanizması, tam olarak anlaşılamamıştır, substrat özgüllüğünü tanımlamak zor olmuştur. P-gp hidrofobik büyük katyonlara daha fazla afinite gösterirken, MRP organik anyon taşınmasında daha etkili görünmektedir. Doksorubisin, vinkristin ve etoposid (VP-16) MRP için iyi substratlardır ve bu bileşiklere maruz bırakılan hücre hatlarında aşırı MRP ekspresyonu ve P-gp aracılı olmayan ilaç direnç gelişimi ortaya çıkarılmıştır. Metotreksat da MRP-1 transport substratları listesine eklenmiştir (75).

MRP-1, antrasiklin, vinka alkaloid, epipodofillotoksinler, kamptotesinler ve metotreksata direnç oluşturmaktadır (118). Okside glutatyon, lökotrien C4 (LT-C4) gibi fizyolojik substratları, antrasiklinleri, mitoksantron, glutatyon konjuge ilaçlar, sülfat veya glukuronat konjuge ilaçları transport etmektedir. p-53 tarafından down-regüle edildiği ve AP-1 kompleks ile düzenlendiği de rapor edilmiştir (128).

2.15 PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE-4 (Par-4)

İnsan Par-4 geni kromozom 12q21.2'de lokalizedir (137, 114). Gen ürünü olan Par-4 proteini 40 kDa ağırlığında olup 342 aminoasit içermekte ve tüm dokularda eksprese edilmektedir (114). N-terminal bölgede iki 2 nüklear lokalizasyon sekansı (NLS), C-terminal bölgede bir lösin zipper domaini (LZ) ve C-terminalde bir nüklear eksport sekansı (NES) ve merkezi konumlu kanser selektif apoptoz (SAC) domaini içermektedir (41).

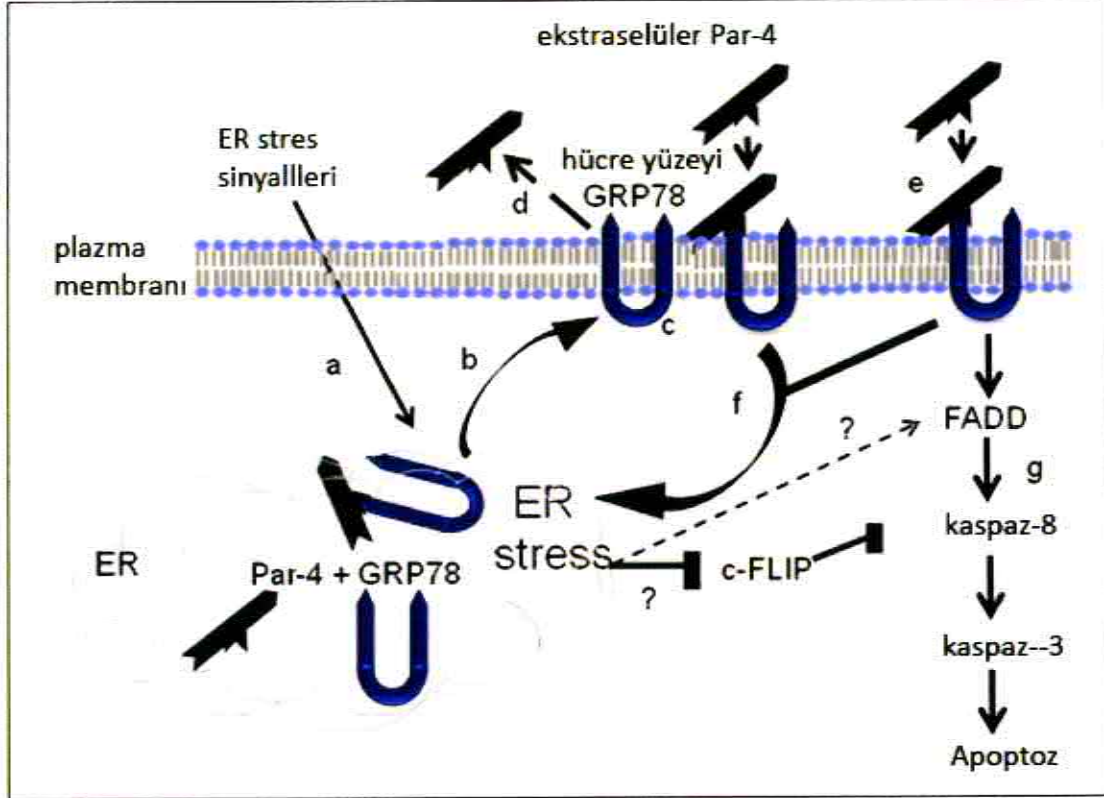
PKA ve PKC ile fosforilasyon için bölgeleri bulunmaktadır. Bu domainler Par-4 proteininin regülasyon, lokalizasyon, dimerizasyon ve posttranslasyonel modifikasyonunda önemlidir (114). Bu domainler %100 korunmuştur. Akt ve PKA gibi kinazlar için korunmuş fosforilasyon bölgelerine sahiptir. Nöron, lenfosit, meme bezi epitelyum hücreleri, retinal hücreler, prostat duktal hücreleri ve düz kas hücrelerinin terminal diferansiyasyonunda ekspresyonu düşük olarak bulunmuştur (137).

Tümör supresör gen olarak proapoptotik fonksiyonları vardır. Renal hücreli kanser, nöroblastom, ALL, KLL, endometriyal kanser gibi çeşitli kanserlerde Par-4 downregülasyonu görülmektedir. Par-4 knockout farelerde endometriyum, karaciğer, akciğer gibi çeşitli dokularda spontan tümörler gelişmektedir. TRAIL, vinkristin, doksurubisin ve radyasyon gibi çeşitli eksojen sinyaller ile başlatılan hücre ölüm programlarının esansiyel bir downstream regülatörü olduğu ve hücre ölümüne katkısı olduğu bulunmuştur. Nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer, Parkinson) endojen Par-4'ün upregüle olduğu gösterilmiştir (137).

İntraselüler Grp78 genel olarak anti-apoptotik fonksiyonlar göstermektedir. Hücre içi Par-4 hücre yüzey Grp78 ekspresyonunu düzenler, hücre lizatlarında Par-4 knockoutu, toplam Grp78 seviyelerini değiştirmezken, hücre yüzeyinde Grp78 ekspresyonunu ciddi miktarda azaltmaktadır, bu endojen Par-4'ün hücre yüzey Grp78 ekspresyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (18).

Par-4 sitoplazmada ve nükleusda hücre içi fonksiyonları ile bir proapoptotik proteindir. Par-4 proteini normal hücreler ve kanser hücreleri tarafından ve spontan tümörlere dayanıklı olan transgenik fareler tarafından kendiliğinden salgılanmaktadır. ER stres uyarıcı ajanlara kısa süre maruz kalma hücrel Par-4 salgısını apoptoz ve kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak daha fazla arttırmaktadır (18). Ekstraselüler Par-4, kanser hücrelerinin yüzeyinde eksprese olan Grp78'e bağlanarak ER stres ve Fas

associated protein with death domain (FADD)/kaspaz-8/kaspaz-3 yolunun aktivasyonu ile apoptozu uyarmaktadır (18, 41). PC-3 hücrelerinde ER stres uyarıcı TRAIL tarafından uyarılan apoptoz, hücre yüzey Grp78 üzerinden ekstraselüler Par-4 sinyalizasyonuna bağlıdır. Böylece, Par-4 apoptoz indüksiyonu için hücre yüzey Grp78 reseptörünü içeren ekstrinsik bir yolu aktive etmektedir (18).



Şekil 10. Par-4'ün apoptotik etkisi (18)

Par-4'ün apoptotik etkisi, hücrel apoptotik makineyi etkinleştirme ve hücrel hayatta kalma mekanizmalarını engellemeyi içermektedir. Par-4 hormon duyarsız kanser hücrelerinde FADD için adaptör protein olan Fas ve Fas ligandın (Fas/FasL) plazma membranına translokasyonunu sağlayarak apoptozu uyarmaktadır, DISC oluşumuna neden olarak kaspaz kaskadını başlatmaktadır. Paralel olarak, Par-4 nükleusa geçerek NF- κ B aracılı hücre sağkalım mekanizmalarını engellemektedir. NF- κ B, Bcl2 ailesi (örneğin; Bcl-xL, A1/Bfl1 gibi) ve anti-apoptotik genlerden X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP) gibi hücre koruyucu genleri düzenler (114). Kanser hücrelerinde PKA tarafından Par-4 SAC domainindeki treonin 155 (T155) kalıntısı fosforillenir (40). Par-4'ün nüklear translokasyonu ve apoptotik etkisi, ayrıca membrana doğru Fas/FasL trafiği ve NF- κ B inhibisyonu için Par-4 T155 rezidüsünde PKA aracılı

fosforilasyon gereklidir (114). Kanser hücresinde siRNA ile PKA aktivite inhibisyonu Par-4 fosforilasyonunu önleyerek apoptoza neden olmaktadır (40).

Endojen Par-4 büyük ölçüde inaktive olmasına ve kendiliğinden apoptozu tetiklememesine rağmen çeşitli sitotoksik ajanların apoptotik fonksiyonu için önemlidir. Artmış Par-4 ekspresyonu çoğu kanser hücrelerinde apoptotik ölüme neden olurken normal veya immortal hücrelerde apoptoza neden olmamaktadır. Par-4'ün apoptotik etkisi için lösin fermuar domaini gerekmez. Par-4 efektör etki alanı olan SAC domaini, Par-4 gibi nüklear giriş, kaspaz aktivasyonu, NF-kB aktivite inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu yeteneğine sahiptir. SAC domaini sıçan, fare ve insan Par-4'ünde %100 korunmuştur. Endometrial kanserde Par-4 baskılanmış veya mutant konumundadır, renal hücreli karsinomda downregüledir, prostat kanserinde Akt1 tarafından inaktivasyonu nedeniyle işlevsizdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Par-4'ün TOP1 katalitik aktivitesinin bir intraselüler baskılayıcısı olarak görev yaptığı ve SAC domainine bağlı bir mekanizma tarafından hücresel siklusu baskılamak için DNA topolojisini düzenlediği iddia edilmektedir (18).

2.16 HEKSOKİNAZ II (HKII)

HKII geni kromozom 2p13'de lokalizedir (99). HKII 100 kDa ağırlığındadır ve C-terminal katalitik domain ile N-terminal regülatör domain içermektedir. Mitokondriye sadece HKI ve HKII bağlanmakta ve VDAC ile tetramer oluşturarak hücreyi apoptozdan korumaktadır. 15 aminoasitden oluşan N-terminali VDAC'ye bağlanma için gerekli ve yeterlidir (99). İnsan hücrelerinde heksokinazın, doku ekspresyonu, subselüler lokalizasyonu ve katalitik/düzenleyici özellikleri farklı olan dört izoformu (I-IV) bulunmaktadır (23 27). HKIV yetişkin hepatositlerde, HKI baskın olarak beyinde eksprese edilmektedir (27). HKII kas, yağ ve akciğer dokusunda düşük miktarlarda eksprese edilirken diğer dokularda eksprese edilmemektedir (27 23).

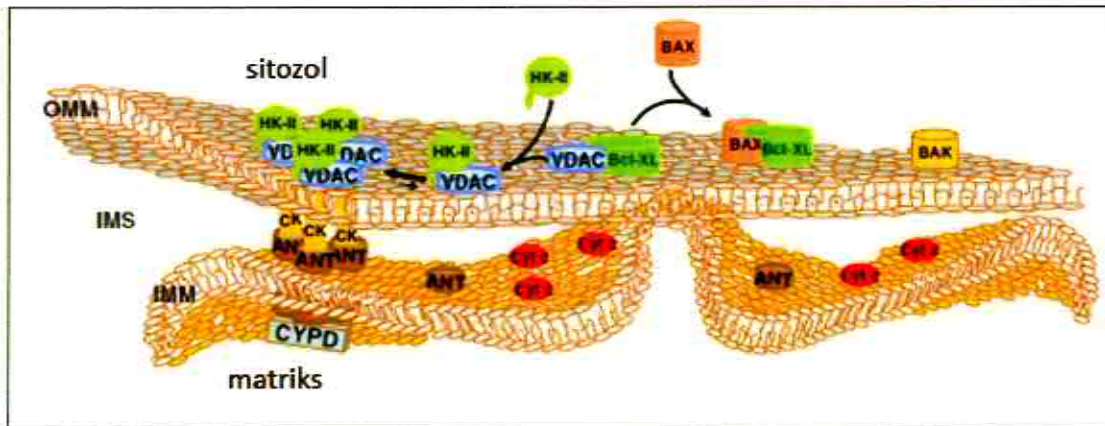
Heksokinaz, glikoliz yolunda ilk hız sınırlayıcı basamak olan glukozun glukoz-6-fosfata dönüşüm basamağını katalizler (23). Bu reaksiyon sadece hücre içine glukoz girişi için bir konsantrasyon farkı yaratmayıp aynı zamanda hücre içi glukoz metabolizmasını belirlemektedir (27).

Tüm HK'ların yapısal ve işlevsel benzerliği olmasına rağmen farklı kinetikleri vardır. HKI-III 100 kDa ağırlığındadır ve düşük Km sabitleri (0.02-0.03 mM) sayesinde çok düşük glukoz konsantrasyonunda bile glukoz için afiniteleri yüksektir. Aksine

glukokinaz olarak bilinen HKIV, 50 kDa ağırlığında bir proteindir ve tek bir katalitik bölge içermektedir. HKII ise iki katalitik bölge içermektedir. HKIV tek bir katalitik bölge içerdiğinden dolayı, glukoz için HKI-III'den birkaç yüz kat yüksek K_m 'e (5-8 mM) sahiptir (27).

Hepatokarsinomda HK gen izoformlarının baskılanma/aktivasyon alternatifine yol açan epigenetik olaylar tanımlanmıştır: Normal karaciğerde ekspresyonu görülmeyen HKII'nin malign hepatomada yüksek düzeyde eksprese edilmesi tümörögenizde HKII gen promoterinde metilasyon farklılığı analiz edilerek açıklanmıştır. Hepatosit HK geninde CpG adalarında metilasyon fazla iken hepatomada yoktur (81). Hepatositlerde HKII ekspresyonu yoktur veya çok azdır (99).

Dış membrana enzimin hedeflenmesi için gerekli olan amfipatik N-terminal helikal domainleri sayesinde HKI ve II mitokondriye bağlanarak dış membran porin proteini olan VDAC ile etkileşirler. HKII'nin VDAC ile bağlanması BAX ile uyarılan sit-c salınımını ve apoptozu önlerken HKII'nin ayrılması hücreyi apoptoza duyarlı hale getirmektedir. Bcl-2 ailesi BH1-4 olarak adlandırılan homoloji bölgeleri içermektedir. Ailenin antiapoptotik üyelerinde BH4 domain bulunurken proapoptotik üyelerden BID ve BIK sadece BH3 içermektedir. Karboksi terminalinde BH4 domainine benzer bölge taşıyan HKII, VDAC'ye bağlanmak için BAX ile yarışmaktadır (97). Mitokondriye BAX bağlanmasını önleme mekanizması tam bilinmemektedir, sterik engel oluşturabileceği veya VDAC'de konformasyonel değişimi uyurabileceği düşünülmektedir (99).



Şekil 11. HKII ile VDAC etkileşimi (98)

HKII ekspresyonu ve mitokondriye bağlı heksokinaz yüzdesi bazı kanser hücrelerinde anlamlı düzeyde artmıştır. HIF-1 ve mutant p53 HKII ekspresyonunu

uyarmaktadır. Glikoliz ve pentoz fosfat yolu için glukoz-6-fosfat ortak bir metabolik ara üründür, HK'nin inhibisyonu her iki yolu ve down-stream mitokondriyal metabolizmayı etkiler. Ek olarak mitokondri ile ilişkili HKII'nin enzimatik aktivitesi, apoptoz düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Böylece, HKII hedefli ajanların bu molekülün anti-apoptotik özelliğini ortadan kaldırması mümkün olabilecektir. HKII'nin, her iki kanser enerji metabolizması (glikoliz ve pentoz fosfat yolu) ve apoptozdaki önemli rolü nedeniyle bu molekül çekici bir hedef olarak kabul edilmektedir. Bilinen heksokinaz inhibitörleri; 2-deoksiglukoz, 3-bromopiruvat, 5-tiyoglukoz ve mannoheptülozdur (23).

Aktive Akt, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi sit-c salınımını önler. Mitokondriyal HK glukoz ile aktive edilirken glukoz-6-fosfat ile inhibe edilmektedir (37). Mg^{2+} gibi divalent katyonlar mitokondriye HKII bağlanmasını artırmaktadır. Bağlanma protein kinazlar ile düzenlenmektedir. Serin/treonin kinaz olan Akt (PKB) tarafından HKII treonin 473 fosforillenmesi mitokondriye bağlanmayı artırmaktadır. GSK-3B tarafından VDAC1 treonin 51 fosforillenmesi HKII ayrılmasına, paklitaksel ve doksorubisin gibi kemoterapötik ajanlara kanser hücrelerinin duyarlılaşmasına yol açmaktadır. Mitokondriye kolesterol alımının artışı bağlanmayı artırmaktadır (98).

Karaciğer ve pankreas hücre karsinogeneğinde erken bir metabolik olay gösterilmiştir: Bu hücrelerde yüksek afiniteli HKII'nin ve daha az oranda HKIV'ün baskılandığı ve HKI ekspresyon artışının olduğu belirlenmiştir. Mitokondriye spesifik VDAC ile HKI ve II doğrudan etkileşmektedir. VDAC ve adenin nükleotit taşıyıcılar (ANT) mitokondriyal matriks ve sitozolik bölmeler arasında adenin nükleotitlerin taşınımını sağlamaktadır. HKII ile VDAC etkileşimi iki farklı etki oluşturmaktadır; ilk olarak, VDAC'nin zarlar arası boşluktan sitozole ATP taşınımındaki rolünü inhibe edebilmektedir ve ikinci olarak, VDAC ile BAX/BAK etkileşimini bozarak apoptozu inhibe edebilmektedir. Böylece, hepatomalarda ve diğer kanserlerde HKII'nin yüksek seviyeleri mitokondriyal zarlar arasında ATP birikimi yaparak apoptotik direncin artmasına katkıda bulunabilmektedir (27).

HKII dış mitokondriyal membran proteini VDAC ile bağlandığında iç mitokondriyal membran proteini olan ATP sentaz ATP üretir, adenin nükleotit translokator ATP'yi VDAC-HKII kompleksine aktarır. Bu dört protein arasında işbirliği hızlıdır ve sonuç olarak glukoz-6-fosfat üretimi artar. Glukoz-6-fosfat sadece glikoliz

öncüsü değildir, aynı zamanda pentozfosfat ve mitokondriyal trikarboksilik asit döngüsü üzerinden kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalması için gereken anahtar metabolitlerin biyosentezinde görev almaktadır (81).

HKII'nin nöroprotektif etkisi olduğu ve metabolizmanın düzenlenmesi, apoptoz, transkripsiyon, sitosiskeleto dinamikleri gibi hücresel proseslerde yer alan glikojen sentaz kinaz-3'ü (GSK-3) inhibe ederek nöronal yaşamı sağladığı gösterilmiştir (35).

2.17 HEMOKSİJENAZ-1 (HO-1)

HO-1, HO-2 ve HO-3 olarak üç hemoksijenaz izoformu bulunmaktadır. HO-1 tüm dokularda yaygındır (78). İlk olarak, düz ER'nin 32-kDa ağırlığında bir integral membran proteini olarak tanımlanmıştır Hem grubu, hipoksi, oksidatif stres, ağır metaller, UV radyasyon, inflamasyon gibi çeşitli uyaranlara cevap olarak HO-1 sentezi artmaktadır (73). Demir ve protoporfirin IX'dan meydana gelen Hem'i katabolize eden HO-1 stres-responsif bir enzimdir. Homeostaz sırasında hemoproteinlerde prostetik grup olarak bulunan Hem, patolojik durumlarda nonkovalen bağlı olduğu bu proteinlerden ayrılır ve pro-oksidan serbest Hem açığa çıkar. Fenton reaksiyonu ile serbest Hem, serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir. HO-1'in T hücre fonksiyonunu düzenleyerek immünoregülatör etki gösterdiği iddia edilmektedir (116).

Hem'e maruz kalan kültüre endotel hücrelerinde HO sentezi uyarılmakta ve endotel hücrelerinin TNF aracılı apoptoza gidişi önlenmektedir. Hepatositlerde ve fibroblastlarda hemin ile HO sentezi uyarılmaktadır. Porfirin halkasını açarak Hem demirini serbestleştiren HO, dokularda oksidan stresle uyarılmaktadır. HO etkileri, oksidatif strese karşı adaptif hücre koruyucu cevapla ilişkilidir (14).

HO-1 Hem'in biliverdine, demire ve karbonmonoksite yıkımını kataliz eden sitoprotektif bir proteindir. Damar düz kas hücrelerinde yapılan çalışmada çeşitli ajanlar ile uyarılan ER stresinin HO-1 mRNA ve protein düzeyini artırdığı ve HO-1 promotor aktivitesini antioksidan responsif element (ARE) yolu ile uyardığı gösterilmiştir. Oksidatif, nitrozatif, ozmotik ve hemodinamik stres gibi biyokimyasal ve biyomekanik uyarılar ile HO-1 sentezinin artışı doku hasarına karşı önemli bir hücresel savunma mekanizması sağlamaktadır. Prooksidan olan Hem katabolize olduğunda antioksidan özellikli biliverdin ve bilirubin oluşumunu sağlar. Bu antioksidanlar peroksi radikallerine karşı savunma ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca serbest demirin şelasyonu ile antioksidan etki gösteren ferritinin aktivasyonunu

arttırmakta ve antiinflamatur ve antiapoptotik özellikleri olan karbonmonoksit üretimini sağlamaktadır. Karbonmonoksitin, proapoptotik transkripsiyon faktörü olan GADD153 ekspresyonunu baskılayarak antiapoptotik etki gösterdiği iddia edilmektedir. HO-1/CO⁺ sistemi ER stres periyodunda hücre hayatta kalımını sağlamak için önemli bir adaptif mekanizma sağlayabilmektedir. ER Ca⁺⁺ ATPaz'ını inhibe ederek ER stres oluşturan taspigargin primer nöron hücrelerinde HO-1 mRNA artışını sağlamıştır. Ayrıca disülfid bağ oluşumunu bozarak ER'de yanlış protein katlanması ile ER stres oluşturabilen homosisteinin arttığı hiperhomosisteinemili bir mürin modelinde HO-1 ekspresyon artışı gösterilmiştir. Nrf-2 nüklear transkripsiyon faktörü, ARE'ye bağlanarak HO-1 gen ekspresyonunda uyarıcı bir rol oynamaktadır (78).

Serbest Hem, hepatosit, oligodentrosit, pankreas B-hücresi gibi hematopoetik olmayan hücreleri TNF-aracılı apoptoza duyarlı kılmaktadır. Serbest Hem, yapıdaki Fe atomunun pro-oksidan etkisi ile sebest radikal üretimi yolu ile TNF'ye cevapta sitotoksik etki oluşturmaktadır. Lipit peroksidasyonu, sürekli JNK aktivasyonu, kaspaz-8 ve kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptoza neden olmaktadır. HO-1 ise, serbest Hem'in hemoproteinlerden salınımını, hücrelerde birikimini ve pro-oksidan etkilerini inhibe etmektedir (39).

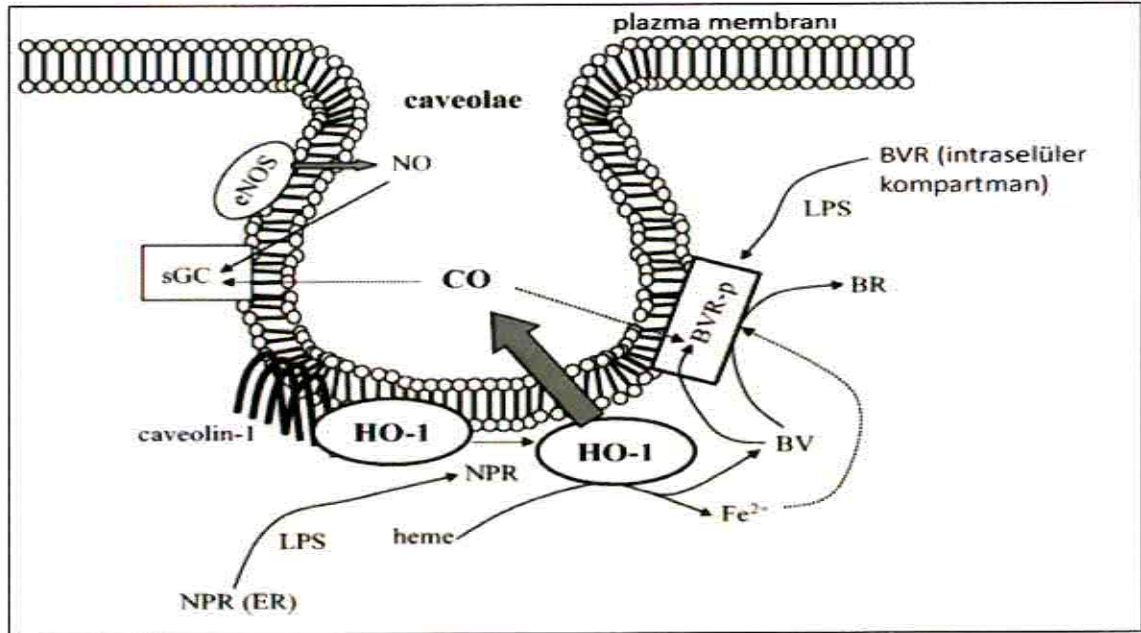
Adult T cell lösemi/lenfoma (ATL) tedavisinde kullanılan proteozom inhibitörü bortezomib hücre kültüründe protein katlayıcı ısı şok protein ekspresyonunu ve HO-1 ekspresyonunu artırmıştır. Oksidatif stresle ilişkili bir gen olan HO-1, HIF-1'in hedef genlerinden biridir ve ROS'a cevap olarak uyarıldığı iddia edilmektedir (43).

Proteinin aktif bölgeyi de içeren büyük kısmı sitoplazmada, kısa C terminali ise düz ER lümeninde yer almaktadır. Nükleusa transportu için proteaz aracılığı ile C-terminalinin kırılması gerekmektedir. HO-1'in nükleusa migrasyonu sonucu aktivitesinde kayıp oluşmasına rağmen nüklear lokalizasyonunun, oksidatif strese karşı sitoproteksiyon oluşturan genlerin upregülasyonunu sağlayabileceği iddia edilmektedir. Bir transkripsiyon faktörü değildir, ancak oksidan-responsif transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını düzenleyerek gen transkripsiyonunda indirek etkileri olabileceği iddia edilmektedir (73).

Karbonmonoksit gazı sıçan hepatositlerinde ve insan HepG2 hücrelerinde, HO-1 ekspresyonunu Nrf-2 üzerinden PERK sinyalizasyonunu arttırarak yapmaktadır ve

ayrıca p38 mitogen-MAPK aktivasyonu ile CHOP supresyonu yaparak apoptozu önlemektedir (60).

Endotel hücrelerindeki HO-1 aktivite artışı, CO açığa çıkararak TNF ile indüklenen apoptozu önlemektedir. Artan E-selektin ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ise Fe ve bilirubin yolunu ve HO-1 aktivitesini olumsuz etkiler. İnsan nötrofilleri üzerinde Hem etkisi için HO aktivitesinin kısmen gerekli olduğu gösterilmiştir: HO'nun yarışmalı bir inhibitörü tarafından nötrofil apoptozunun gecikmesi kısmen tersine dönmüştür. Ancak, ne biliverdin ne de onun metaboliti bilirubin, nötrofil yaşam süresi üzerinde etkili olmamıştır. CO ve/veya Fe HO-1 tarafından oluşturulan efektör moleküller olması muhtemeldir. Hem tarafından nötrofillerde HO-1 ekspresyonunun uyarılması ve HO-1'in inflamatuvar cevap sırasında nötrofil spontan apoptozunu modüle etmedeki rolü yeni ve ilgi çekici noktalar (10).



Şekil 12. Kaveolar HO-1 (59)

2.18 CAVEOLIN-1 (Cav-1)

Kaveolinler kaveolanın yapısal proteinleri olup memeli hücrelerinde beş farklı izoformu kodlayan üç farklı genle eksprese edilmektedirler (cav-1, -2 ve -3). Cav-1 primer sekansı, membrana sabitleyici merkezi bir hidrofobik domain (rezidü 102-134) bir oligomerizasyon domaini (rezidü 61-101) ve scaffolding domaini (rezidü 82-101) içermektedir. Kaveola ilk olarak plazma membranında kolesterol, glikosfingolipit ve

sflngomiyelinden zengin veziküler invajinasyonlar olarak belirlenmiştir (124). Çoğunlukla kardiyak miyositlerde olmak üzere farklı dokularda yapılan birçok çalışma, kaveola içinde Na^+/K^+ -ATPaz ile komşu membran proteinlerinin etkileştiğini ve hücre içi organellere sinyaller gönderildiğini göstermektedir (134).

Na^+/K^+ -ATPaz'ın Cav-1'in N terminaline bağılı olduğu gösterilmiştir. Zaman ve doza bağılı olarak bu etkileşimin düzenlendiğı ve LLC-PK1 hücrelerinde ouabainin Cav-1 tirozin fosforilasyonunu uyardığı belirlenmiştir. Canlı hücrelerde olduğu gibi izole kaveol preparasyonlarında ouabain Na^+/K^+ -ATPaz-Src-kaveolin kompleks oluşumunu arttırmıştır. Metil-siklodekstrin ile kolesterol azaltılması veya siRNA ile Cav-1 azaltılması Na^+/K^+ -ATPaz ve Src'yi azaltmıştır. Kolesterol tükenmesi ouabain bağılı Na^+/K^+ -ATPaz-Src sinyal kompleksinin oluşmasını önlemiştir, benzer şekilde Cav-1 tükenmesi kolesterol replasmanı sonrası restore edilen ERK'lar üzerinde ouabainin etkisini bloke etmiştir. Açıkça kaveolar Na^+/K^+ -ATPaz, pompanın Src ile etkileşen sinyal havuzunu temsil etmektedir ve ouabain sinyallerini iletmektedir (124).

LLC-PK1 hücrelerinde ouabain, klatrin aracılığı ile plazma Na^+/K^+ -ATPaz endositozunu uyarmaktadır. Ouabainin uyardığı endositozda kaveol gerekmektedir. Cav-1 deplesyonu ile $\alpha 1$ altünite, AP2, PI3K ve klatrin ağır zinciri arasındaki protein-protein etkileşiminin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (77).

Oligomerizasyon domaini ile C-terminal domain arasındaki etkileşim 14-16 kaveolin içeren kaveolinlerin iskele fonksiyonu için önemli olan yüksek moleküler oligomerlerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. İskele domaini ile Src, EGFR ve Ras gibi çok sayıda sinyal proteinlerindeki kaveolin bağlayıcı motifler arasındaki etkileşim bu proteinleri kaveolada yoğunlaştırmaktadır. Bu şekilde, kaveolada Src ve diğer sinyal proteinlerinin Na^+/K^+ -ATPaz ile etkileşimi gerçekleşebilmektedir. Kalp, böbrek ve kültür hücrelerinden izole kaveolada Na^+/K^+ -ATPaz'ın yoğun olarak bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır. İzole kalp preparasyonlarında ouabainin kaveolar ERK'ları aktive ettiği bulunmuştur, bu ouabain aracılı sinyal iletiminde kaveolar Na^+/K^+ -ATPaz'ın rolü olabileceğini düşündürmektedir (124).

Na^+/K^+ -ATPaz α altbirimi iki tane korunmuş kaveolin bağlayıcı motif içermektedir. N-terminal bağlayıcı motif ilk transmembran heliksinin sitozolik tarafında yerleşirken C-terminal bağlayıcı motif ekstraselüler tarafta yer almaktadır. Bu iki bağlayıcı motif memelilerde yüksek oranda korunmuştur. Cav-1, iskele domaini

sayesinde Na^+/K^+ -ATPaz'ın kaveolin bağlayıcı motifine bağlanmaktadır ancak kaveolinler plazma zarını geçemezler. Muhtemelen $\alpha 1$ altünite C-terminal bağlayıcı motifinin bu etkileşime daha az katkıda bulunduğu, alternatif olarak da C-terminal bağlayıcı motifin sekrete Cav-1 ile etkileşebileceği düşünülmektedir ancak bu konu henüz tam olarak bilinmemektedir (124).

3. GEREÇ – YÖNTEM

3.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER:

1. Santrifüj MSE, MISTRAL 3000I, seri no: 5691/02/075, U.K.
2. Santrifüj Jouan, C4i, seri no: 30411037, France
3. Mikropipetler (Sealpette Jencons 0.5-10, Treff Lab 20- 200, 100-1000, Genex Beta 10-100, 50, 2-20, Dialab 200-1000, Rainin Pipet-plus R 20, Socorex 50-200, Eppendorf 20, 100, 200, 1000, Germany).
4. Mikrosantrifüj SIGMA 3K30, seri no: 76262, USA
5. Mikrosantrifüj Jouan A-14, seri no: 39903105, France
6. 0,6 ml ve 1,5 ml nükleaz içermeyen eppendorf tüp
7. 0,2 ml PCR tüp
8. Derin dondurucu -70°C, NUAIRE, Seri no: 9394248, USA
9. Derin dondurucu -80°C, NUAIRE, Seri no: Z17N-205195-ZN, USA
10. Benmari ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N seri: 3940517, Jouan, France
11. Benmari Termal Lab. Aletleri, seri no: 821911, Türkiye
12. Vorteks VM3, Windaus, 3392, Germany
13. LightCycler 480 II, seri no: 28218, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
14. Laminar-flow (Bilser, Seri no: 6087, Ankara, Türkiye)
15. Laminar-flow (Nuaire, Model no: Nu-425-400E, seri no: 116026070307, USA)
16. High-pure PCR RNA isolation kit (Cat. No.11 828 665 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
17. Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Cat no. 04 379 012 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
18. LightCycler 480 Probe Master (04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
19. Human GAPDH forward-reverse (19/19 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL60, Cat No.04688589001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
20. Human Grp78 forward-reverse (18/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL39, Cat No. 04687973001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
21. Human Grp94 forward-reverse (24/23 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL62, Cat No.04688619001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

22. Human MTJ1 forward-reverse (20/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL32, Cat.No.04687655001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
23. Human HO-1 forward-reverse (21/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL42, Cat.No.04688015001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
24. Human CHOP forward-reverse (20/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL9, Cat.No. 04685075001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
25. Human Cav-1 forward-reverse (18/21 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL42, Cat.No.04688015001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
26. Human HK II forward-reverse (18/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL54, Cat.No.04688515001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
27. Human MDR-1 forward-reverse (20/19 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL21, Cat.No.04686945001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
28. Human MRP-1 forward-reverse (20/19 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL88, Cat.No.04689135001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
29. Human Par-4 forward-reverse (20/25 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL7, Cat.No.04685055001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
30. Human XBP-1 forward-reverse (24/24 b) primer çifti (Sentez No: 379463/379464 Alfa DNA, Montreal, Canada,)
31. LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, 04729692001 white, lot: 09016400, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
32. Ultrasonic Cleaner, seri no: 030607, Germany
33. Spektrofotometre, IMPLLEN NanoPhotometer, Seri no: 1271, U.K.
34. pH metre, Microprocessor pH meter EDT Instruments RE 357, 702 U.K.
35. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, JL-180, seri no: 300258, Japan)
36. Cellstar Tissue Culture Flask (25 cm²) kırmızı kapak Cat No.690175 Grenier bio-one, Austria
37. Cellstar 96 well Cell Culture Plate, Cat no.655 180 Grenier bio-one, Austria
38. 10 µl (cat. no. 765288), 20 µl (cat. no.774288) 100 µl (cat. no.772288), 200 µl, 1000 µl (cat. no.740288) pipet uçları, steril, Grenier bio-one, Austria
39. 10 µl pipet ucu, steril, Neptune BT10XL, lot: 56522 Mexico
40. CO₂ inkübatör, Sanyo MCO-17AIC, seri no: 00605796, Japan
41. İnvirt mikroskop, Nikon eclipse TS100, seri no: 0101743, Japan

42. Real Time Cell Analiz sistemi-RTCA-SP (xCELLigence System monitors) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
43. GenAmp 9700 Thermal Cycler cihazı, cat. no.235034083, Applied Biosystems , California USA
44. Arçelik MD 554 mikrodalga fırın, seri no: 0300472807, Çin
45. Consort E702 elektroforez güç kaynağı, S/N 42568, Belgium
46. Minicell EC370M elektroforez tankı
47. Herolab UVT-20M Transluminatör cat: 296500, seri no: 970406500, Germany
48. Avegene life science LIAS ChemX AG-LA200/400F imaj analiz sistemi

3.2 KULLANILAN KİMYASALLAR

1. 2-Deoxy-D-glucose, 1 G , % 99 crystalline, MA: 164.16 g/mol, Sigma, D6134, USA
2. Medium: DMEM, Biological Industries, Lot: 01-050-1A, with 1 g/L D-glucose, with Na Piruvat, without L-Glutamin, İsrail
3. Ouabain octahydrate 1 G, Sigma, Cat. No. O3125, MA: 728.8, %95 powder, USA
4. L-Glutamin, 200 mM, Biological Industries, Cat: 0.3-0.20-1C, Lot: 567256, İsrail
5. Fetal Bovine Serum, Heat inactivated, Sterile filtered, insect cell culture tested 500 ml, Cat No: F7678 Sigma Aldrich, USA
6. Trypsin-EDTA (%0.25 Trypsin, %0.02 EDTA) Cat No: 03052-1B Lot 733055 Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
7. 10.000 Penisilin / 10 mg Streptomisin 100X Cat No: P0781, 100 ml, Sigma-Aldrich, USA
8. Dimethylsulfoxid (DMSO) (MERCK-Schuchardt, Cat. No: 802912, Germany)
9. PBS (Phosphat Buffer Salin), 10 mM, pH 7.4
 - NaCl, 136 mM (Merck, Cat. No: 6400) MW: 58,44 Germany
 - KCl, 2.7 mM (Merck, Cat. No: 4935) MW: 74,56 Germany
 - Na₂HPO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 6586) MW: 141,96 Germany
 - KH₂PO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 4871) MW: 136,09 Germany
10. Isopropanol (Merck, Cat. No: 995) Germany
11. pH 4, pH 7, pH 10 kalibratörler (Orion Application Solution 910104, 910107, 910110 CAS Reg. No 7732-18-5, GmBh)
12. Normal melting temperature (NMP) Agaroz Sigma, A-0169, USA
13. Low melting temperature (LMP) Agaroz (Nusieve GTG Agaroz) BMA, 50080 USA

14. Ethidium bromide E8751 ~95% (HPLC) MA: 394.31 Sigma-Aldrich, USA
15. pUC Mix Marker 8 SM0303 50 µg 0.1 µg/µl Fermentas
16. 1 ml 6X DNA Loading Dye Fermentas
17. FastDigest PstI enzyme FD0614 800 reaksiyon Fermentas, Lithuania
18. 10x FastDigest Buffer 2x1 ml
19. TBE 5x TBE, pH 8,2
 - 450 mM Tris Baz (MA 121,4 g) 54,513 g Sigma T-1503, lot: 80H5634 USA
 - 450 mM Borik Asid (MA 61,83 g) 27,823 g Merck 160 Germany
 - 10 mM EDTA 20 ml 0,5 M EDTA(pH 8) (MA 292.24 g) 2.92 g Pancreac 131026, Barcelona, Espana

3.3 HepG2 HÜCRE KÜLTÜRÜ

HepG2; insan hepatoselüler karsinom hücreleridir. Çoğalması adheren özellik taşır. Epitelyal morfoloji gösterir. Doubling time 48 saattir. Pasaj 17 HepG2 hücreleri Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'nden Prof. Dr. Mithat Bozdayı'dan temin edildi. Hücreler aşağıda verilen protokole göre pasajlandı.

3.3.1 Hücre Kültür solüsyonları

1) DMEM Medyum pH; 7.4

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Lot: 01-050-1A
- 1 g/L D-glucose ve Na Piruvat içerir, L-Glutamin içermez
- Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.

2) Fetal Bovin Serum (FBS)

- Sigma Aldrich, 500 ml, USA
- Katalog No: F7678
- Isı ile inaktive edilmiş, steril filtre edilmiş, böcek hücre kültüründe test edilmiş Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklanır.

3) L-Glutamin 200 mM, 20 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03-022-1C, Lot: 567256
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 2'şer ml alikotlanarak -70 °C'de saklanır.

4) Tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin, % 0,02 EDTA) 100 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03052-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklanır.

5) 10.000 ü PENİSİLİN/10 mg STREPTOMİSİN, 100X stok

- Sigma-Aldrich, 100 ml, USA
- Katalog No: P0781
- 15 ml'lik falkon tüplere 5'er ml olacak şekilde alikotlanarak -70 °C'ye kaldırılır

6) Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mM pH;7.4 1 L

Tablo I. PBS solüsyon hazırlığı, 1 L

Madde	Miktar	Firma
NaCl 136 mM	8 g	Merck, cat. no.6400, S-12, Germany
KCl, 2.7 mM	0.2 g	Merck, cat. no 4935, P-11, Germany
Na ₂ HPO ₄ , 10 mM	1.44 g	Merck, cat. no 6586, S-7a, Germany
KH ₂ PO ₄ , 10 mM	1.36 g	Merck, A997671 851, P-3, Germany
dH ₂ O	800 ml	

- 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 1.36 g KH₂PO₄ tartılarak 800 ml dH₂O ile çözünmesi sağlanır.
- pH 7.4'e ayarlanarak dH₂O ile 1 litreye tamamlanır.
- 0.22 µm'lik filtre ile filtre edilir. Sterilizasyon için otoklava gönderilir. 2-8°C'de saklanır.

7) Hücre Kültür Komplet Medyum Hazırlığı

- FCS, -70 °C'den 37 °C'ye alınarak çözülmesi sağlanır.
- Penisilin/streptomisin 100X stok solüsyonu, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlanır.
- L-Glutamin 200 mM, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlanır.
- 100 ml komplet DMEM medyum hazırlanması için tablo II'deki miktarlardaki solüsyonlar laminar flow kabininde steril şartlara dikkat edilerek karıştırılır.
- 0,22 µm'lik filtre ile steril cam şişeye filtre edilip 3 tane 50 mL'lik falkon tüpe konulur ve ışıktan koruyarak 2-8 °C'de saklanır.

Tablo II. Komplet DMEM Medyum Hazırlığı, 100 ml

	Volüm	Final konsantrasyon
FBS	10 ml	% 10
Penisilin/streptomisin 100x	1 ml	1x
L-Glutamin 200 mM	2 ml	% 2 (4 mM)
DMEM	87 ml	

8) DMEM Freeze-Medyum Hazırlığı, 10 ml

- DMEM komplet medyum benmaride 37 °Cye getirilir.
- Kültür şartlarında, hücreler dondurulmadan önce % 10 DMSO olacak şekilde DMSO eklenir.
- Freeze-medyum sadece dondurulacak hücreler için kullanılır.
- Taze hazırlanmalıdır.

Tablo III. Freeze medyum, 10 ml

	Volüm	Final konsantrasyonu
DMEM Komplet Medyum	9 ml	% 90
DMSO	1 ml	% 10

3.3.2 Hücre Kültür Protokolleri

3.3.2.1 -80 °C’de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi

- -80 °C’den çıkarılan hücreler hızla çözülür.
- 600 xg’de, 37 °C’de 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılıp üzerine DMEM komplet medyum eklenir, karıştırılır.
- Hücreler pasteur pipeti ile flaska pipetlenir ve üzerine DMEM komplet medyum eklenerek 5 ml’ye tamamlanır.
- CO₂ inkübatöre kaldırılır.

3.3.2.2 HepG2 hücrelerinin pasajlanması

- Flasktaki hücreler % 70-80 konflüent olduğunda pasajlama yapılır.
- Flasktaki komplet medyum uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve hücreler yıkanır.
- PBS uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA flaska ilave edilir ve 3 dk süreyle CO₂ inkübatörde bekletilir.

- Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA'nın üzerine ~ 3-4 ml komplet medyum ilave edilir ve karıştırılır.
- Komplet medyum ve hücreler 15 ml'lik falkon tüpte toplanır.
- 600 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılarak 5 ml komplet medyum ile resüspanse edilir.
- 4 flaska ~1'er ml dağıtılır ve komplet DMEM ile 5 ml'ye tamamlanır.
- CO₂ inkübatöre alınır.
- Medium değiştirme haftada 2 ya da 3 kez yapılır.

3.3.2.3 HepG2 hücrelerinin dondurulması

- Flaskın mediumu uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml PBS eklenerek yıkanır.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA eklenerek 3 dk CO₂ inkübatörde bekletilir.
- Mikroskopta hücre ayrılması izlendikten sonra ~2-3 ml komplet DMEM medyum eklenerek hücreler 15'lik falkonda toplanır.
- 600 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılıp üzerine 5 ml freeze-medium eklenir.
- 1'er ml alikotlanarak -80 °C'de saklanır.

3.3.3 Hücre Kültür Gruplarının Medyum Hazırlığı (İlaçlı grupların medyumları)

- **10 mM 2-DG İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 10 ml**

(2-DG MA: 164.16 g/mol)

16.416 mg 2-DG tartılır ve 10 ml komplet DMEM medyum içerisinde çözülür ve filtre edilir.

16 ml hazırlamak için 26 mg tartılır.

- **2x 10 mM 2-DG solüsyonu hazırlama:**

52.55 mg 2-DG tartılıp 16 ml komplet DMEM medyum içinde çözülür.

- **750 nM Oubain İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 2 ml**

(Ouabain MA: 728.77 g/mol, suda çözünürlük 10 mg/ml)

10 mg ouabain tartılır 1 ml dH₂O ile çözülür.

0.1093 µl volümü almak zor olduğu için 100 kat dilüsyon yapılır.

Komplet DMEM ile 100 kat dilüe edilir (10 µl ouabain+990 µl DMEM).

Buradan 10.93 µl alınıp 2 ml komplet DMEM içine konursa 750 nM oubain içeren komplet DMEM hazırlanmış olur.

- **2x750 nM Oubain İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 2 ml**

21.86 µl alınıp 2 ml komplet DMEM içine konur.

- **75, 7.5 ve 0.75 nM Oubain İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 2 ml**

Hazırlanmış olan 750 nM oubain içeren komplet DMEM'den 10'ar kat dilüsyonla hazırlanır.

3.3.4 Çalışma Gruplarının İçerikleri

- 1) Komplet medyum
- 2) 10 mM 2-deoksiglukoz içeren komplet medyum
- 3) 750 nM ouabain içeren komplet medyum
- 4) 75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 5) 7.5 nM ouabain içeren komplet medyum
- 6) 0.75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 7) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 750 nM ouabain
- 8) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 75 nM ouabain
- 9) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 7.5 nM ouabain
- 10) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 0.75 nM ouabain

3.3.5 HepG2 hücrelerinde proliferasyon deneyi

- Real Time Cell Analysis-Single Plate (RTCA-SP) cihazının 96 kuyucuklu E-pleyindeki kuyucuklara 100 µl komplet medyum pipetlenip 15 dakika CO₂ inkübatörde bekletilerek background okuma yapılır.
- Hücreler flasktan kaldırılır ve hücre sayımı yapılır.
- 80000 hücre/200 µl/kuyucuk olacak şekilde komplet medyumla restüspanse edilir.
- E-pleydeki 100 µl/kuyucuk komplet medyumun üzerine 100 µl hücre süspansiyonu eklenir.
- 80000 hücre içeren ilk kuyucuktan 100 µl ikinci kuyucuğa aktarıldığında ilk kuyucukta 40000 hücre kalır ve devam eden seri dilüsyonlarla sırasıyla 20000, 10000, 5000, 2500 ve 1250 hücre/kuyucuk ekim yapılmış olur.

- Total hacmin 200 µl olması için kuyucuklara tekrar 100 µl komplet medyum ilave edilir.
- Üç tekrarlı çalışılır.
- 24 saat monitör izlemesi yapılır.
- İlaç uygulamadan önce hücreleri logaritmik artış fazında yakalamak için yapılan proliferasyon deneyi sonucunda ekim yapılması gereken en uygun hücre sayısı belirlenir.

3.3.5.1 Proliferasyon takibi için E-Pleyt dizaynı

HepG2 için kuyucuk başına ekim yapılacak ideal hücre sayısı (5000-10000 hücre/kuyucuk) belirlendikten sonra 24 ve 48 saatlik canlılık takibi için her bir ilaç grubu altı tekrarlı olarak çalışıldı.

- RTCA-SP cihazının 96 kuyucuklu E-pleyinde uygun kuyucuklara 100 µl komplet medyum pipetlenip 15 dakika CO₂ inkübatörde bekletilerek background okuma yapılır.
- Hücreler flasktan kaldırılır ve hücre sayımı yapılır.
- 5000 hücre/200 µl/kuyucuk olacak şekilde komplet medyumla resüspanse edilir.
- E-pleydeki 100 µl/kuyucuk komplet medyumun üzerine 100 µl hücre süspansiyonu otomatik pipetle eklenip 24 saat CO₂ inkübatörde bekletilerek yapışması ve çoğalması sağlanır.
- 24 saat sonra hücreler kaldırılmadan kuyucuklardan 100 µl medyum uzaklaştırılıp 100 µl 2x hazırlanan ilaçlı medyumlar eklenerek 24 ve 48 saat boyunca izleme yapılır.

Tablo IV. HepG2 proliferasyon deneyi için E-pleyt dizaynı

1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10	10

- 1) Komplet medyum
- 2) 10 mM 2-deoksiglukoz
- 3) 750 nM ouabain içeren komplet medyum
- 4) 75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 5) 7.5 nM ouabain içeren komplet medyum
- 6) 0.75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 7) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 750 nM ouabain
- 8) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 75 nM ouabain
- 9) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 7.5 nM ouabain
- 10) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 0.75 nM ouabain

3.3.6 HepG2 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması

3.3.6.1 Hücrelerin 96 kuyucuklu pleyte ekilmesi

- % 70-80 konfluent olan HepG2 kültür hücrelerine ait flastaki medyum boşaltılır.
- Pasteur pipeti ile ~2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve hücreler yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır.
- Flaska yüzeyi kaplayacak kadar tripsin-EDTA (% 0.25-% 0.02) konulur.
- 3 dakika CO₂ inkübatörde bekletilir.
- Üzerine yaklaşık 5 ml komplet DMEM medyum konulur.
- Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapılır. Hücre sayımı yapılır.
- 96'lık pleyte her bir kuyucuğa 5000 hücre/200 µl olacak şekilde steril 50 ml'lik uç kullanılarak DMEM-hücre karışımı otomatik pipetle dağıtılır.
- %70 konflüent olana kadar 37 °C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilir. (~24 saat)

3.3.6.2 HepG2 hücre RNA izolatları için hücre ekimi

Yukarıda anlatılan hücre ekimi sonucu 24 saatte % 70 konflüent olan hücrelerin medyumundan 100 µL multikanal pipetle uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa pleyt dizaynında gösterildiği gibi, 2x ilaç içeren komplet DMEM medyumlar 100 µL/kuyucuk pipetlendi. Kontrol grubu içeren kuyulara ise normal komplet medyum 100 µL/kuyucuk pipetlendi. 24 ve 48 saat olarak iki ayrı pleyte hücre ekimi yapıldı. Her iki pleyt 37 °C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. 48 saat boyunca medyum değiştirme

işlemi yapılmadı. Çalışmada aynı gruptan 4'er kuyu birleştirilerek çift numune elde edildi. 24 saat ve 48 saat sonra hücrelerde RNA izolasyonu sonrasında gen ekspresyon çalışması yapıldı. RNA izolatları için pleyt dizaynı aşağıda gösterilmiştir.

Tablo V. RT-PCR gen ekspresyonu için 24. saat pleyt dizaynı

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

- 1) Komplet medyum
- 2) 10 mM 2-deoksiglukoz
- 3) 750 nM ouabain içeren komplet medyum
- 4) 75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 5) 7.5 nM ouabain içeren komplet medyum
- 6) 0.75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 7) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 750 nM ouabain
- 8) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 75 nM ouabain
- 9) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 7.5 nM ouabain
- 10) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 0.75 nM ouabain

3.4 BİYOİNFORMATİK ANALİZ

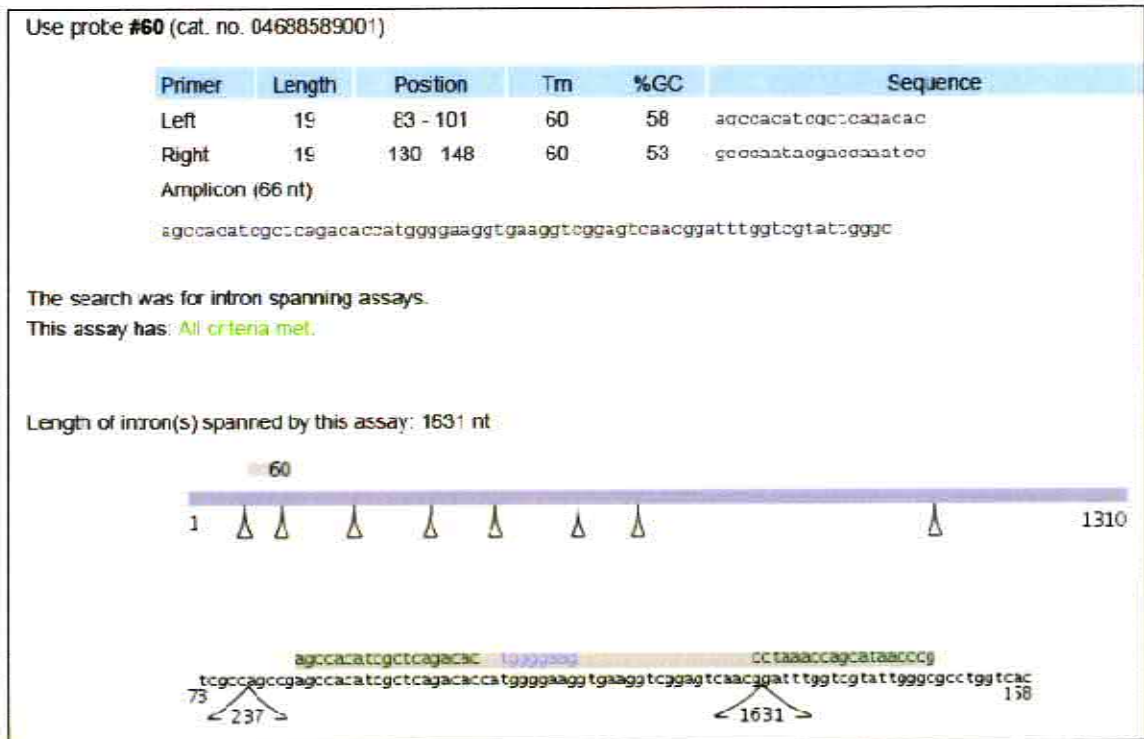
3.4.1 Primer-prob Dizaynı

İyi düzenlenmiş primerler ve probler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon sağlarlar ve genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilirler. Primer ve problerin düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

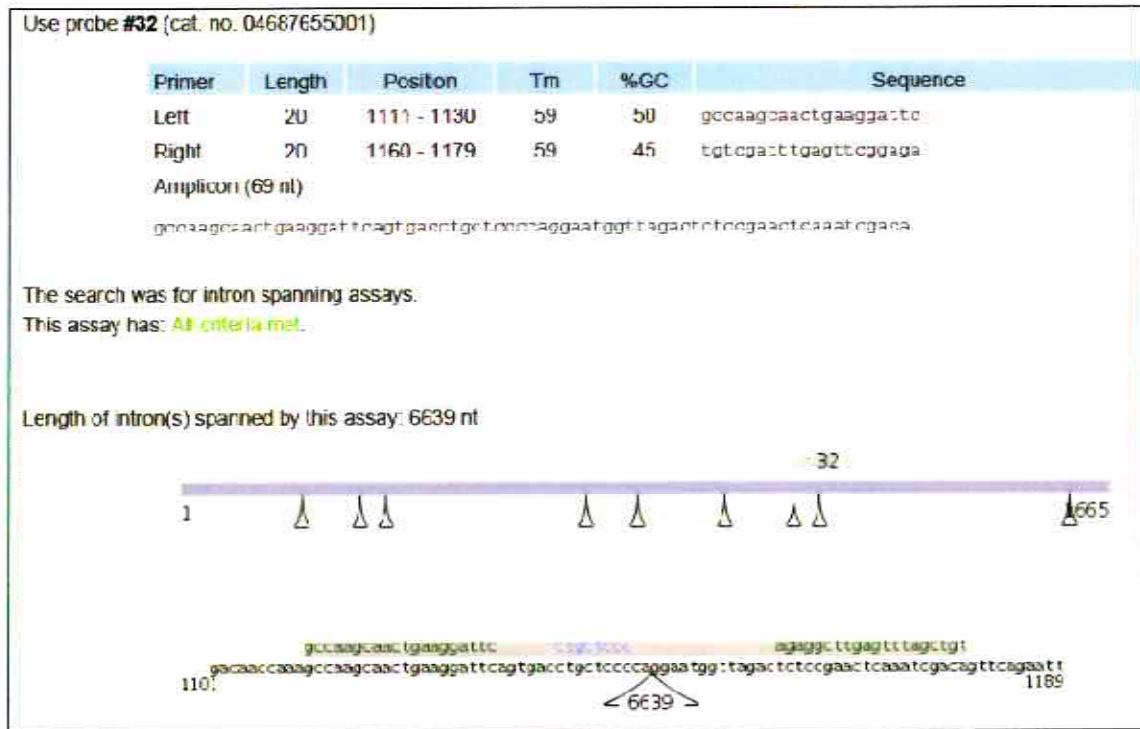
1. Tm dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalı.
2. G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı.

3. Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı.
4. Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
5. Maksimum ampikon büyüklüğü 400 bp'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
6. Problemler ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G).
7. Problemlerdeki % 30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı.
8. Problemlerin 5' ucunda G olmamalı (30)

Çalışmada house-keeping gen olarak kullanılan Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve diğer genlerin primer-prob dizaynları UPL programı kullanılarak yapıldı. XBP-1 primerleri için; <http://saturn.med.nyu.edu/research/mp/ronlab/protocols/XBP-1.splicing.04.09.16.pdf> linkindeki protokol kullanıldı (53). BLAT (UCSC Genome Bioinformatics; <http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>) ve BLAST (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Aşağıdaki tablolarda primer-prop dizaynları görülmektedir.

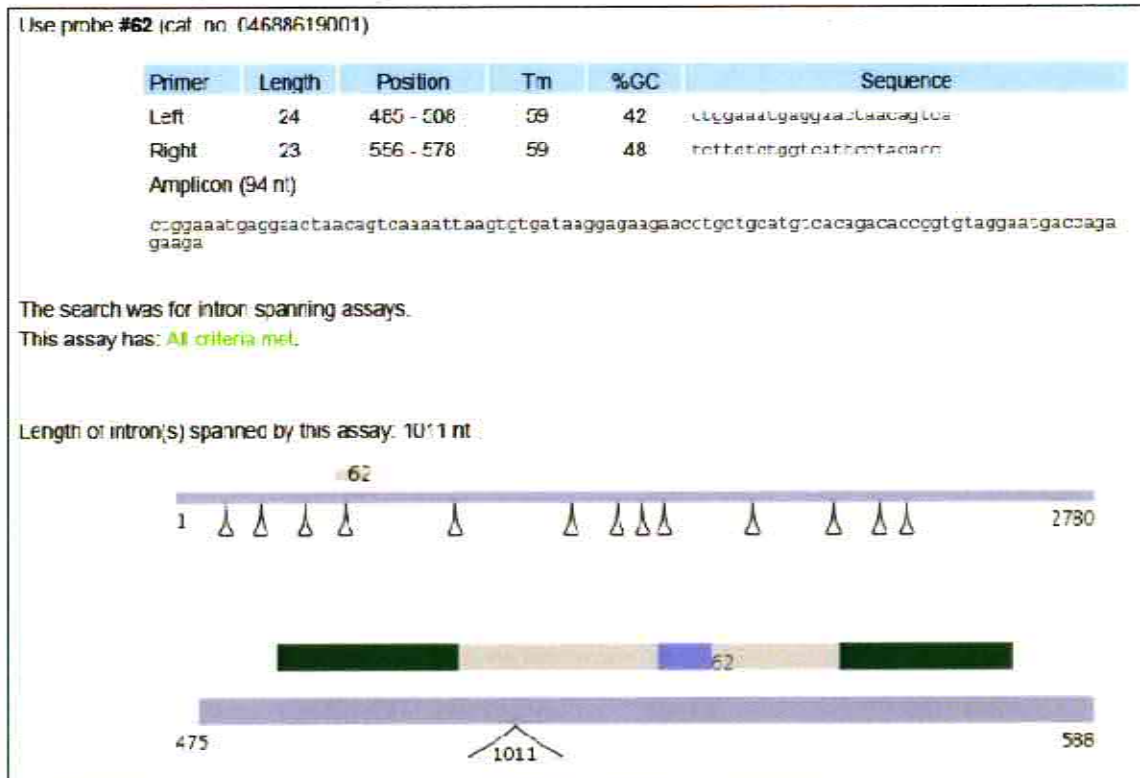


Şekil 13. GAPDH primer-prob dizaynı
GAPDH UPL prob 60 (tggggaag)



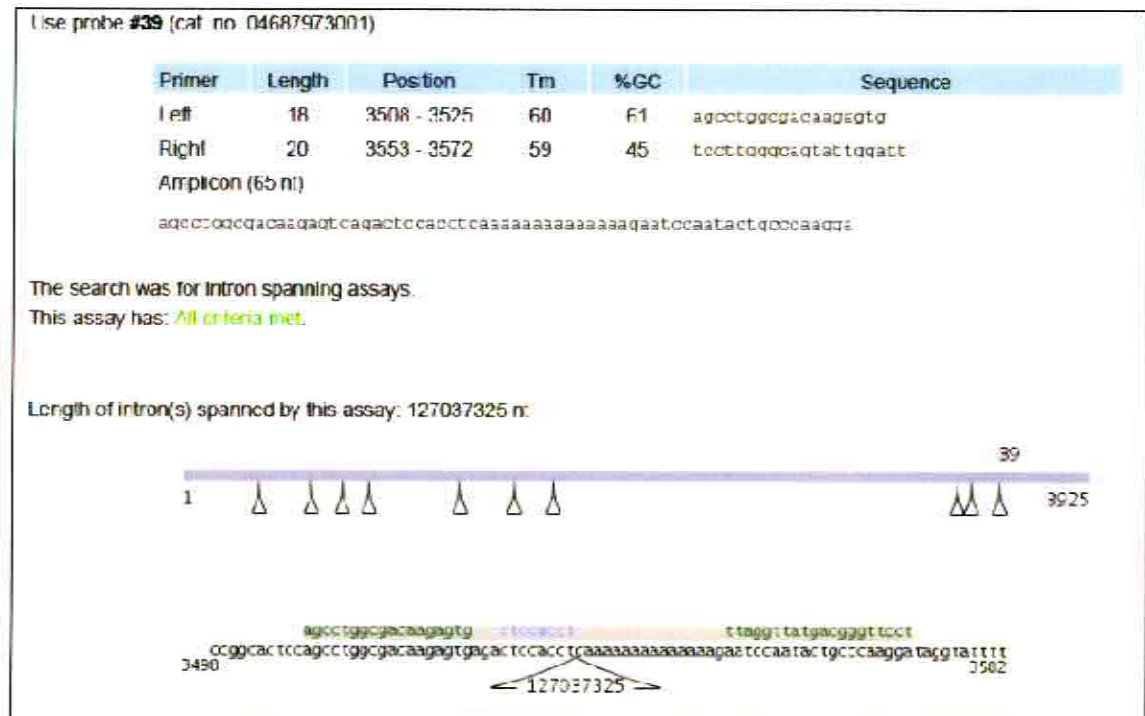
Şekil 14. MTJ-1 primer-prob dizaynı

MTJ-1 UPL prob 32 (ctgetccc)



Şekil 15. Grp94 primer-prob dizaynı

Grp94 UPL prob 62 (acctgctg)



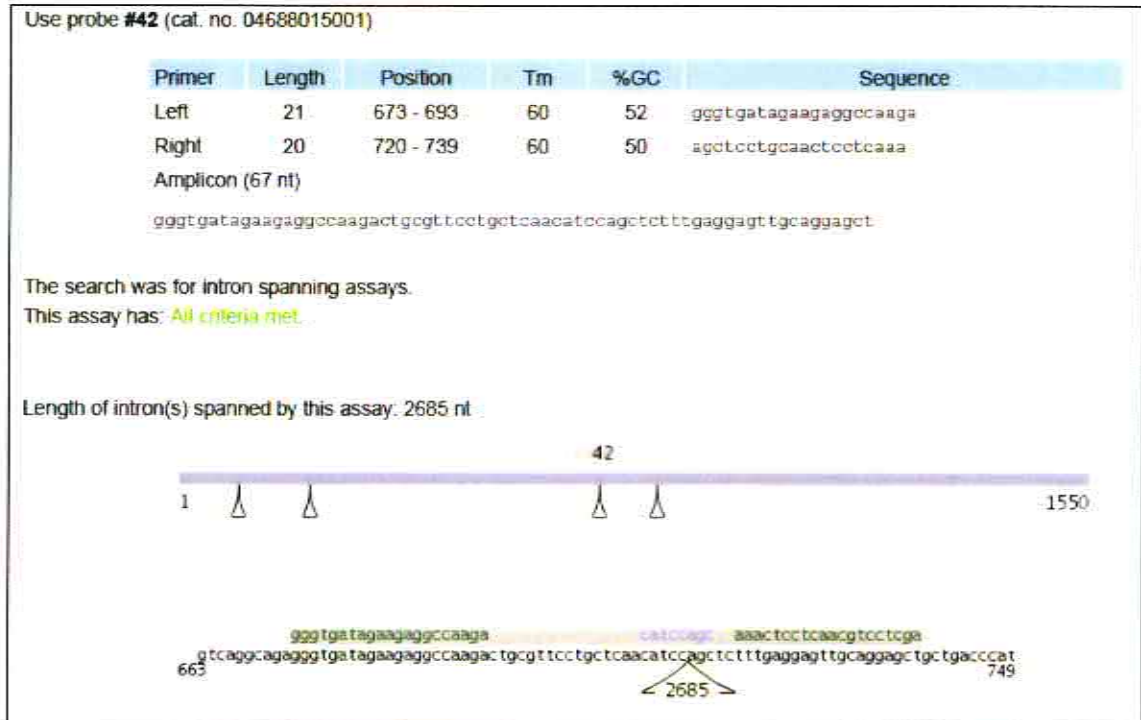
Şekil 16. Grp78 primer-prob dizaynı

Grp78 UPL prob 39 (ctccacct)



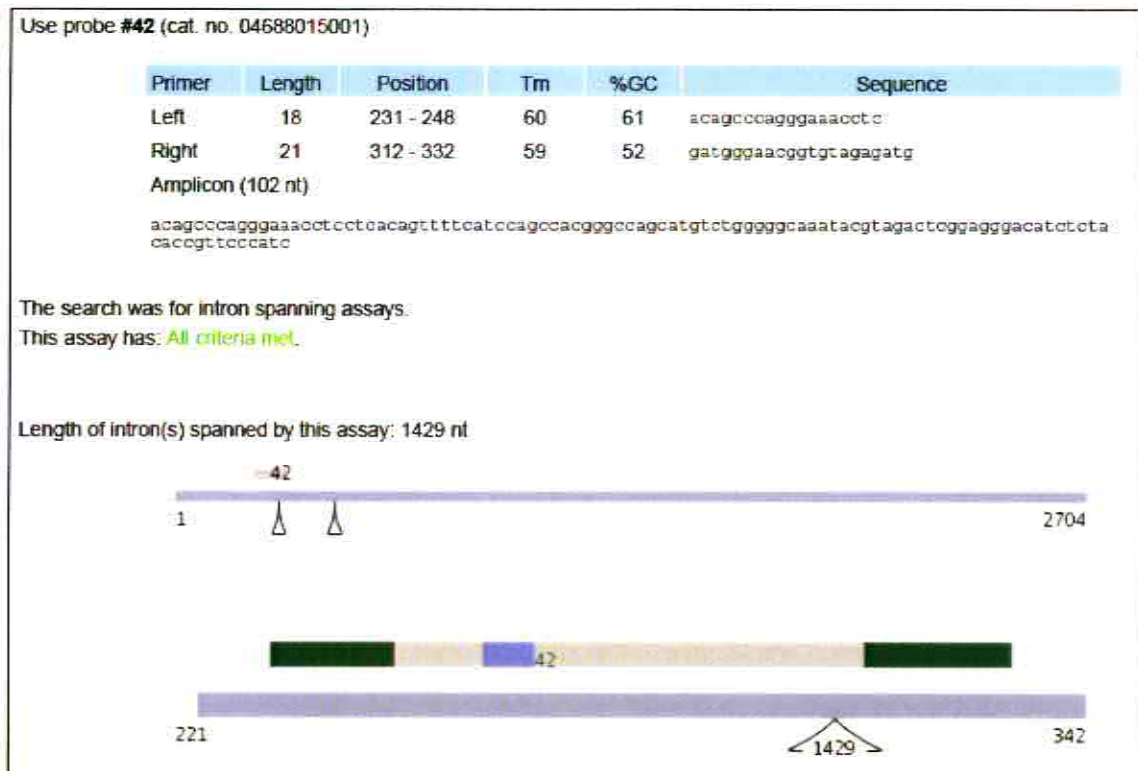
Şekil 17. CHOP primer-prob dizaynı

CHOP UPL prob 9 (catcacca)



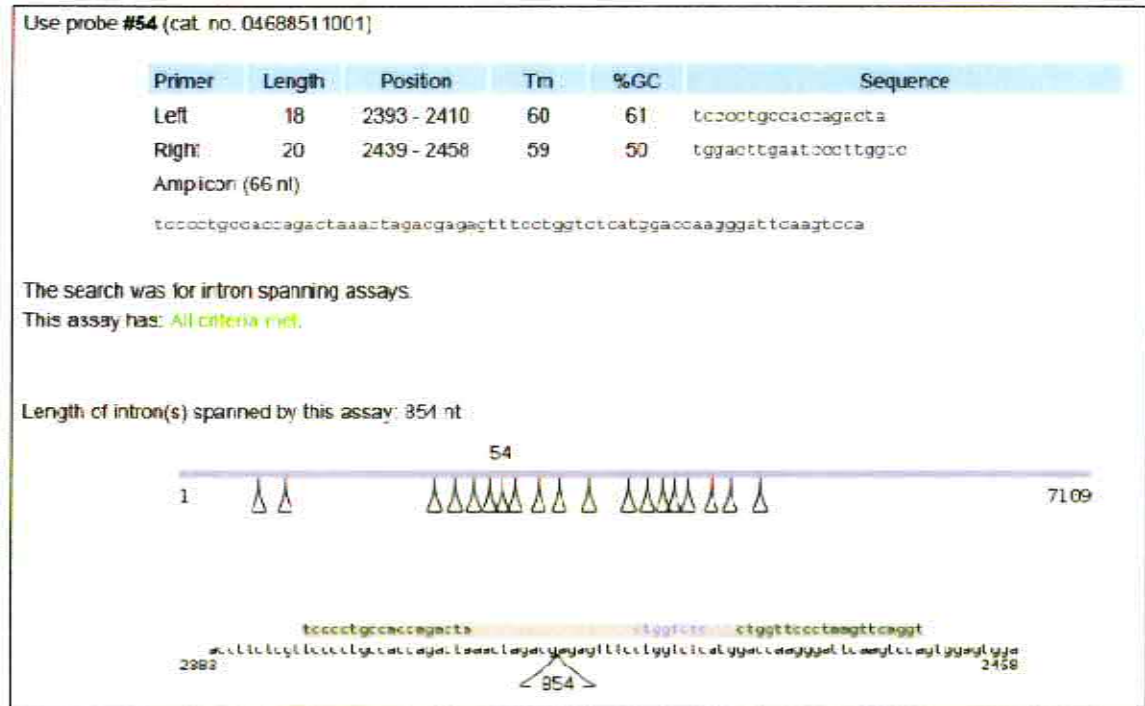
Şekil 18. HO-1 primer-prob dizaynı

HO-1 UPL prob 42 (catccage)

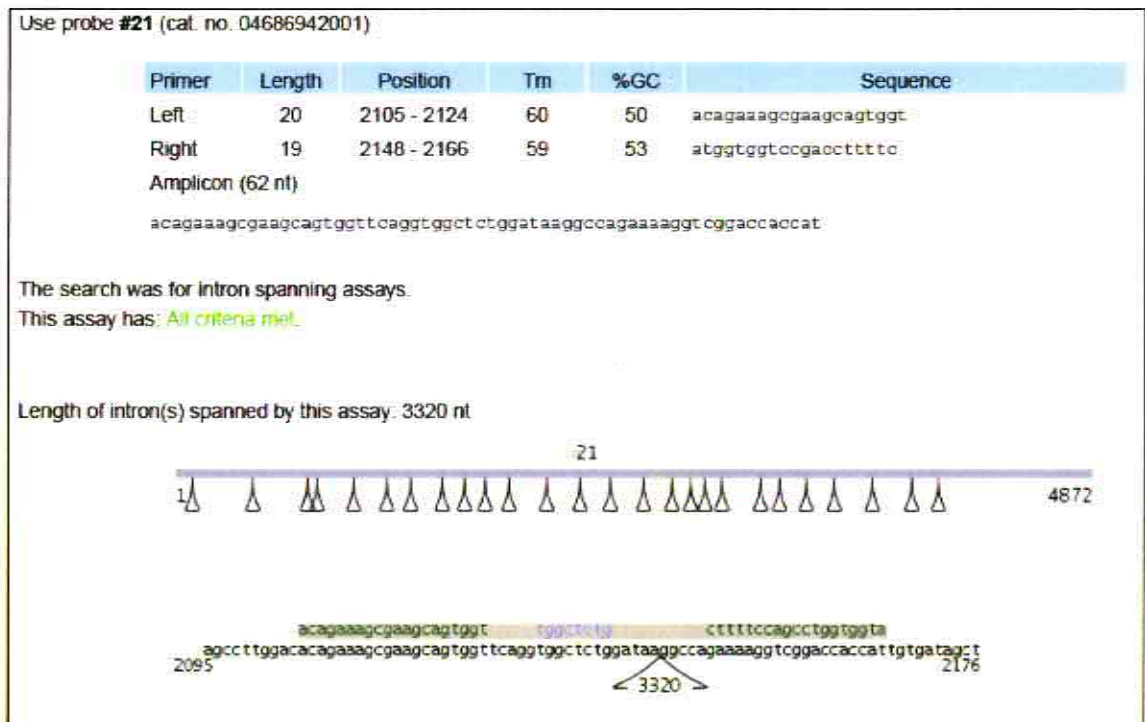


Şekil 19. Cav-1 primer-prob dizaynı

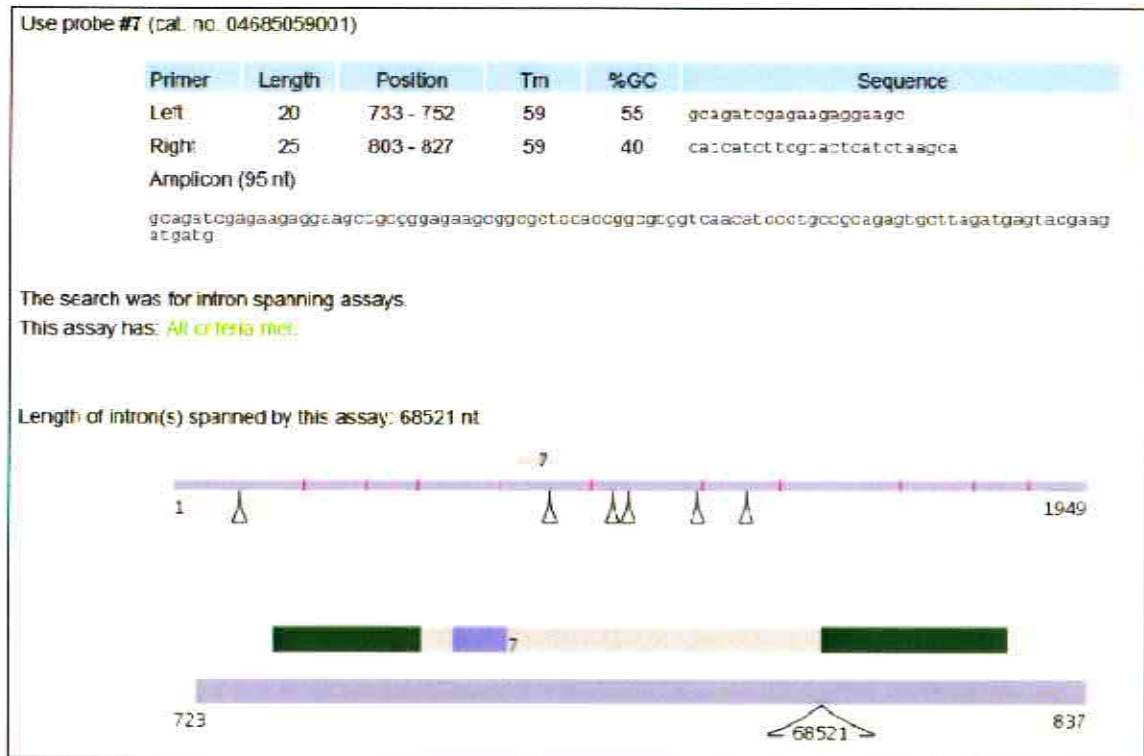
Cav-1 UPL prob 42 (catccage)



Şekil 20. HKII primer-prob dizaynı
HKII UPL prob 54 (ctggctctc)

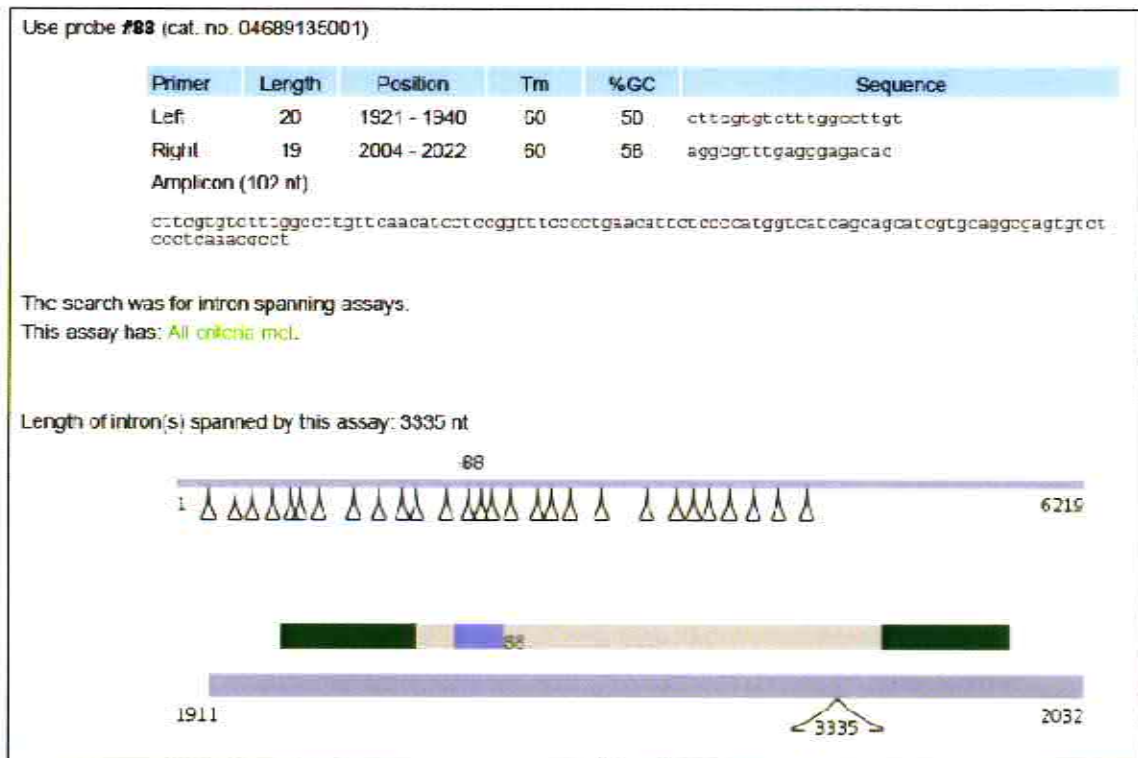


Şekil 21. MDR-1 primer-prob dizaynı
MDR-1 UPL prob 21 (tggctctg)



Şekil 22. Par-4 primer-prob dizaynı

Par-4 UPL prob 7 (gggagaag)



Şekil 23. MRP-1 primer-prob dizaynı

MRP-1 UPL prob 88 (catcctcc)

Tablo VI. XBP-1 primer dizaynı

Forward Primer	5' Pozisyon	3' Pozisyon	Uzunluk
AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC	285	308	24
Reverse Primer	5' Pozisyon	3' Pozisyon	Uzunluk
TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG	758	735	24

3.5 RT-PCR İLE GEN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI

3.5.1 RNA İzolasyon Protokolü

- Medyumları uzaklaştırılan pleyte elektronik dispensör ile 150 µl 37 C⁰'de bekletilen PBS eklenip tüm kuyucuklar bir kez yıkanır.
- Multikanal pipet ile PBS uzaklaştırılıp 50 µl Tripsin ile hücreler kaldırılır.
- 100 µl komplet medyum ile reaksiyon durdurulup 4 kuyu birleştirilerek bir ependorfa toplanır.
- 1000 gx5 dakika santrifüj yapıp süpernatant atılır ve aşağıdaki protokol uygulanır.

Tablo VII. RNA izolasyon protokolü

	High Pure RNA izolasyon protokolü
	Protokol HepG2 hücre kültüründen elde edilen örneklerle uygulanmıştır.
1.	Hücreler, 200 µl PBS ile resüspanse edilir.
2.	Lysis/-Binding Buffer' dan 400 µl (yeşil kapak) eklenir ve 15 s. vortekslenir.
3.	Numuneyi High Pure filtreli tüpe transfer etmek için: • High filtreli tüp, toplayıcı tüpe yerleştirilir. • Numunenin tamamı filtreli tüpe pipetlenir (maksimum 700 µl)
4.	• Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika, 14000 rpm'de santrifüj edilir.
5.	Santrifüj sonrası: • Toplayıcı tüpten artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp tekrar yerleştirilir.
6.	Filtreli tüp yerleştirildikten sonra: • Steril bir reaksiyon tüpüne her numune için 90 µl DNase Incubation Buffer (beyaz kapak) pipetlenir, üzerine 10 µl DNase I eklenerek karıştırılır. Solüsyon filtreli tüpe transfer edilir. • 15 dakika, +15 +25°C'de inkübe edilir.
7.	• Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer I pipelenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilir. • Artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
8.	• Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilir. • Artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.

9.	- Filtreli tüpe 200 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 2 dakika maksimum hızda (~14000 rpm) santrifüj edilerek gerideki Wash buffer'ın uzaklaşması sağlanır. ✓ Ekstra santrifügasyon ile rezidü wash bufferın uzaklaşması sağlanır
10.	Toplayıcı tüp atılarak filtreli tüp temiz, steril 1,5 ml'lik mikro-santrifüj tüpüne yerleştirilir.
11.	RNA' yı elüe etmek için: - Filtreli tüpe 50 µl Elution Buffer pipetlenir. - Oda sıcaklığında 1 dakika, 14000 rpm'de santrifüj edilir.
12.	- Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe RNA'dır. - Elüe RNA direk RT-PCR için kullanılır ya da -80°C'de daha sonra analiz edilmek üzere saklanır.

3.5.2 Numune materyali

- 10⁶ kültüre pasaj 19 HepG2 hücreleri kullanıldı.

3.5.3 RNA izolasyon solüsyonlarının hazırlığı

Tablo VIII. RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı

İçerik	Rekonstitüsyon/Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase I	DNase I, 0.55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır ve -15 -25 ° C'de saklanır. 12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır.
Wash Buffer I	20 ml absolü etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15 -25 °C'de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.
Wash Buffer II	40 ml absolü etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15 -25 °C'de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

3.5.4 RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü

Tablo IX. RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü

Transkriptör First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche) ile Thermal Cycler'da	
PROTOKOL	
1.	- Kullanmadan önce tüm reaktifler çözölmelidir. - Protokol uygulamadan önce tüm reaktifler kısa süreli santrifüj edilmelidir. - Reaksiyon düzenlenirken tüm reaktifler buz üzerinde tutulmalıdır.
2.	Buz üzerinde ya da soğuk kolon üzerinde tutulan steril, nuclease-free, thin-walled PCR tüpte, aşağıdaki sırada pipetleme yapılarak template-primer karışımı reaksiyon

	başına 50 µl olacak şekilde hazırlanır.																										
	➤ RNA numunesine daima eldiven ile temas edilmelidir.																										
	Template-primer miks (1 reaksiyon için)																										
	Komponent	Hacim	Final konsantrasyonu																								
1	PCR-grade distile su	-----	Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl																								
2	Total RNA	30 µl	1 µg total RNA																								
3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl	2,5 µl	2.5 µM																								
	Total Hacim	32,5 µl																									
3.	• Template-primer karışımı içeren tüp 10 dakika 65°C'de termal cycler cihazında tutularak denatürasyon sağlanır. • Bu basamak RNA sekonder yapısının denatürasyonunu sağlar. • Tüp daha sonra hemen buz üzerine alınır.																										
4.	Template-primer karışımını içeren tüpe sırasıyla aşağıdaki maddeler pipetlenir. <table border="1"><tr><td>Komponent</td><td>Hacim (1 reaksiyonluk)</td><td>Final kons.</td></tr><tr><td>Transkriptör Revers</td><td>10 µl</td><td>8 mM MgCl₂</td></tr><tr><td>Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl</td><td>1,25 µl</td><td>20 U</td></tr><tr><td>Deoksinnükleotid Miks, 10 mM her biri</td><td>5 µl</td><td>1 mM her biri</td></tr><tr><td>Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl</td><td>1,25 µl</td><td>10 U (reaks başına)</td></tr><tr><td>Total Hacim</td><td>17,5 µl</td><td></td></tr><tr><td>Final Hacim</td><td>50 µl</td><td></td></tr></table>			Komponent	Hacim (1 reaksiyonluk)	Final kons.	Transkriptör Revers	10 µl	8 mM MgCl ₂	Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.			Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl	1,25 µl	20 U	Deoksinnükleotid Miks, 10 mM her biri	5 µl	1 mM her biri	Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl	1,25 µl	10 U (reaks başına)	Total Hacim	17,5 µl		Final Hacim	50 µl	
Komponent	Hacim (1 reaksiyonluk)	Final kons.																									
Transkriptör Revers	10 µl	8 mM MgCl ₂																									
Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.																											
Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl	1,25 µl	20 U																									
Deoksinnükleotid Miks, 10 mM her biri	5 µl	1 mM her biri																									
Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl	1,25 µl	10 U (reaks başına)																									
Total Hacim	17,5 µl																										
Final Hacim	50 µl																										
5.	• Tüpteki reaktifler iyice karıştırılır. • Vorteks yapılmamalıdır! • Tüp termal Cycler cihazına yerleştirilir.																										
6.	• 60 dakika, 50°C'de inkübasyona bırakılır. • Transcriptor Reverse Transcriptase inaktivasyonu için tüp, 85°C'de 5 dakika bekletilir. • GeneAmp 9700 Thermal Cycler cihazında 'cdna-oligo-trans' programı kullanıldı.																										
7.	• Tüp buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulur. • Bu noktada reaksiyon tüpü +2 +8°C'de 1-2 saat ya da -15 -25°C'de daha uzun süre saklanabilir.																										
8.	• cDNA purifikasyona gerek olmadan PCR için kullanılabilir. • PCR için bir LightCycler® aleti için 20 µl reaksiyon hacmi içinde 2-5 µl cDNA kullanılmalıdır.																										

3.5.6 Gen ekspresyonları için RT-PCR protokolü

Tablo X. Gen ekspresyonları için RT-PCR protokolü

Malzeme	Hacim	Başlangıç kons.	Final kons.
PCR-grade distile su	5,8 µL		
Prim _{forw}	1 µL	10 µM	0,5 µM
Prim _{rev}	1 µL	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob	0,2 µL	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µL	2X	1X
cDNA Template	2 µL		
Toplam hacim	20 µL		

Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatılarak 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg’de uygun adaptör kullanılarak santrifüj edilmelidir.

Gen ekspresyonu için programlar:

Program adı	Siklus	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	None
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon
Soğutma	1	None

Sıcaklık Hedefleri:

Pre-inkübasyon

Hedef (°C)	Acquisition Modu	Tutulan süre (hh:mm:ss)	Artış oranı (°C/s)
95	None	00:10:00	4.4

Amplifikasyon

Hedef (°C)	Acquisition Modu	Tutulan süre (hh:mm:ss)	Artış oranı (°C/s)
95	None	00:00:10	4.4
55	None	00:00:15	2.2
72	Single	00:00:01	4.4

Soğutma:

Hedef (°C)	Acquisition Modu	Tutulan süre (hh:mm:ss)	Artış oranı (°C/s)
40	None	00:00:10	1.5

3.5.7 XBP-1 PCR protokolü

HepG2 ouabain numunelerinden Anchored-oligo(dT)18 primeri kullanılarak elde edilen cDNA ile çalışıldı.

Tablo XI. XBP-1 PCR protokolü

Malzeme	Hacim	Başlangıç kons.	Final kons.
Sterile bidistile su	5,5 µL		
XBP-1 - Prim _{forw}	1 µL	10 µM	0,4 µM
XBP-1 - Prim _{rev}	1 µL	10 µM	0,4 µM
LC 480 Prob Master	12,5 µL	2X	1X
cDNA Template	5 µL		
Toplam Hacim	25 µL		

XBP-PCR programı:

Gene Amp 9700 Thermal Cycler cihazında xbp1 programında çalışıldı.

Basamak	Derece	Süre	Siklus
Başlangıç denatürasyonu	94° C	4 dk	1
Denatürasyon	94° C	10 sn	35
Annealing	63° C	30 sn	35
Elongasyon	72° C	30 sn	35
Final Ekstansiyon	72° C	10 dk	1
Soğutma	4° C	∞	1

3.6 XBP-1 PCR-RFLP PROTOKOLÜ: FastDigest PstI ile kesim

Tablo XII. XBP-1 PCR-RFLP protokolü

		Hacim
Nükleaz-free distile su		17 µl
10X FastDigest Buffer (Fermentase)		2 µl
PCR ürünü numune		10 µl (~0.2 µg)
FastDigest PstI enzyme 37°C (optimum) (Fermentase)		1 µl
Total hacim		30 µl
İnkübasyon	37 °C'de 2 saat	
Program adı	PstI-digestion	
Thermal Cycler	GeneAmp 9700	

1. Belirtilen sırada oda sıcaklığında yukarıdaki reaksiyon bileşenleri karıştırılır.
2. Yavaşça karıştırılır ve santrifüjlenir.

3. Isı bloğunda veya su termostatında 37 ° C'de 2 saat inkübe edilir (PCR ürünü) İsteğe bağlı: fenol / kloroform ekstraksiyonu ile enzim inaktivasyonu

4. Reaksiyonda FastDigest ® Green Buffer kullanılırsa, doğrudan reaksiyon karışımının bir kısmı jele yüklenir.

Not: FastDigest ® Green Buffer final 1x konsantrasyonda herhangi bir DNA numunesi için elektroforez yükleme tamponu olarak kullanılabilir. FastDigest ® Green Buffer'ın yüksek konsantrasyonları örnekte DNA hareketliliğini değiştirebilen aşırı tuz konsantrasyonu oluşturur

3.7 ELEKTROFOREZ

3.7.1 Tris Baz, Borik Asit, EDTA (TBE) Elektroforez tamponu hazırlanması

Tablo XIII. Elektroforez tamponu hazırlığı, 1L

0,5xTBE, pH 8,3 için madde	5xTBE, pH 8,3 için madde	5xTBE için miktar/L
45 mM Tris Baz (121.4 g MA)	450 mM Tris Baz (T3b)	54.513 g
45 mM Borik Asit (61.83 g MA)	450 mM Borik Asit (B-15)	27.823 g
1 mM EDTA	10 mM EDTA (E-1)	20 ml 0.5M EDTA(pH 8)

0.22 µm'lik filtre ile filtre edilir

3.7.2 pUC Mix Marker 8 Hazırlanması (Fermentase)

Tablo XIV. Marker-8 hazırlığı, 100 µl

Marker 8	10 µl
6x yükleme tamponu	20 µl
Bidistile su	70 µl

3.7.3 PCR-RFLP için %3 kompozit jel hazırlanması:

0,5 x TBE Buffer içinde % 1 g Normal melting temperature (NMP) Agaroz ve % 2 g Low melting temperature (LMP) Agaroz olacak şekilde 30 ml hacmindeki jel kalıbı için;

- 30 ml 0,5xTBE Bufer
- 0,3 g NMP Agaroz (Sigma, A-0169)
- 0,6 g LMP Agaroz (NuSieve GTG Agaroz) (BMA, 50080)
- Mikrodalga fırında (400 watt) eriyene kadar kaynatılır.
- En son 3 µl Etidyum Bromid (EtBr) ilave edilir.

3.7.4 Jel elektroforezi

- Kuyucuklara 10 µl numune ve 10 µl marker 8 yüklenir.
- Elektroforez cihazında 8-10 volt/jel cm sabit voltaj altında yaklaşık 1 saat elektroforez uygulanır. Program 3 kullanılarak 10 cm uzunluğundaki jel için 100 volt sabit voltaj 1 saat uygulandı.

3.7.5 Agaroj jelde DNA boyanması ve görüntülenmesi

30 ml hacmindeki jele 3 µl EtBr (final konsantrasyonu 0,5 µg/ml) eklenir.

EtBr stok solüsyonu: Koyu renkli şişede ddH₂O içinde 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanır. Jel görüntüleme cihazında görüntülenir.

4. BULGULAR

4.1 RNA KANTİTASYONU

Aşağıdaki tablolarda spektrofotometrik olarak saflık ve miktar tayini yapılan HepG2 hücre total RNA'larının saat ve gruplara göre kantitasyonu verilmiştir.

TABLO XV. RNA 24. saat kantitasyon sonuçları

	A260/280	A 260/230	µg /ml	cDNA için RNA µl
1-1	2	1,5	4,8	30
1-2	1,769	1,278	9,2	30
2-1	1,366	0,698	38,8	20
2-2	1,452	0,616	18	30
3-1	1,171	0,788	49,2	20
3-2	1,225	0,732	67,6	15
4-1	1,2	0,316	2,4	30
4-2	1,154	0,395	6	30
5-1	1,846	1,263	9,6	30
5-2	1,321	0,785	70,8	15
6-1	1,75	1,129	14,0	30
6-2	1,621	0,959	18,8	30
7-1	1,261	0,547	11,6	30
7-2	1,327	0,6	27,6	20
8-1	1,375	0,647	8,8	30
8-2	1,167	0,5	2,8	30
9-1	1,4	0,538	5,6	30
9-2	1,333	0,571	11,2	30
10-1	1,3	0,52	5,2	30
10-2	1,263	0,5	9,6	30

Tablo XVI. RNA 48. saat kantitasyon sonuçları

	A260/280	A 260/230	µg/ml	cDNA için RNA µl
1-1	1,43	0,46	53,2	20
1-2	2,0	1,33	9,6	30
2-1	1,722	0,861	12,4	30
2-2	1,8	0,818	10,8	30
3-1	1,3	0,68	146	15
3-2	1,66	0,6	6	30
4-1	1,688	0,692	10,8	30
4-2	1,448	0,689	16,8	30
5-1	1,337	0,58	87,2	15
5-2	1,85	1,423	14,8	30
6-1	1,686	1,0	23,6	20
6-2	1,349	0,704	116	15
7-1	1,486	0,579	22	20
7-2	1,335	0,64	105	15
8-1	1,283	0,701	85,2	15
8-2	1,468	0,645	27,6	20
9-1	1,923	0,893	10	30
9-2	1,535	0,647	26,4	20
10-1	1,567	0,712	18,8	30
10-2	1,447	0,64	43,6	20

Total RNA miktarları ng/µl olarak kantite edilen numunelerin cDNA sentezi sırasında kullanılacak RNA miktarları 3 grup olarak ayarlandı:

20 ng/µl'ye kadar total RNA içeren numunelerden 30 µl RNA,

21-60 ng/µl arasında total RNA içeren numunelerden 20 µl RNA,

61-146 ng/µl arasında total RNA içeren numunelerden 15 µl RNA kullanıldı.

4.2 KANTİTATİF RT-PCR İLE GEN EKSPRESYON Ct DEĞERLERİ

Tablo XVII. Kantitatif RT-PCR ile gen ekspresyon Ct sonuçları

Name	grup	Cav1	HO-1	MTJ1	PAR4	GAPDH	GRP78	GRP94	CHOP	MDR1	MRP1	HK2
24 1 1	24 kontrol	32,75	27,12	36,46	29,13	27,02	32,15	24,72	28,50	31,72	29,19	32,47
24 1 2	24 kontrol	30,91	24,71	33,21	26,30	24,51	29,92	21,63	26,32	28,94	27,72	28,75
24 2 1	24 2DG	31,97	27,36	35,97	27,74	28,24	32,09	23,74	28,71	31,08	28,74	31,93
24 2 2	24 2DG	31,56	26,71	34,93	26,70	27,18	31,06	22,85	27,92	30,73	28,62	31,56
24 3 1	24 750 ouab	42,00	32,17	42,00	36,27	37,39	42	32,84	32,85	42	42	42
24 3 2	24 750 ouab	34,10	31,02	42,00	33,25	35,92	42	31,29	30,85	42	42	42
24 4 1	24 75 ouab	33,52	29,26	40,00	31,12	31,90	34,82	28,31	30,94	32,69	42	35,88
24 4 2	24 75 ouab	35,24	30,10	39,40	31,94	32,56	35,53	28,97	31,24	33,00	42	39,44
24 5 1	24 7,5 ouab	31,09	25,48	34,23	26,44	25,49	30,44	22,09	27,36	29,50	27,84	29,82
24 5 2	24 7,5 ouab	31,65	25,53	34,49	26,60	25,69	31,24	22,27	27,81	29,20	27,66	28,83
24 6 1	24 0,75 ouab	31,93	26,62	35,13	27,14	26,85	31,36	23,19	28,49	30,69	28,79	30,96
24 6 2	24 0,75 ouab	32,84	27,01	36,25	27,83	27,56	31,77	23,82	29,10	31,07	29,27	31,82
24 7 1	24 2DG ve 750 ouab	42,00	32,95	42,00	35,61	40,00	42	34,63	33,02	42	42	42
24 7 2	24 2DG ve 750 ouab	42,00	42,00	42,00	42,00	40,00	42	36,02	42,00	42	42	38,98
24 8 1	24 2DG ve 75 ouab	32,15	26,62	35,76	26,91	28,95	33,67	24,24	29,89	31,11	28,92	33,85
24 8 2	24 2DG ve 75 ouab	32,29	26,62	35,48	26,74	28,96	33,75	23,95	29,94	30,83	28,85	32,78
24 9 1	24 2DG ve 7,5 ouab	31,87	26,71	35,01	26,60	27,74	31,54	23,15	28,89	30,83	28,47	31,70
24 9 2	24 2DG ve 7,5 ouab	33,02	28,16	36,87	27,94	29,62	32,92	24,37	30,15	31,86	29,18	33,58
24 10 1	24 2DG ve 0,75 ouab	32,26	27,66	36,66	27,52	29,11	32,74	23,74	29,86	31,67	29,14	32,97
24 10 2	24 2DG ve 0,75 ouab	32,60	27,76	36,47	27,79	28,94	32,64	24,22	29,89	31,87	29,25	34,24
48 1 1	48 kontrol	32,00	25,78	34,62	26,95	25,51	31,00	22,24	27,98	30,20	28,46	29,91
48 1 2	48 kontrol	32,44	26,20	35,44	27,25	26,07	31,22	22,67	28,25	30,47	28,53	30,28
48 2 1	48 2DG	32,08	27,15	35,47	26,89	27,75	31,73	23,65	28,47	30,88	28,60	32,11
48 2 2	48 2DG	32,03	27,32	35,62	27,15	28,28	31,92	24,26	28,66	31,52	29,07	32,49
48 3 1	48 750 ouab	42,00	32,66	42,00	36,46	40,00	42	34,70	32,29	42	42	42
48 3 2	48 750 ouab	42,00	29,92	40,00	32,97	36,49	35,32	31,47	29,88	42	42	37,66
48 4 1	48 75 ouab	33,05	28,21	36,71	28,79	30,23	33,77	26,32	29,88	31,72	29,49	33,28
48 4 2	48 75 ouab	32,62	27,46	36,47	28,55	28,61	33,04	25,32	29,07	31,32	29,16	32,95
48 5 1	48 7,5 ouab	31,48	24,90	33,67	26,56	24,19	30,34	21,54	27,80	29,07	27,22	28,12
48 5 2	48 7,5 ouab	31,47	25,03	33,82	26,22	24,61	30,50	21,66	27,89	29,72	27,83	28,86
48 6 1	48 0,75 ouab	31,63	25,38	33,81	26,99	24,67	30,74	22,01	28,24	29,69	27,76	28,55
48 6 2	48 0,75 ouab	31,73	25,47	34,53	27,31	24,93	30,81	22,14	28,48	29,50	27,63	28,25
48 7 1	48 2DG ve 750 ouab	42,00	33,22	42,00	42,00	40,00	42	34,64	42	42	42	37,28
48 7 2	48 2DG ve 750 ouab	42,00	31,86	40,00	35,08	37,40	36,13	32,27	32,19	42	42	38,56
48 8 1	48 2DG ve 75 ouab	32,51	26,99	36,49	28,36	29,65	33,50	25,72	29,21	31,59	28,96	33,10
48 8 2	48 2DG ve 75 ouab	32,16	26,64	36,11	27,44	29,57	33,76	25,29	29,16	31,25	28,73	33,08
48 9 1	48 2DG ve 7,5 ouab	31,53	26,19	34,36	25,93	26,98	31,38	22,81	28,03	30,11	28,02	31,17
48 9 2	48 2DG ve 7,5 ouab	32,14	27,63	36,21	27,64	28,57	32,60	24,53	29,28	31,16	28,66	31,87
48 10 1	48 2DG ve 0,75 ouab	31,97	26,82	35,32	26,84	27,74	31,78	23,72	28,78	30,76	28,49	31,63
48 10 2	48 2DG ve 0,75 ouab	31,29	25,77	34,20	26,05	26,12	30,94	22,62	27,95	29,83	27,30	29,67

4.3 KOMPARATİF Ct METODU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ

4.3.1 Relatif kantitasyon

Gen ekspresyonunun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absolü kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değil, n-katı şeklinde ifade edilir. Real-time PCR kantitasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki küçük farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bu relatif kantitasyonda yanlış sonuçlara sebep olur. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol tüm dokulardan ekspresse olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık GAPDH, β actin, Asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) ve rRNA kullanılmaktadır. Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir (140). Çalışmamızda referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

4.3.1.1 Komparatif Ct (Threshold Siklus) Metodu

$\Delta\Delta Ct$ metodu olarak da isimlendirilen bu metot, standart eğri metoduna benzer ancak konsantrasyonların yerine Ct değerleri kullanılır. Hedef genin Ct değeri bir referans genin Ct değerine oran olarak normalize edilir. Daha sonra normalize Ct değerleri kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir. Komparatif Ct metodu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct(\text{kalibratör})$$

$$\Delta Ct(\text{hedef gen}) = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$$

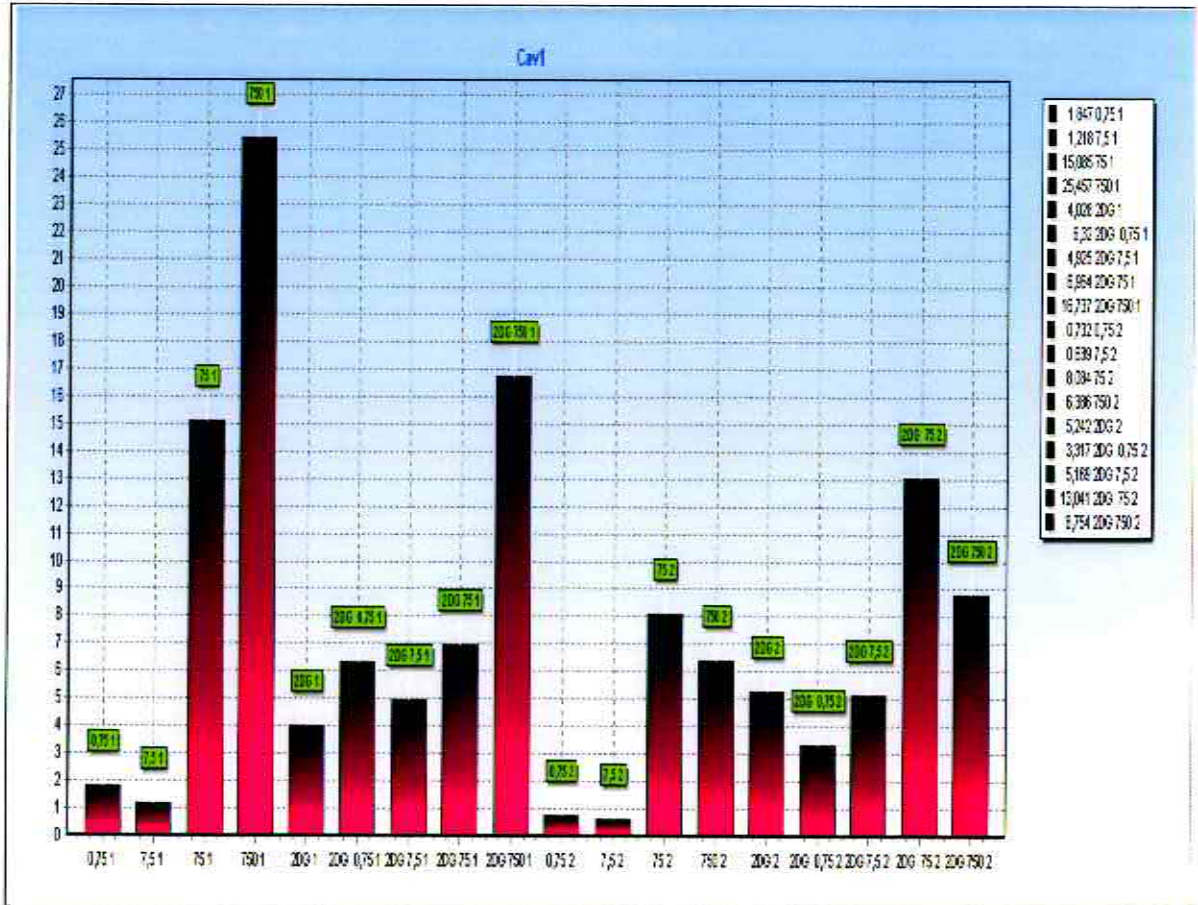
$$\Delta Ct(\text{kalibratör}) = Ct(\text{kalibratör}) - Ct(\text{referans gen})$$

Karşılaştırmalı Ct metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir: Birincisi, hedef gen amplifikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplifikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve % 100'e yakın olmasıdır. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarında ΔCt değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı ΔCt grafiğinde slope değerinin sıfıra yakın ($<0,1$) olmasıdır (127). Çalışmamızda kalibratör olarak kontrol grubu kullanıldı. Kontrolün 1.2 katı artış ya da azalma anlamlı kabul edildi. Çalışma gruplarının 'GenEx' software (GenEx, <http://genex.gene-quantification.info>) ile $\Delta\Delta Ct$

metodu kullanılarak elde edilen gen analizleri aşağıdaki grafiklerde verilmiştir (x ekseninde ilaç isimlerinin yanındaki 1 ve 2 rakamı 24. ve 48. saati ifade etmektedir).

Şekil 24'de 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan Cav-1 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

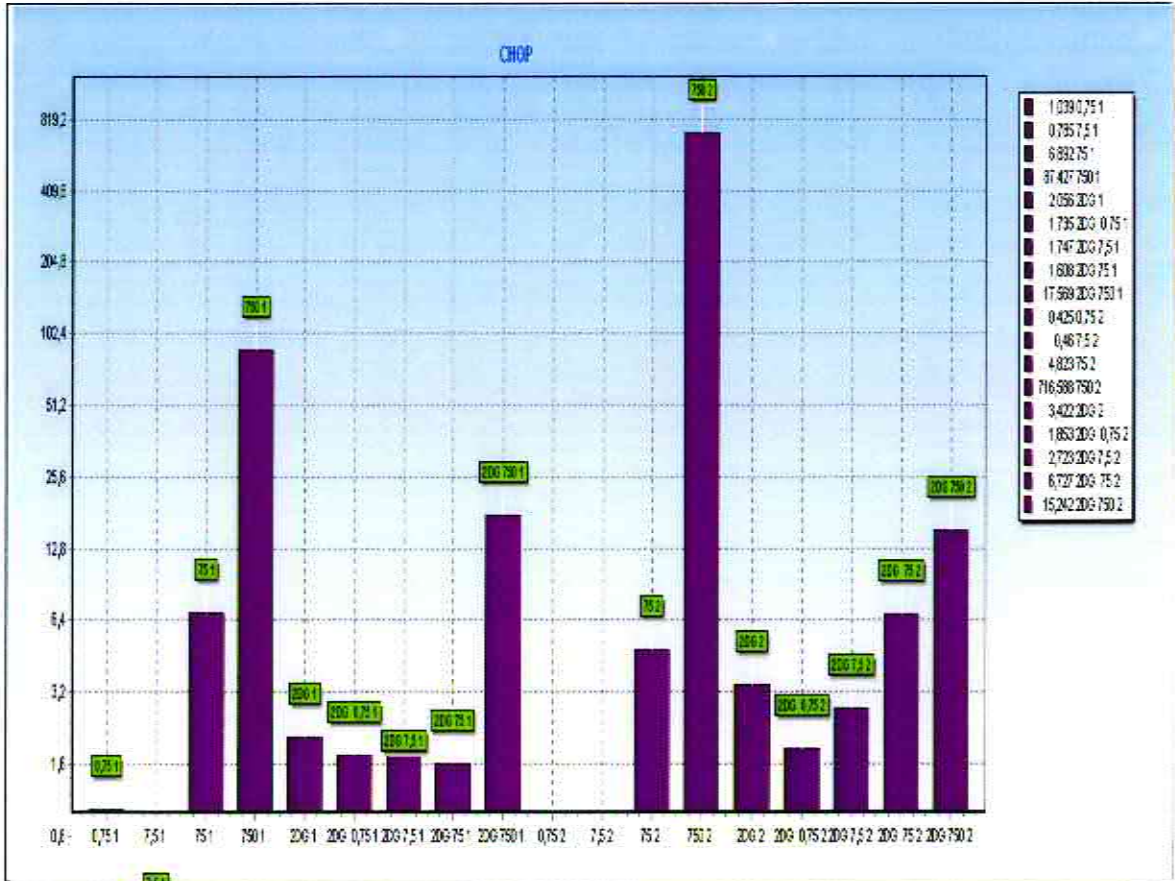
- Ouabain 24. saatte doza bağlı olarak Cav-1 ekspresyonunu arttırdı.
- UPR uyarıcı olan 2-DG HepG2 hücresinde Cav-1 ekspresyonunu arttırdı.
- 2-DG+0.75 nM ouabain birbirlerinin etkilerini artırıcı yönde aditif etkili.
- 2-DG+7.5 nM ouabain aditif etkili.
- 2-DG, yüksek doz ouabain (75 ve 750 nM) ile kombine iken 24. saatte Cav-1 ekspresyonunu baskıladı.
- Tek başına ouabainin 24. saatte doza bağlı olarak sağladığı Cav-1 ekspresyonu artışında 48. saatte azalma oldu.
- 75 nM ouabain ve üzeri Cav-1 ekspresyonunu upregüle ederken; 2-DG ile beraber downregüle etmektedir.



Şekil 24. Cav-1 gen ekspresyon analiz grafiği

Şekil 25’de 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan CHOP gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

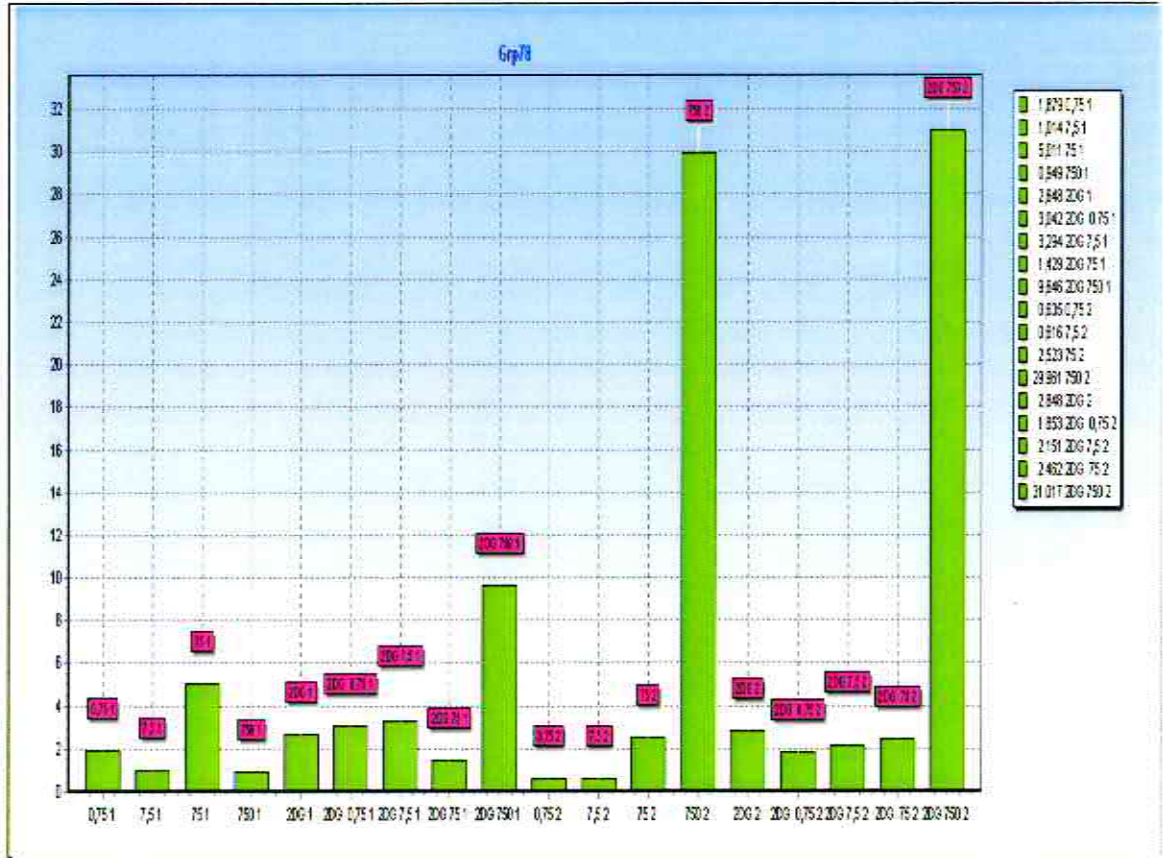
- 24. ve 48. saatlerde 0.75 nM ve 7.5 nM ouabain CHOP ekspresyonu üzerinde etkili değil.
- 24. ve 48. saatlerde 75 ve 750 nM ouabain doza bağlı olarak CHOP ekspresyonunu arttırdı.
- 2-DG tek başına CHOP ekspresyonunu 24. saatte 2 kat arttırdı.
- 2-DG ile tüm dozlardaki kombinasyonlarda CHOP inhibisyonu oldu ve 48. saatte de aynı etkiler mevcut.
- Ouabain, 7.5 nM’a kadar CHOP ekspresyonu üzerinde etkisiz; 75-750 nM düzeylerinde upregülasyona yol açtı (apoptoz).
- 2-DG, tek başına CHOP ekspresyonunu upregüle ederken; 75 nM’a kadar downregüle ediliyor (apoptoz azalması); 75 nM ouabain ile birlikte upregüle ediyor (apoptoz artışı).



Şekil 25. CHOPgen ekspresyon analiz grafiği

Şekil 26'da 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan Grp78 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

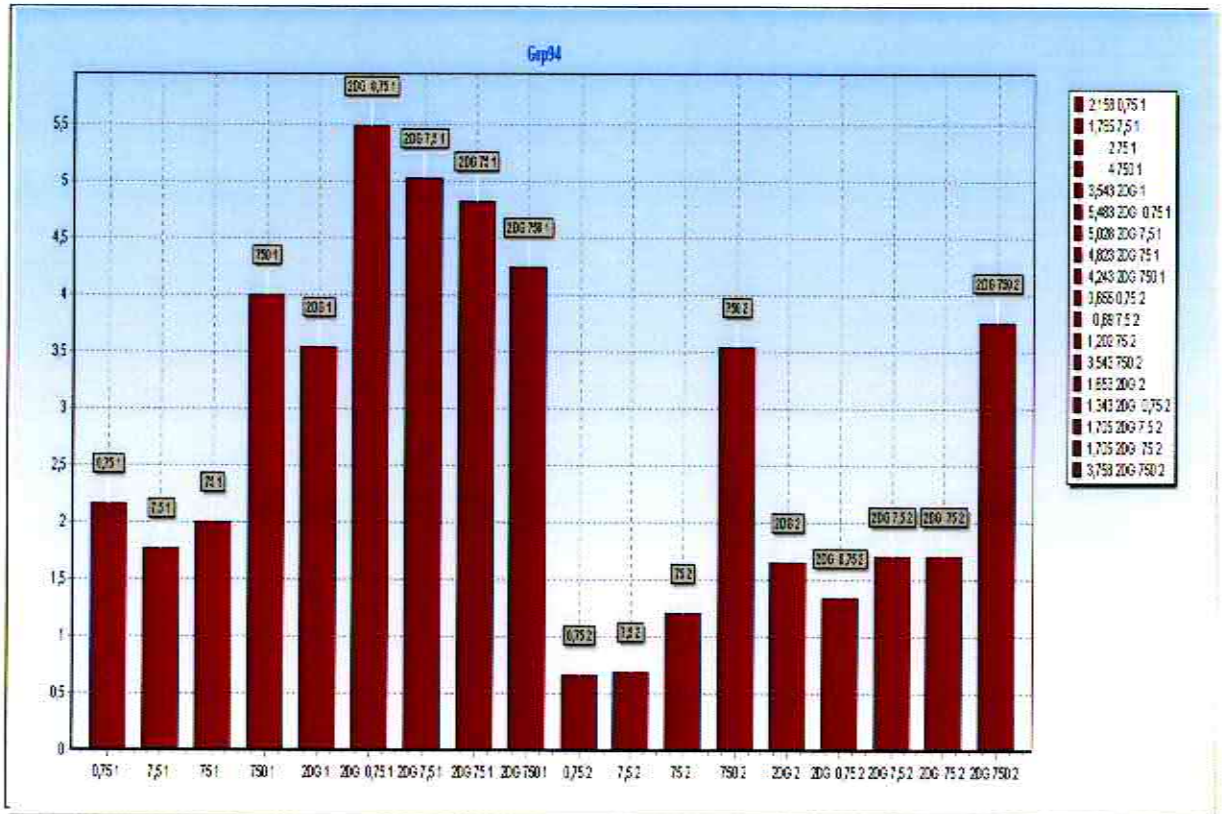
- 2-DG Grp78 ekspresyonunu arttırdı.
- 75 nM ouabain 24. Ve 48. saatte Grp78 ekspresyonunu arttırdı.
- 2-DG+75 nM ouabain Grp78 ekspresyonunu baskıladı.
- Tek başına 75 nM ouabainin etkisi ile 2-DG+75 nM ouabainin etkisi paradoks oluşturmaktadır.
- Ouabain, 2-DG ile birlikte verilirse Grp78 ekspresyonunu downregüle ediyor (maksimum etki 75 nM ouabain ile); 750 nM ouabain ile birlikte verildiğinde upregüle ediyor.



Şekil 26. Grp78 ekspresyon analiz grafiği

Şekil 27'de 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan Grp94 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

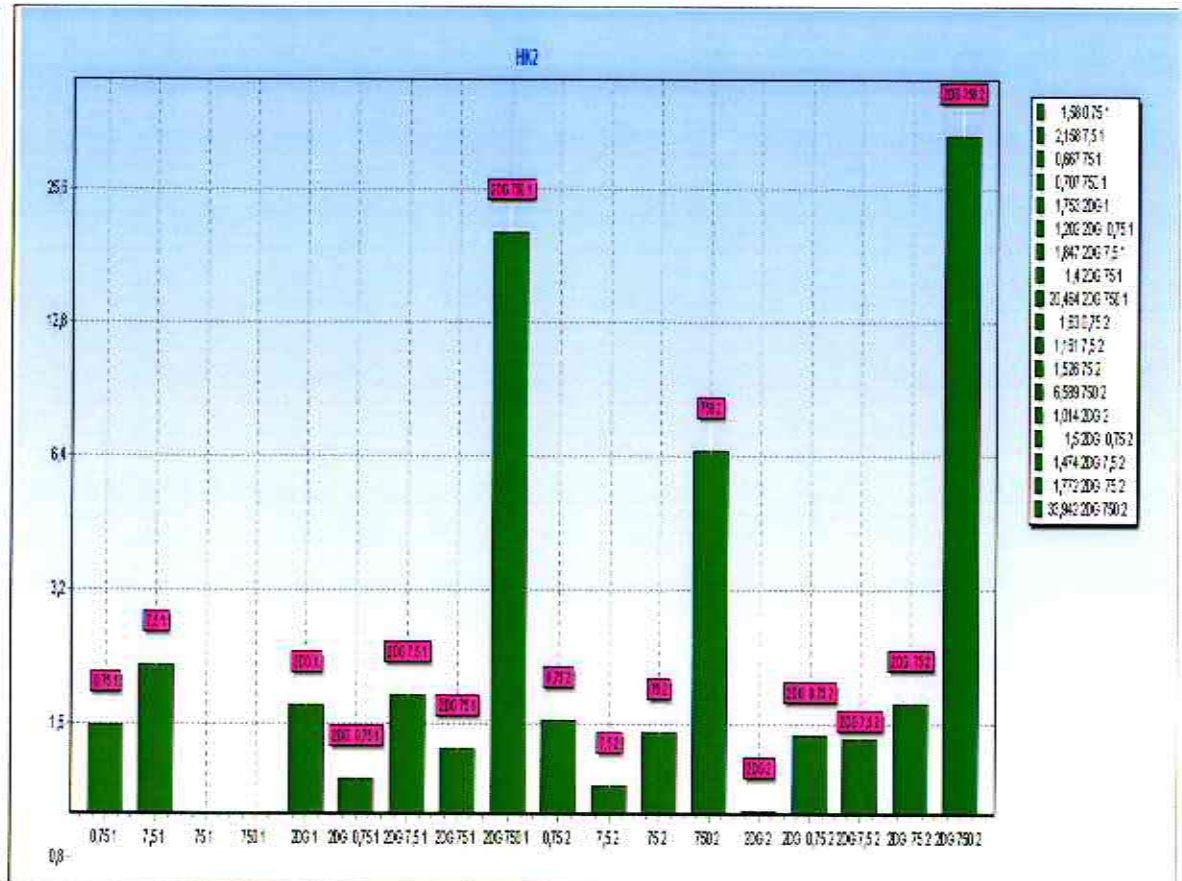
- 2-DG+0.75 nM ouabain birbirlerinin etkilerini artırıcı yönde aditif etkili.
- 2-DG+7.5 nM ouabain aditif etkili.
- 2-DG+75 nM ouabain aditif etkili.
- 48. saatte 750 nM ouabain ile Grp94 ekspresyonu arttı, diğer dozlarda artış gözlenmedi.
- 24. saatte tüm dozlarda Grp94 ekspresyonu arttı.
- 48. saatte, 2-DG+ouabain kombinasyonlarında 24. saate göre Grp94 ekspresyonunda azalma oldu.



Şekil 27. Grp94 ekspresyon analiz grafiği

Şekil 28'de 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan HKII gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

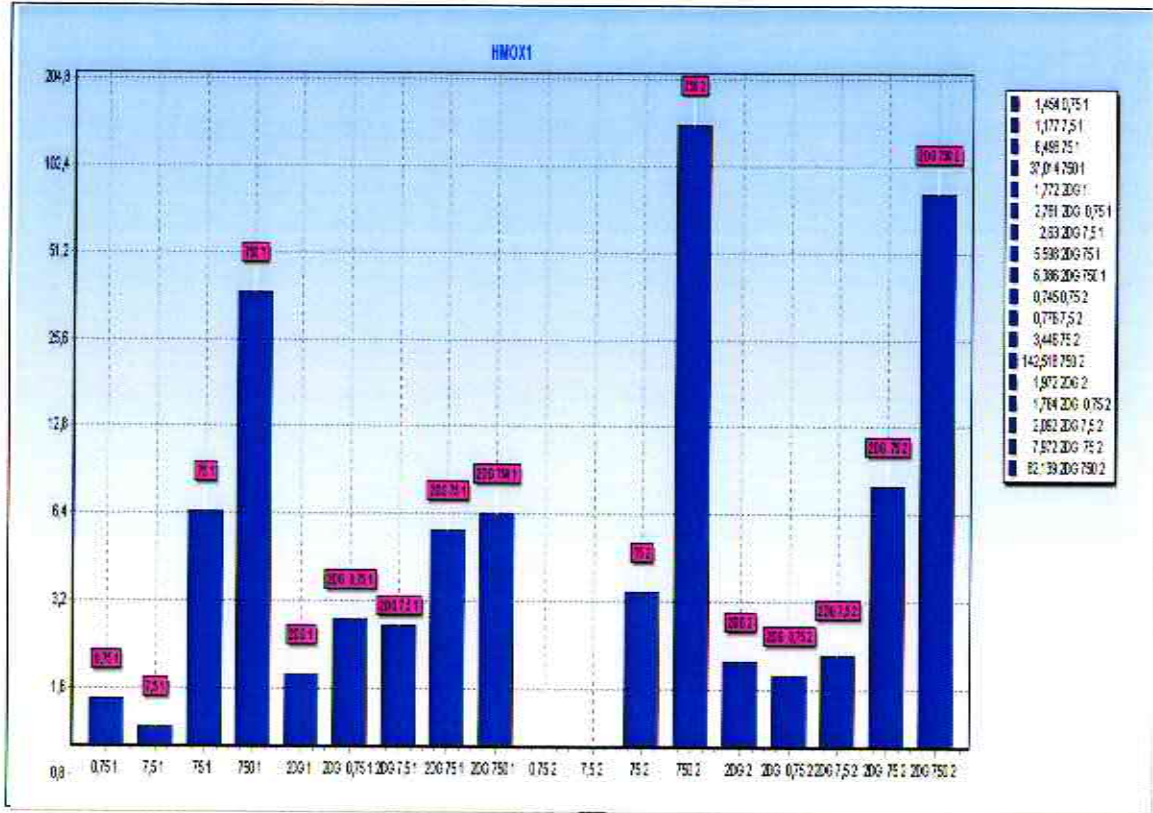
- 24. ve 48. saatte 0.75 nM ve 7.5 nM ouabain HKII ekspresyonunu arttırdı.
- 24. saatte 75 nM ve 750 nM ouabain ile HKII ekspresyonu kontrolün altında idi.
- 2-DG ile 24. saatte HKII ekspresyonu arttı.
- 2-DG+0.75 nM ouabain ve 2-DG+7.5 nM ouabain tek başına ouabaine göre HKII ekspresyonunu azalttı.
- 48. saatte 2-DG ile HKII ekspresyonu kontrolün altına indi.
- Ouabain doza bağlı olarak 7.5 nM'a kadar HKII ekspresyonunu artırırken; 75 nM ve üzeri azaltıyor (apoptoz artışı).
- 2-DG'nin HKII ekspresyonunu artırıcı etkisi 75 nM'a kadar baskılanırken; 750 nM'da baskı kalkıyor.



Şekil 28. HKII ekspresyon analiz grafiği

Şekil 29'da 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan HO-1 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

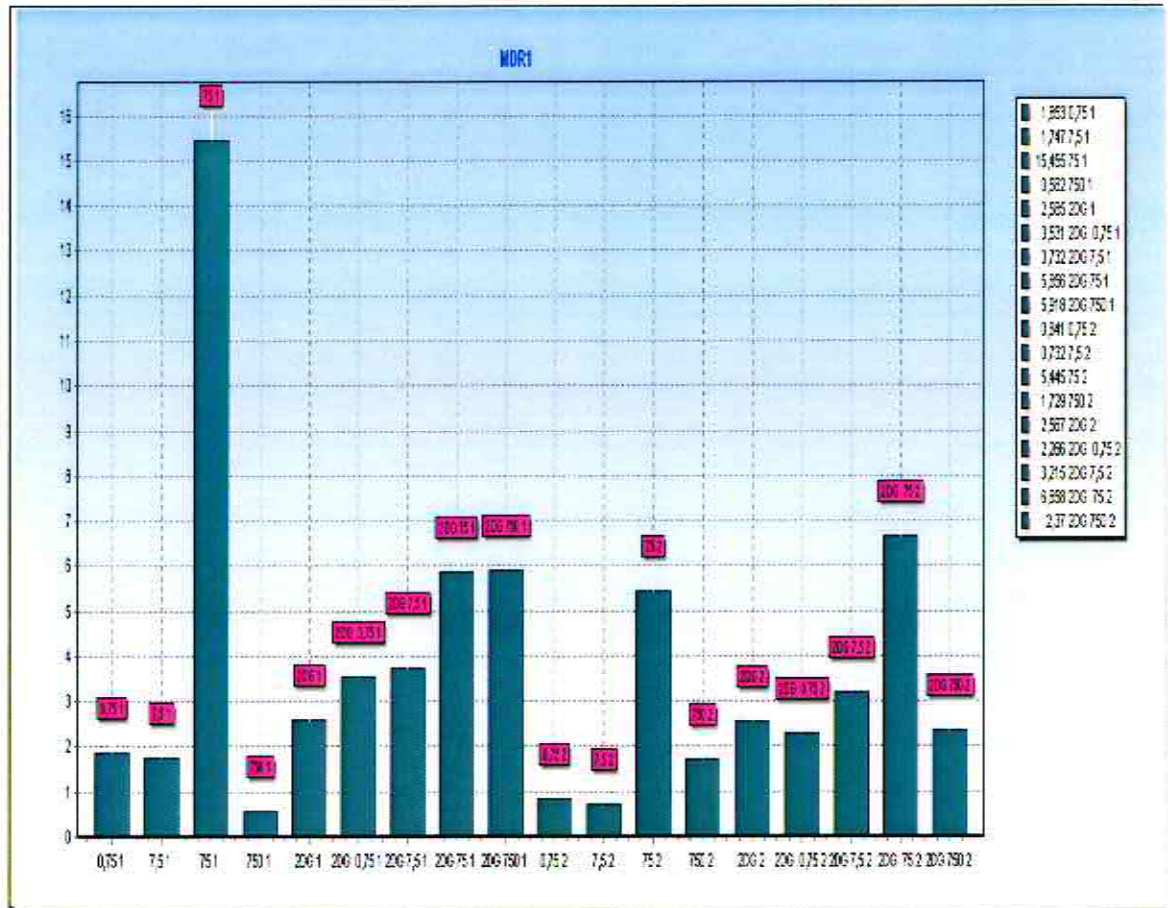
- 75 ve 750 nM ouabain 24. ve 48. saatte HO-1 ekspresyonunu arttırdı.
- 24. ve 48. saatte 0.75 ve 7.5 nM ouabain HO-1 ekspresyonunu arttırmadı.
- 2-DG ile 24. ve 48. saatte HO-1 ekspresyonu arttı.
- 24. saatte 2-DG+0.75 nM ouabain birbirlerinin etkilerini artırıcı yönde aditif etkili.
- 24. saatte 2-DG+7.5 nM ouabain aditif etkili.
- 24. saatte 2-DG+75 nM ouabain birbirlerinin etkilerini azaltıcı yönde inhibitör etkili.
- 24. saatte 2-DG+750 nM ouabain inhibitör etkili.
- 48. saatte 0.75 ve 7.5 nM ouabain ile HO-1 ekspresyonunda artış yok.



Şekil 29. HO-1 ekspresyon analiz grafiği

Şekil 30'da 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan MDR-1 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

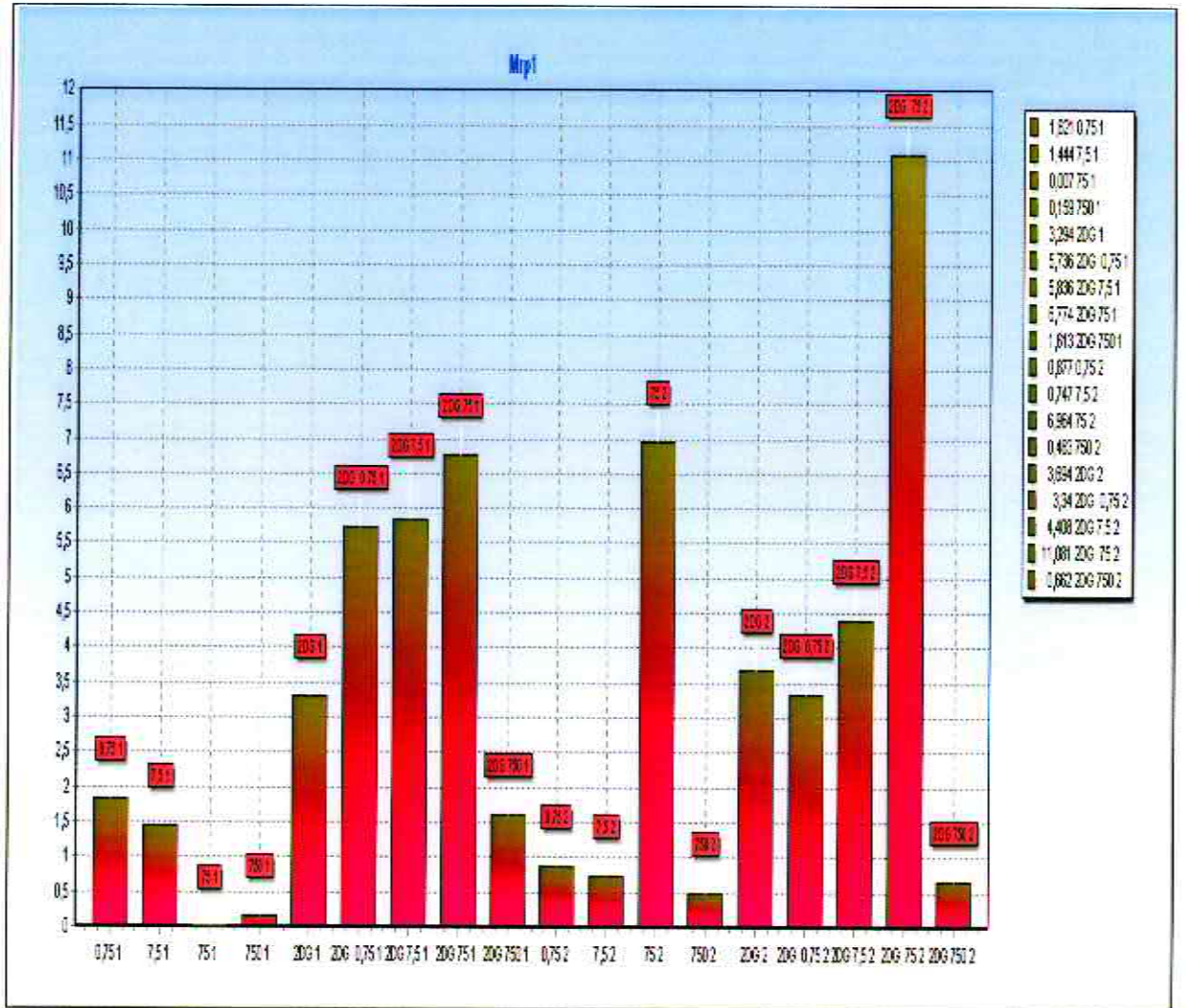
- 24. ve 48. saatte 75 nM ouabain ile MDR-1 ekspresyonu arttı.
- 24. ve 48. saatte 2-DG, MDR-1 ekspresyonunu 2.5 kat arttırdı.
- 2-DG+0.75 nM ouabain birbirlerinin etkilerini artırıcı yönde aditif etkili.
- 2-DG+7.5 nM ouabain aditif etkili.
- 2-DG+75 nM ouabain birbirlerinin etkilerini azaltıcı yönde inhibitör etkili.
- 48. saatte 0.75 nM ve 7.5 nM ouabain dozlarında MDR-1 ekspresyonu azaldı.



Şekil 30. MDR-1 ekspresyon analiz grafiği

Şekil 31’de 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan MRP-1 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

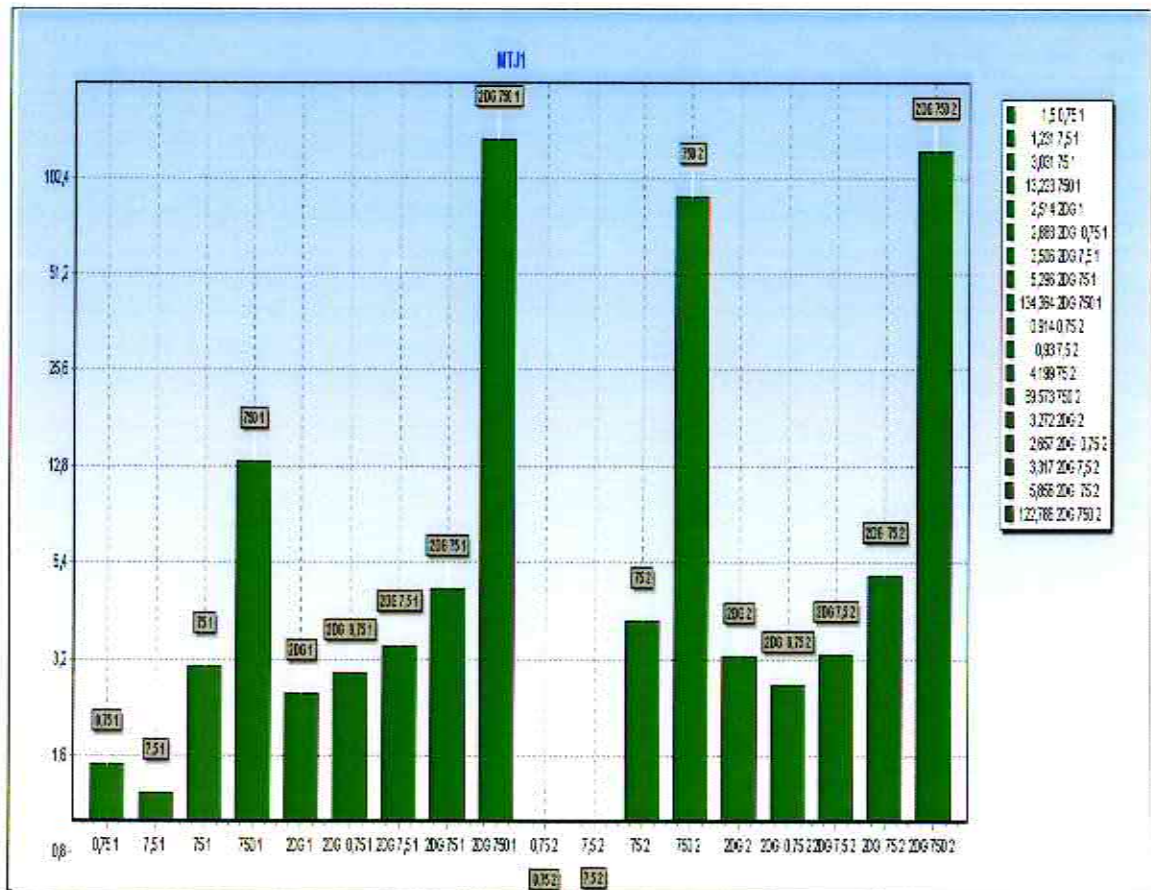
- 2-DG ile 24 ve 48 saatte MRP-1 gen ekspresyonu arttı.
- 2-DG ile 0.75 ve 7.5 nM ouabain beraber birbirlerinin etkilerini artırıcı yönde aditif etkili.



Şekil 31. MRP-1 ekspresyon analiz grafiği

Şekil 32’de 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan MTJ-1 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

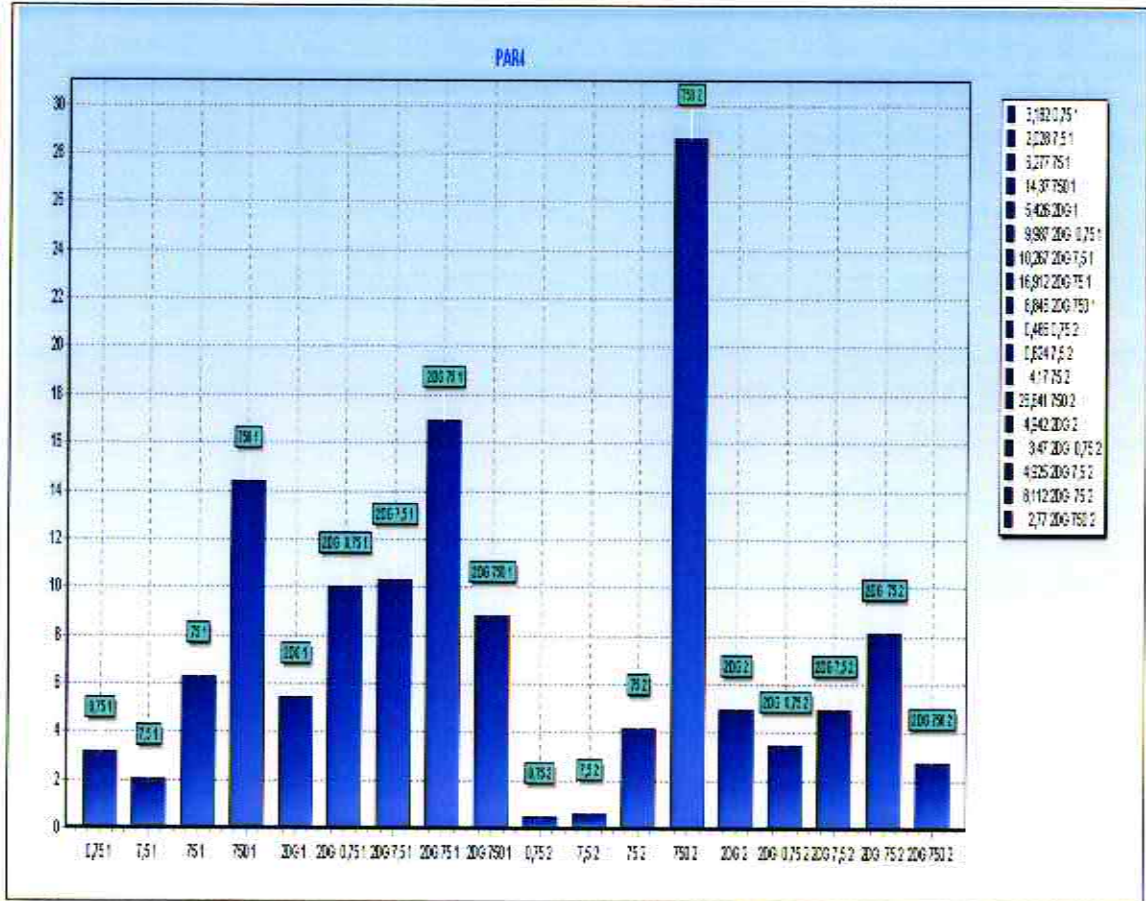
- 24. ve 48. saatte 2-DG ile MTJ-1 ekspresyonu arttı.
- 75 nM ouabain 24. ve 48. saatte MTJ-1 ekspresyonunu arttırdı.
- 24. saatte 2-DG+ouabain beraber birbirlerinin etkilerini artırıcı yönde aditif etkili.
- 48. saatte 0.75 ve 7.5 nM ouabain ile MTJ-1 ekspresyonu kontrolün altında idi.
- 48. saatte 2-DG+ouabain gruplarında 24. saate göre değişim görülmedi.



Şekil 32. MTJ-1 ekspresyon analiz grafiği

Şekil 33'de 24 ve 48 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan Par-4 gen ekspresyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

- 24. ve 48. saatte 2-DG ile Par-4 ekspresyonu arttı.
- Tüm ouabain dozlarında Par-4 ekspresyonu arttı.
- Kombine gruptaki Par-4 ekspresyonu tek başına ouabain dozlarına göre daha fazla arttı.

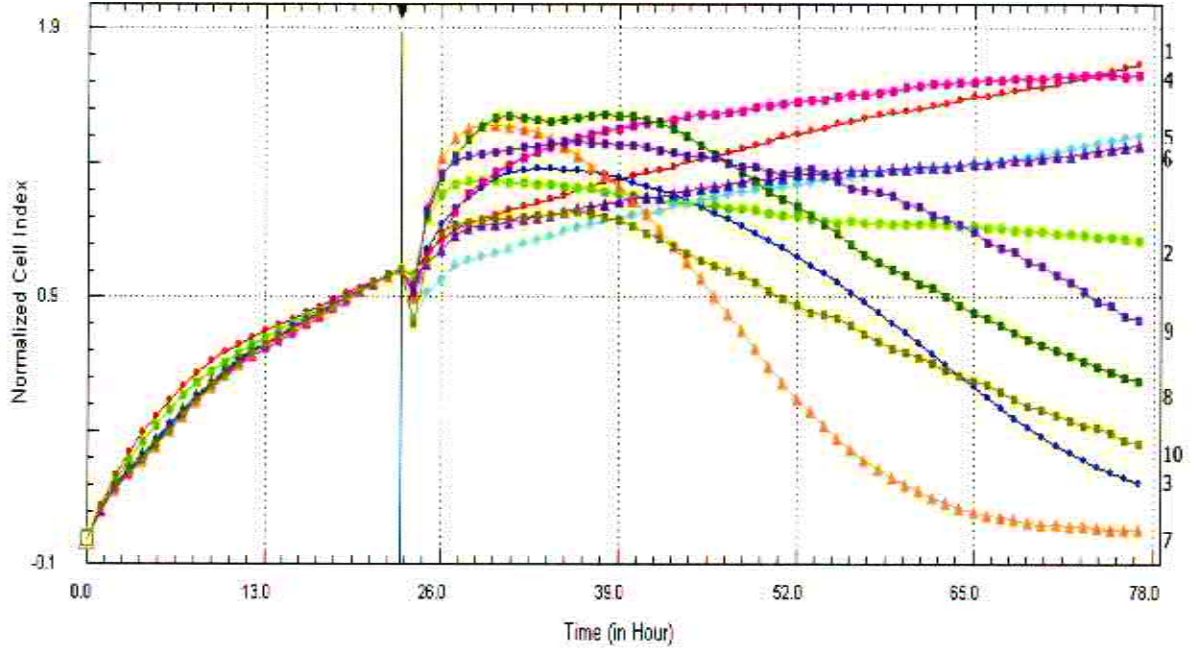


Şekil 33. Par-4 ekspresyon analiz grafiği

4.4 HEPG2 PROLİFERASYON VE CANLILIK ANALİZİ

Elektriksel impedans sinyaline dayalı hücre sayısını, canlılığını ve proliferasyonunu monitörize etmeye imkan veren xCELLigence real time hücre analiz sistemi ile 48 saat izlem yapıldı. 24. saatten itibaren kontrol grubu baz alınarak normalize edilmiş hücre indeks değerlerinin zamana karşı grafiği şekil 34'de görülmektedir.

- Tek başına 75, 7.5 ve 0.75 nM ouabain ile sitotoksik etki görülmedi (sırasıyla slope değerleri 0.010, 0.009, 0.007).
- 750, 75, 7.5 ve 0.75 nM ouabain ile 2-DG'nin kombine olduğu gruplarda hücre canlılığı azaldı (sırasıyla slope değerleri -0.033, -0.017, -0.008, -0.016).
- Tek başına 750 nM ouabain sitotoksik etki gösterdi (slope -0.021).



Şekil 34. HepG2 proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği

- 1) Kontrol
- 2) 10 mM 2-deoksiglukoz
- 3) 750 nM ouabain
- 4) 75 nM ouabain
- 5) 7.5 nM ouabain
- 6) 0.75 nM ouabain
- 7) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 750 nM ouabain
- 8) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 75 nM ouabain
- 9) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 7.5 nM ouabain
- 10) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 0.75 nM ouabain

4.5 RESTRİKSİYON FRAGMANI BOYUT POLİMORFİZMİ (RFLP) SONUÇLARI

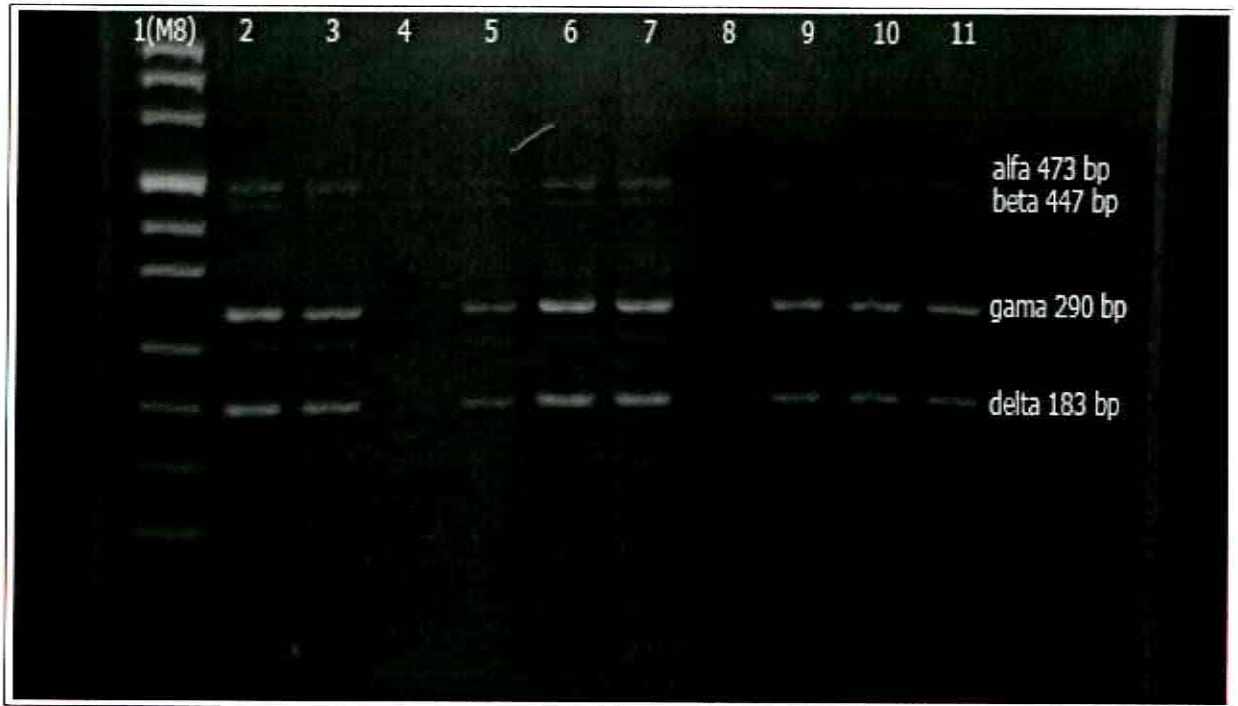
DNA'yı özgül tanıma dizilerinden kesen restriksiyon enzimleri, bu özellikleri nedeniyle moleküler genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA'nın bu enzimlerle kesilmesi ya da kesilmemesi sonucunda oluşan farklı uzunluktaki DNA fragmentlerinin incelenmesi yöntemine RFLP analizi adı verilmektedir. Polimorfizm belirlemede sık kullanılan RFLP yönteminde PCR ile çoğaltılan DNA uygun restriksiyon enzimi ile kesilir. Jelde yürütülüp EtBr ile boyanarak fragmentler görünür hale getirilir (28).

Çalışmamızda IRE1 α aktivitesini değerlendirmek amacı ile PstI enzimi ile 5'...C T G C A G...3' 3'...G A C G T C...5' bölgelerinden kesilen fragmentler jel üzerinde fotoğraflandı ve uzunlukları standart marker (M-8) yardımıyla belirlendi. Şekil 35 ve 36'daki 1-11 sütun sayıları sırasıyla M-8, kontrol, 2-DG, 750, 75, 7.5, 0.75 ouabain, 2-DG+750, 2-DG+75, 2-DG+7.5, 2-DG+0.75 ouabaini göstermektedir.

4.5.1 XBP-1 PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi



Şekil 35. 24. saat XBP-1 PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi



Şekil 36. 48. saat XBP-1 PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi

4.5.2 Genotiplendirme

Tablo XVIII. XBP-1 mRNA genotiplendirilmesi

XBP-1 mRNA Genotip	XBP-1 mRNA uzunluğu	PstI ile kesim	Yorum
Unspliced	473 bp	290/183 bp	ER stres cevabı yok, IRE1α inaktif
Spliced	447 bp	----	ER stres cevabı var, IRE1α aktif

4.5.3 Dansitometrik jel analizi

TotalLab TL100 jel analiz programı kullanılarak alfa (473 bp), beta (447 bp), gama (290 bp) ve delta (183 bp) bantlarının dansite analizi yapıldı.

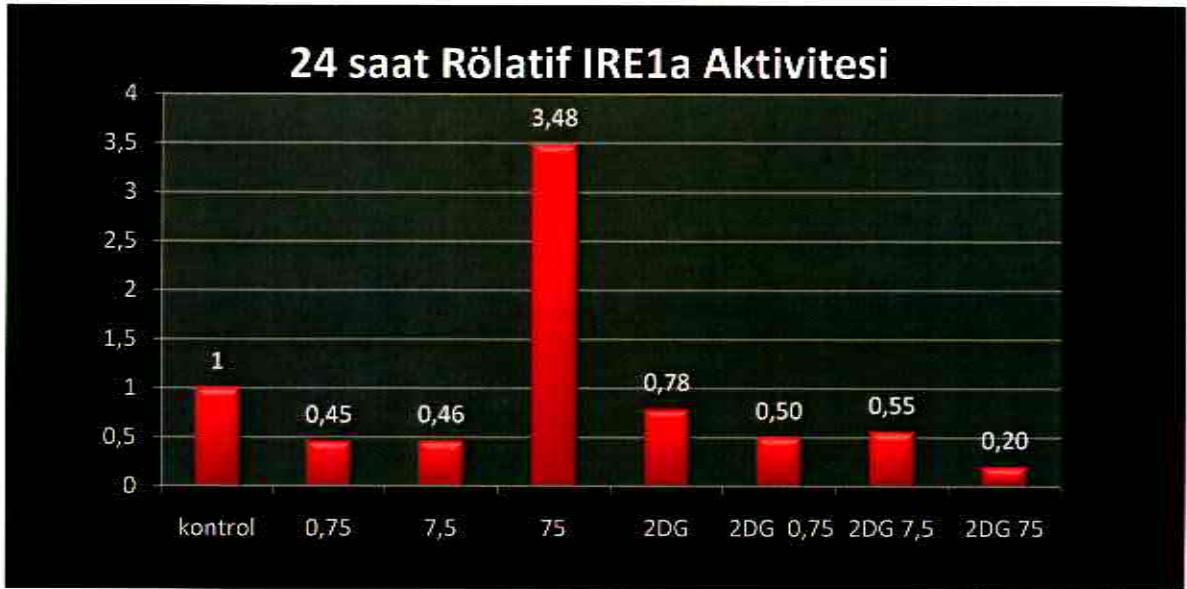
Tablo XIX. PCR-RFLP ürünlerinin dansitometrik jel analiz sonuçları

		24. saat piksel volüm	48. saat piksel volüm
Sütun1 Marker 8			
Sütun2 Kontrol	Alfa	66444,62	11937,81
	Beta	18796,88	3741,31
	Gama	125759,20	35634,56
	Delta	91130,00	28373,00
	Alfa+gama+delta	283333,8	75945,37
	Beta/alfa+gama+delta	0,066342	0,049263
Sütun3 2-DG	Alfa	23615,30	7456,43
	Beta	9005,15	2115,48
	Gama	85513,19	25616,12
	Delta	63877,98	24154,69
	Alfa+gama+delta	173006,5	57227,24
	Beta/alfa+gama+delta	0,052051	0,036966
Sütun4 750 nM oubain	----	----	----
Sütun5 75 nM oubain	Alfa	6288,29	2950,66
	Beta	8348,91	1497,29
	Gama	12570,44	12113,12
	Delta	17284,13	11985,85
	Alfa+gama+delta	36142,86	27049,63
	Beta/alfa+gama+delta	0,230997	0,055353
Sütun6 7.5 nM oubain	Alfa	17999,51	7583,00
	Beta	6589,49	1796,00
	Gama	111150,44	40848,56
	Delta	87191,00	33907,80
	Alfa+gama+delta	216341	82339,36
	Beta/alfa+gama+delta	0,030459	0,021812
Sütun7 0.75 nM oubain	Alfa	7922,74	7109,36
	Beta	4234,33	1643,00
	Gama	72449,25	38994,00
	Delta	60078,43	30279,14
	Alfa+gama+delta	140450,4	76382,5
	Beta/alfa+gama+delta	0,030148	0,02151
Sütun8 2DG+750 nM oubain	-----	-----	-----
Sütun9 2DG+75 nM oubain	Alfa	4133,42	1901,20
	Beta	1565,25	317,5
	Gama	65066,31	25574,5
	Delta	50269,67	18918,14
	Alfa+gama+delta	119469,4	46393,84
	Beta/alfa+gama+delta	0,013102	0,006844
Sütun10 2DG+7.5 nM oubain	Alfa	10574,19	3949,24
	Beta	4205,60	676
	Gama	57032,17	26053,00
	Delta	47344,76	21693,51
	Alfa+gama+delta	114951,1	51695,75
	Beta/alfa+gama+delta	0,036586	0,013077
Sütun11 2DG+0.75nMoubain	Alfa	13321,96	2784,31
	Beta	4371,50	481,5
	Gama	67216,65	23395,88
	Delta	51834,92	20452,41
	Alfa+gama+delta	132373,5	46632,6
	Beta/alfa+gama+delta	0,033024	0,010325

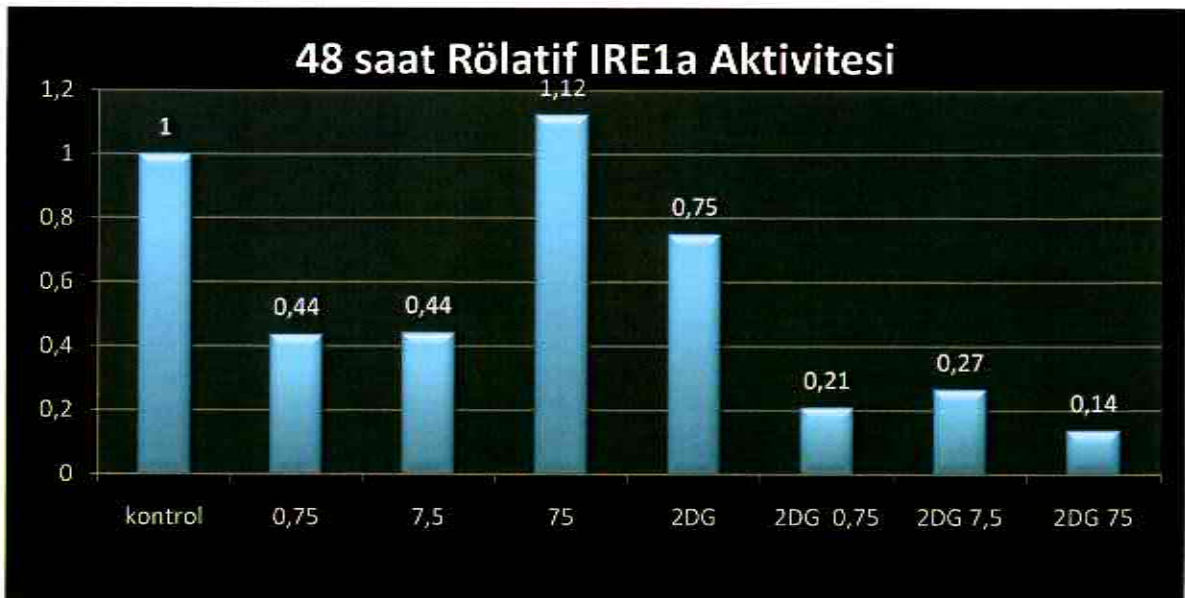
4.5.4 Rölatif IRE1  aktivitesi tayini

Şekil 37 ve 38’de x ekseninde isimleri yer alan ilaç gruplarının rölatif IRE1  aktivitesi beta/alfa+gama+delta değeri kontrole oranlanarak kontrolün katı şeklinde belirlendi. Kontrolün 1.2 katı değişiklik anlamlı olarak değerlendirildi.

- 75 nM ouabain IRE1  aktivitesini 24. saatte 3.48 kat arttırdı.
- 24. saatte diğer tüm dozlarda IRE1  aktivitesi kontrolün altında idi.
- 24. saatte 2-DG+75 nM ouabain IRE1  aktivitesini azalttı.
- 48. saatte IRE1  aktivitesinde kontrole göre anlamlı artış gözlenmedi.



Şekil 37. Kontrol grubuna oranlı 24. saat rölatif IRE1  aktivitesi analiz grafiği



Şekil 38. Kontrol grubuna oranlı 48. saat Rölatif IRE1  aktivitesi analizi grafiği

5. TARTIŞMA

Enfeksiyöz ajanlar, çevresel toksinler ve metabolik koşullar gibi çeşitli nedenlerle ER’de protein katlanma bozulması strese neden olmaktadır. ER stresine cevap olarak adaptif yolları içeren spesifik UPR sinyal yolları aktiflenmektedir. ER stres sensörleri olarak bilinen üç ER transmembran proteini PERK, IRE1 ve ATF6’dır. Bu sensörlerin aktivasyonu, ER protein katlanma aktivitesini arttıran ve protein agregasyonunu önleyen Grp78 gibi şaperon proteinleri kodlayan genlerde upregülasyon ile sonuçlanmaktadır. Nihayet, ER fonksiyonu ciddi biçimde bozulmuş olduğunda apoptoz uyarılmaktadır. Bu apoptotik olay proapoptotik transkripsiyon faktörü GADD153 aktivasyonu ve/veya ER-ilişkili kaspaz-12 aktivasyonu ile tetiklenmektedir (78). Hücre yaşam ve ölümünü düzenlemede UPR’nin merkezi rolü göz önüne alındığında mekanizmaların daha iyi anlaşılması için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır (87). CHOP, Grp78, Grp94, XBP-1, MTJ-1 ve HO-1 UPR’yi en iyi gösteren parametrelerin başında gelmektedir. Hücredeki strese cevap bu genlerin ekspresyonlarının tespiti ile belirlenebilmektedir.

ER membranına bağlı IRE1 enzimi, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin artması veya ER kalsiyum konsantrasyonunun azalması devam ettiğinde veya redoks potansiyeli ile aktive edilmektedir. ER stresi belirlemede önemli olan IRE1 aktivitesi, XBP-1 mRNA’nın kırılma düzeyinin belirlenmesi ile değerlendirilebilmektedir (52). Prostat kanser hücrelerinde (PC-12) 24.5 mM 2-DG ile XBP-1s ve Grp78 artışı olduğu gösterilmiştir (61). Çalışmamızda tek başına 10 mM 2-DG uyguladığımız grupta Grp78 ekspresyonunda 24. saatte kontrole göre 2.6 kat ve 48. saatte 2.8 kat artış tespit edildi. 75 nM ouabain içeren grupta IRE1α aktivite artışı tespit edildi.

Glukoz açlığı, iskemi ve kanser ile ilişkili fizyolojik bir hücre durumudur. Kötü vaskülarize solid tümör hücrelerinde, sürekli ya da aralıklı olarak hipoksinin yanı sıra glukoz yoksunluğu mevcuttur. Glukoz açlığı ER’de protein katlanmasını bozarak UPR’yi aktive etmektedir (95). Çalışmamızda 2-DG solid tümörlerin merkezi bölgesindeki hipoglisemik koşulları sağlayıcı ve UPR uyarıcı ajan olarak kullanıldı. Yapılan çalışmalarda 2-DG’nin hücrelerde glukoz açlığı oluşturup N-glikozilasyonu bozarak ER stresini ve UPR’yi aktiflediği gösterilmiştir (55, 107). Farklı hücre modelleri ile yapılan çalışmalarda 2-DG’nin UPR sinyal yolunu aktiflediği tesbit edilmiştir. Örneğin; 2-DG veya glukoz açlığının UPR cevabını ve Grp78’i mRNA

düzeyinde transkripsiyonel olarak aktive ettiği, ATF4 proteinini ve mRNA'sını upregüle ettiği gösterilmiştir (133). Meme kanser hücresi (SKBR3) ve pankreas tümör hücrelerinde (1420) 4 mmol/L 2-DG normoksik koşullarda glikoliz inhibisyon yeteneğinden bağımsız olarak toksik etki göstermiştir. N-glikozilasyonu bozarak UPR genleri Grp78, Grp94, CHOP upregülasyonuna yol açmıştır (63). 20 mM 2-DG ile glukoz deprivasyonu oluşturulan HT-29 insan kolon kanser, HT1080 fibrosarkoma ve MKN74 mide kanser hücrelerinde UPR uyarılmıştır ve Grp78 transkripsiyonunu promotor bölgeden inhibe eden makrosiklik bileşik Versipelostatin ile UPR hedef gen ekspresyonları inhibe edilmiştir (95). Literatürde hepatoselüler karsinom (HCC) hücre hattında glukoz deprivasyonunda UPR gen ekspresyonunun çalışıldığı yayınlar mevcuttur (7, 66). Çalışmamızda kullanılan 2-DG dozu literatür esas alınarak belirlendi (42). Tek başına 2-DG uyguladığımız grupta literatüre paralel olarak UPR aktivasyonu belirlendi. Kanser hücresinde var olan ER stresi daha da artırdığı UPR gen ekspresyonlarındaki artış ile tesbit edildi. 2-DG farklı zamanlarda ve dozlarda ouabain ile kombine uygulandığında hücrenin apoptoza gittiği gözlemlendi. Milimolar konsantrasyon aralığında, 2-DG özellikle de mitokondriyal solunum defektleri olan kanser hücrelerinde veya hipoksik çevredeki hücrelerde ATP tükenmesine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (23). BMG-1 insan glioma hücrelerinde kısa süreli (2-4 saat) 5 mM 2-DG uygulaması önemli derecede ROS artışı ve apoptoza neden olurken uzun süreli uygulamalar MDR-1 artışı ve ilaç direnci sağlamıştır. Glukoz açlığının oksidatif stresi uyatarak genomik instabiliteye ve DNA hasarına yol açtığı iddia edilmektedir (57). Çalışmamızda ilaç direnci ile ilgili olan MDR-1 ve MRP-1 gen ekspresyonlarını araştırdık. 2-DG ile MDR-1 ekspresyonunda 24. ve 48. saatte kontrole göre 2.5 kat artış, MRP-1 ekspresyonunda 24. saatte kontrole göre 3.2 kat ve 48. saatte 3.6 kat artış belirlendi. Özellikle 48. saatteki artış zaman ilerledikçe 2-DG'ye karşı direnç geliştiğini göstermektedir. MDR-1 kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir (128). İnsan HCC'de MDR-1 gen ekspresyonunun doksorubisine direnç oluşturduğu gösterilmiştir (96). Pediyatrik ALL hastalarında P-gp ilaca direnç oluşturur (118). MRP-1 daha fazla olmak üzere MDR-1'in HCC'de aşırı eksprese olduğu bulunmuştur (15). Sıçan hepatoma hücre hattında (Fao) glukoz içermeyen medyum koşullarında zamana bağlı olarak P-gp mRNA ve protein düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Bu etki ROS ile uyarılan ER stres cevabı ve c-Jun/AP-1 aracılığı ile oluşan transkripsiyonel MDR indüksiyonu ile olmaktadır. P-gp

artışı UPR'yi uyaran bozuk protein N-glikozilasyonu ile ilişkilidir (66). Çoklu ilaç direnç gelişimi neoplastik hastalıkların kemoterapi başarısına büyük bir engeldir (17).

Na^+/K^+ -ATPaz pompası, ouabain için bir sinyal iletilici reseptör olarak görev yapmaktadır (124). Ouabainin pompaya bağlanması kardiyak miyositlerde ve diğer hücre tiplerinde birden fazla sinyal iletim yolunu aktive ederek birçok genin transkripsiyon ve translasyonunu düzenlemektedir (124). Na^+/K^+ -ATPaz pompasının ouabain tarafından inhibisyonu intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonu artışına neden olmaktadır (4). Kanser hücrelerinin ouabainle muamele edilmesinin apoptotik hücre ölümüne aracılık ettiği gösterilmiştir. Ouabain glioma gibi kanser türlerine karşı NF- κ B aktivasyonunu bastırma, apoptozis indüksiyonu ve sitotoksik ilaçların proapoptotik etkilerini artırma gibi in vitro anti-tümör aktivite göstermiştir (131). İnsan prostat adenokarsinom PC-3 hücrelerinde 3 nmol/L ouabain mitokondrial membran potansiyelinde azalmaya ve apoptoza neden olmuştur (45). Yapılan literatür araştırmasında ouabain ile UPR gen (Grp78, Grp94, MTJ-1, HO-1, CHOP, XBP-1) ekspresyonları arasındaki ilişkiyi araştırarak herhangi bir yayına tarafımızca rastlanmadı. Çalışmamızda tek başına ouabain içeren gruplarda hücre ölümü görülmedi (750 nM ouabain içeren grup hariç).

HUAEC hücrelerinde 1-10 nmol/L ouabain mitojen aktive protein kinaz (MAPK) fosforilasyonunu ve hücre büyümesini uyarmıştır. 5 nmol/L ouabain daha yüksek derecede proliferasyon sağlamıştır (108, 45). 1 nmol/L ouabain ile muamele edilen insan ve köpek kaynaklı primer vasküler düz kas hücrelerinin maksimum çoğaldığı gösterilmiştir, aynı konsantrasyonda ouabainin primer sıçan böbrek epitel hücrelerinde de maksimal büyüme stimülasyonu yaptığı bulunmuştur. Ouabainin 0.1 nmol/L dozunda bile insan primer prostat düz kas hücrelerinin maksimum çoğaldığı bulunmuştur. Ouabain proliferatif ve hipertrofik etkisini Ras/Raf/MEK/ERK kaskadını aktive ederek gerçekleştirir (45). p42/44 MAPK yolunu aktive ederek proliferatif etki yaptığı Maloney ve ark. tarafından sıçan epitelyum hücrelerinde gösterilmiştir (25). Domuz renal epitel hücrelerinde (LLC-PK1) ouabainin birçok sinyal kaskadını aktive ettiği gösterilmiştir (124).

Ouabainin hücre farklılaşması üzerine olan etkilerinin moleküler mekanizması ayrıntılı olarak kalp kasında Xie ve ark. tarafından çalışılmıştır (129). Terapötik konsantrasyonlarda ouabain kas hücre büyümesini ve c-fos, c-jun ve Ras gibi Ca^{2+}

bağımlı ekspresyonu olan erken yanıt genlerinin ve kardiyak hipertrofide rol alan p42/44 MAPK proteininin biyosentezini uyarmaktadır. Sıçanlarda böbrek epitel hücrelerinde düşük frekanslı intraselüler kalsiyum salınımına ve transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açmaktadır (129). İnsan prostat düz kas hücrelerinde 0,01-1 nM düşük doz ouabain, kalsiyum bağımlı MEK-p42/44 MAPK yolunu aktive ederek proliferatif etki göstermiştir. 10 nM ve üzeri yüksek doz ouabain, kaspaz-3 aktivasyonu ile sitotoksik etki oluşturup apoptozu uyarmıştır. 10 ve 100 nM ouabain LDH salınımını ve hücre nekrozunu uyarmıştır (25). 0.1-1 nM ouabain insan umbilikal ven düz kas hücrelerinde Src, ERK1/2 sinyal yolu ve epidermal büyüme faktörü reseptörü ile proliferasyonu uyarmaktadır (1). Kültüre böbrek proksimal tübül hücrelerinde 10 nM ouabain ERK ve Akt fosforilasyonu ile hücre proliferasyonunu uyarır (58). Çalışmamızda düşük dozlarda ouabain proliferasyonu sağlarken 750 nM ouabain sitotoksik etki yaptı. Ouabain doza bağlı olarak hem proliferatif hem de apoptotik etki gösterebilmektedir (25). Düz kas, HeLa ve nöroblastom hücrelerinde, ouabainin apoptozu uyardığı buna karşılık LLC-PK1 ve böbrek hücrelerinde antiapoptotik etkisi olduğu ve sıçan böbrek proksimal tübül hücrelerinde serum yoksunluğu ile uyarılan apoptozu önlediği gösterilmiştir. Ouabainin bu etkilerinin muhtemelen hücre tipi, dozu, maruz kalma süresi ve pompa izoformları gibi diğer faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (65). Androjen bağımsız prostat kanseri PC-3 hücresinde 10 nM'dan az ouabain 7 saatlik uygulamada mitokondriyal aktiviteyi azaltmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda ouabain 2 saatlik uygulamada mitokondriyal fonksiyonu hızla düşürmüş ve ROS artışı ile apoptotik reaksiyonu uyarmıştır (51). Ouabainin HepG2 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği, hücre apoptozunu indüklediği, hücre döngüsü S fazı arresti oluşturduğu ve Na⁺/K⁺-ATPaz α 1 altbirim siRNA'sının hücre içi Ca²⁺ ve ROS artışı üzerinden HepG2 hücre apoptozunu indükleyip ouabainin antikanser etkisini artırabildiği gösterilmiştir. İnsan HCC hücrelerinde Na⁺/K⁺-ATPaz α 1 altbirimi hedeflenmesi HCC tedavisinde yeni bir bakış açısı sağlayabilecektir (131).

Grp78 tümör proliferasyonu, sağkalım, metastaz ve çeşitli tedavilere direnç sağlamaktadır. Böylece, Grp78 ekspresyonu tümör davranışı ve tedaviye yanıt için bir belirteç olarak hizmet edebilmektedir (67). Grp78 ekspresyonunu bastırıcı tedavi kombinasyonları rezidüel tümörlerin ortadan kaldırılması yönünde bir yaklaşım

sunabilmektedir (67). Benign dokulara kıyasla primer malign tümörlerin Grp78 ekspresyon düzeyi oldukça yüksektir. Grp78 ekspresyon artışı akciğer, meme, melanom, prostat, hepatoselüler kanser ve mide kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarında çalışılmıştır (94, 125). Son zamanlarda özefagus, akciğer, prostat kanserleri ve melanomda çeşitli klinikopatolojik parametreler ile Grp78 ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon bulunmuştur (94). Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde ouabain içeren gruplarda UPR'nin hem apoptotik CHOP sinyalizasyonu hem de adaptif Grp94, Grp78 sinyalizasyonu aktif olarak bulundu. Çalışmamızda bütün gruplarda Grp78 ve onun ko-şaperonu MTJ-1 gen ekspresyonlarının birbirine paralel seyrettiği görüldü. Tek başına 75 nM ouabain uyguladığımız grupta Cav-1, MDR-1, CHOP, Grp78 ve IRE1 α aktivite artışı belirlendi. Yine paralel olarak hücre canlılığının sürdüğünü tespit edildi. 0.75 ve 7.5 nM düşük ouabain dozlarında CHOP artışı yoktu ve hücre canlılığı devam etti. 2-DG ile kombine tüm ouabain dozlarında CHOP inhibisyonu oldu. CHOP proapoptotik transkripsiyon faktörü olmasının ötesinde strese adaptif ya da uyumsuz cevapların medyatörü olarak ve hücreye özel bakış açısı ile değerlendirilmelidir. CHOP ekspresyonu schwann hücrelerinde hücre ölümü yokluğunda demiyelinizasyonu sağlarken oligodendrositlerde ölüme karşı hücreyi korumaktadır (38).

Kanser hücrelerinde Grp94 overekspresyonu antiapoptotik fonksiyonları ile kanser progresyonuna ve ilaç direncine öncülük etmektedir. Birçok kanser hücre hattı, solid tümör ve kanser biyopsi çalışmalarında artmış Grp78/Grp94 seviyeleri ile malignensi arasında ilişki tespit edilmiştir. Meme kanser hücrelerinde Grp94 overekspresyonu ile kötü prognoz ilişkisi rapor edilmiştir (32). Çalışmamızda 24. saatte tüm dozlarda Grp94 ekspresyonunun arttığını ve kombine dozlarda ise artışın daha fazla olduğunu bulduk. Grp94, Grp78 ile ortak regülatör domain sayesinde aynı transaktivasyon faktörleri tarafından tanınır. HeLa hücrelerinde Grp78 siRNA'sının Grp94 upregülasyonuna yol açması Grp78 yokluğunda Grp94'ün kompenzasyonel özellikte olduğu iddiasını gündeme getirmektedir (135).

Cole ve ark. doksorubisine dirençli küçük hücreli akciğer kanser hücre hattında (H69AR) MRP-1 izole etmişlerdir (118). Multidrug dirençli hepatoma hücre hattı HepG2/ADR enjekte edilen farelerde in vivo MDR-1 mRNA'da kontrole göre 20.1 kat artış olduğu ve protein düzeyinin de yükseldiği gösterilmiştir (117). Digoksin ve

ouabainin insan kolon (HT-29) ve karaciğer kanser (HepG2) hücrelerinde P-gp ekspresyonunu artırdığı, bu artışın HIF-1 ve kalmodulin kinazII aktivasyonu ile korele olduğu tespit edilmiştir (106). Çalışmamızda 75 nM ouabain ile MDR-1 ekspresyonu 15.4 kat artıp ilaç direnci oluştururken 2-DG ile kombine edildiğinde direnç azaldı. Tümör sferoitlerinde etoposid ile 2-DG'nin birlikte P-gp düzeylerini azalttığı ve oksidatif stresin P-gp yıkımını uyardığı bildirilmiştir (29). İnsan pulmoner karsinoma hücre hattında (Calu-3) submikromolar konsantrasyonlarda (0,1-0,5 μ M) ouabain uygulanan hücrelerde 24 saat içinde MDR-1 gen ekspresyonunun uyarıldığı ve P-gp sentezinin arttığı tespit edilmiştir, ouabainin uyardığı MDR-1 ekspresyon artışı Calu-3 hücreleri ile sınırlı olmayıp insan kolon karsinoma hücreleri (T-84 ve HT-29) ve hepatik karsinom hücrelerinde (HuH7) de aynı etki görülmüştür, ayrıca ouabain Calu-3 hücrelerinde doxorubicin ve vinblastin direnç gelişimine neden olmuştur. (17)

Par-4, farklı hücrelerin sitoplazma ve nükleusunda bulunan ve sekrete edilebilen pro-apoptotik bir faktör olarak tanımlanmaktadır (41). Çoğu kanser hücresinde Par-4'ün overekspresyonu apoptozu tetiklemektedir. Par-4'ün antikanser fonksiyonunda iki farklı mekanizma söz konusudur. Bunlardan bir tanesi Fas/FasL reseptör yolu ile apoptozu tetiklemek, diğeri ise pro-survival faktör olan NF-kB yolunu inhibe etmektir (18). Huang ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada androjen bağımsız PC-3 hücrelerinde ouabain doz ve süreye bağımlı olarak sitotoksisteyi uyarmıştır; düşük doz ouabain (<10 nM) mitokondriyal aktiviteyi azaltmıştır, Par-4 ekspresyonunu artırmıştır ve sitotoksiste duyarlılığı yapmıştır. Yüksek dozda (>300 nM) zamana bağlı olarak mitokondri membran potansiyel kaybına yol açıp mitokondriyal fonksiyonu hızla azaltmıştır, ROS sürekliliği yapmıştır, Par-4 gen ekspresyonunu ve apoptozu uyarmıştır. Doza bağlı olarak 1 nM ouabain ile 1.10, 10 nM ouabain ile 1.51, ve 100 nM ouabain ile 1.80 kat Par-4 artışı bulunmuştur. Ayrıca, Par-4 ekspresyonuna karşı antisens olan bir oligomer, düşük konsantrasyonlarda ouabain ile uyarılan sitotoksisteyi anlamlı olarak engellemiştir. Ouabain hormon bağımsız insan prostat kanseri PC-3 hücrelerinde sitotoksik etkiyi iki şekilde sağlamaktadır: Ouabain yüksek konsantrasyonda Pcm kaybı, sürekli ROS üretimi ve PC-3 hücresinde ciddi apoptozu uyarırken düşük ouabain konsantrasyonları Par-4 ekspresyon yükselmesine ve sitotoksiste duyarlılığına neden olmaktadır (51). Biz de çalışmamızda HepG2 hücrelerinde 2-DG ile ouabain kombinasyonunun doza bağlı olarak Par-4 artışı ve apoptoz sağladığını gösterdik.

Sıçanlara geçici transfekte edilen AS-30D hepatoma hücrelerinde HKII ekspresyon artışının olduğu ve hipoksik durumlarda HIF-1 tarafından HKII ekspresyonunun uyarıldığı gösterilmiştir (82). Transforme hücrelerde HKII ekspresyonunun artmış olmasından dolayı glikolitik oran yüksektir. Transforme hücrelerde HKII'nin % 70'den fazlası mitokondriye bağlıdır. Bağlı HKII'nin ayrılması sonucu mitokondriye Bax translokasyonu uyarılmaktadır (99). Çalışmamızda tek başına düşük dozlarda ouabain ile HKII artışı ve proliferasyon görülürken bunların 2-DG ile kombinasyonu HKII azalması ve apoptoz sağladı.

İnsan fibrosarkoma hücre (HT1080) kültürüne ER stres uyarıcı ajan uygulanmadan önce N-asetil sistein ve GSH gibi antioksidanlar eklenip HO-1 ekspresyon artışının bloklandığı tespit edilen bir çalışmada ER stresle uyarılan HO-1 ekspresyon ve aktivasyonu için ROS gerektiği gösterilmiştir (69). HepG2 hücrelerinde glukoz içermeyen medyumla 12 saat inkübasyon sonrasında kontrol hücrelerine göre HO-1 mRNA'da 25 kat artış gözlenmiştir. Glukoz açlığının UPR'den farklı bir yol ile HO-1 gen ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. UPR aktive edici taptisargin ve tunikamisin uygulandığında önemli derecede Grp78 mRNA upregülasyonu olmasına rağmen HO-1 uyarılmamıştır. Medyumdan glutamin uzaklaştırıldığında glukoz açlığı ile oluşan HO-1 artışı bloklandı, böylece TCA aracılığıyla ROS oluşumunun HO-1 artışı ile sonuçlanabileceği önerilmiştir. HO-1 mRNA artışının glukoz açlığındaki hücrelerde koruyucu ve adaptif olarak hizmet verdiği gösterilmiştir (20). Çalışmamızda ER strese geç adaptif cevapda rol oynayan HO-1 transkripsiyonu yüksek doz ouabain ile arttı. Muhtemel mekanizma ouabaine bağlı ROS ve oksidan stres artışı olabilir. PC-3 hücresinde ouabain yüksek konsantrasyonda mitokondriyal membran potansiyel kaybı, sürekli ROS üretimi ve apoptoza neden olmuştur. 1 veya 10 µM ouabain nöroblastom hücre hattında (SH-SY5Y) 30 dakika içinde kontrol hücrelerinin yaklaşık % 50 daha üstünde bir seviyede ROS üretmiştir ve yaklaşık % 25 sitozolik Ca^{2+} yükselmesi olmuştur ve apoptoz uyarılmıştır. 10 nM ouabain 4 gün sonra hücre sayısında % 20 azalma ve 1 µM ouabain yaklaşık % 75 oranında azalma yapmıştır (62). Filipovic ve ark. oksidanlarla apoptozun uyarılma nedenini renal epitel hücrelerinde PARP aktivasyonu ve NAD^+ azalması sonucu nekrotik hücre ölümü olarak açıklamışlardır (25).

Sıçan pulmoner arter endotel hücre (PAEC) plazma membranı kaveolünde HO-1 ile Cav-1'in fiziksel etkileşimi koimmunopresipitasyon çalışması yapılarak gösterilmiştir. Cav-1, HO-1'in ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedir. Cav-1 protein yokluğunda HO-1 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (59). Ancak bizim çalışmamızda Cav-1 ve HO-1 ekspresyonları arasında paralellik gözlemlendi.

Cav-1 iskele domaini sayesinde birçok sinyal proteini ile etkileşerek kaveolde sinyal proteinlerinin yoğunlaşmasında önemli bir rol oynamaktadır (124). Ouabainin zamana bağlı olarak Cav-1 Tyr-14 fosforilasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (124) LLC-PK1 hücrelerinde ouabainin kaveolde aktif bir Na^+/K^+ -ATPaz-Src-cav-1 kompleks oluşumunu uyarabileceği iddia edilmektedir (124). Fare kardiyak fibroblastlarında Cav-1 baskılanması total Na^+/K^+ -ATPaz $\alpha 1$ izoform miktarını ve yüzey Na^+/K^+ -ATPaz $\alpha 1$ ekspresyonunu etkilemezken, Src ve ERK1/2 kinazların ouabain ile aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir. Kaveol deplesyonu ile ouabaine bağlı sinyal iletimi baskılanmaktadır. (103) Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde ouabain doza bağlı olarak Cav-1 ekspresyonunu artırdı.

Ouabainin farklı hücrelerde farklı Na^+/K^+ -ATPaz formlarına afinitesi vardır. Bu yüzden, ouabain hücrenin büyüme ve farklılaşmasını dokuya özgü olarak etkilemektedir (109).

Dijitalerin antikanser ilaç olarak yararlı olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Kalp problemleri nedeniyle KTS kullanan ve kanserden ölen hastalarda yapılan retrospektif epidemiyolojik çalışmaların sonuçları şaşırtıcı olmuştur. Stenkivist ve ark. 32 tanesi dijital tedavisi alan meme kanserli 175 hastayı 22 yıl izlemiştir, bunların ölüm oranı dijital alan grupta % 6 almayan grupta % 34 olarak gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada yine Stenkivist ve ark. genel popülasyonla kıyaslandığında kardiyak hastalık nedeniyle dijitoksin alanlarda kanser insidans değişimini araştırmışlardır. 9271 hastanın plazma dijitoksin düzeyleri belirlenmiştir ve yüksek plazma dijitoksin düzeyleri ile lösemi/lenfoma ve böbrek-üriner sistem kanserlerinde azalmış risk ilişkisi olduğu belirlenmiştir. KTS normal hücrede apoptoz yapmazken malin hücrede apoptozu başlatmaktadır (5).

Çalışmamızda HepG2 hücre kültüründe UPR gen ekspresyonlarının ouabain dozuna bağlı olarak değiştiği gösterildi. Çalışmamızın sonucunda HepG2 hücre modelinde ouabainin 0.75 nM, 7.5 nM ve 75 nM dozlarında tek başına apoptotik etkili

olmadığı ancak 2-DG ile kombine iken apoptotik etkili olduğu anlaşıldı. Bu, solid tümörlerde UPR hedefli ilaçların geliştirilmesi için kimyasal bir temel sunabilir ancak daha fazla çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

1. HepG2 hücrelerinde 0.75 nM ve 7.5 nM düşük doz ouabainin proliferasyonda etkili olduğu gösterildi.
2. 75 nM ouabain UPR aktive edici ve proliferatif etki gösterdi ancak 2-DG ile kombine edildiğinde bu etkiler Grp78 ekspresyon azalması ve Par-4 ekspresyon artışı ile tersine döndü.
3. 750 nM ouabain HepG2 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdi.
4. Tek başına 2-DG ile arttığı gözlenen HKII ve HO-1 ekspresyonları ouabainle kombine iken azaldı.
5. 0.75 nM ve 7.5 nM düşük doz ouabain 48. saatte kontrole göre MDR-1 ekspresyonunu downregüle ederek ilaç direncini azaltıcı etki gösterdi.
6. Ouabain doza bağımlı olarak Par-4 ekspresyonunu artırdı ve 2-DG ile kombine durumda daha fazla artırdı ve Par-4 ekspresyon artışı apoptoza duyarlılık sağladı.
7. 75 nM ouabain dışında diğer tek ve kombine gruplarda IRE1 α aktivasyonu görülmedi.
8. 2-DG UPR aktive edici etki gösterdi.
9. Glukoz deprivasyonu durumunda ouabain HepG2 hücrelerinde apoptoz duyarlılığı sağladı.

7. KAYNAKLAR

- 1) Abramowitz J, Dai C, Hirschi KK, Dmitrieva RI, Doris PA, Liu L, Allen JC. Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Circulation*. 108: 3048-53, 2003
- 2) Aft RL, Zhang FW, Gius D, Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer*. 87: 805-12, 2002
- 3) Ahmad IM, Mustafa EH, Mustafa NH, Tahtamouni LH, Abdalla MY. 2DG enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin. *Central European Journal of Biology* 5: 739-48, 2010
- 4) Aizman O. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 13420-4, 2001
- 5) Al-Ghoul M, Valdes R, Jr. Mammalian cardenolides in cancer prevention and therapeutics. *Ther Drug Monit*. 30: 234-8, 2008
- 6) Allagnat F, Christulia F, Ortis F, Pirot P, Lortz S, Lenzen S, Eizirik DL, Cardozo AK. Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia*. 53: 1120-30, 2010
- 7) Al-Rawashdeh FY, Scriven P, Cameron IC, Vergani PV, Wyld L. Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 22: 1099-105, 2010
- 8) Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *Journal of Internal Medicine* 261: 44-52, 2007
- 9) Argon Y, Simen BB. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol*. 10: 495-505, 1999
- 10) Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol*. 173: 2023-30, 2004
- 11) Back SH, Lee K, Vink E, Kaufman RJ. Cytoplasmic IRE1alpha-mediated XBP1 mRNA splicing in the absence of nuclear processing and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 281: 18691-706, 2006
- 12) Back SH, Schröder M, Lee K, Zhang K, Kaufman RJ. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods* 35: 395-416, 2005

- 13) Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. *Pharmacological Reviews* 61: 9-38, 2009
- 14) Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267: 18148-53, 1992
- 15) Bonin S, Pascolo L, Croce LS, Stanta G, Tiribelli C. Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases. *Mol Med*. 8: 318-25, 2002
- 16) Brightman SE, Blatch GL, Zetter BR. Isolation of a mouse cDNA encoding MTJ1, a new murine member of the DnaJ family of proteins. *Gene*. 153: 249-54, 1995
- 17) Brouillard F, Tondelier D, Edelman A, Baudouin-Legros M. Drug resistance induced by ouabain via the stimulation of MDR1 gene expression in human carcinomatous pulmonary cells. *Cancer Res*. 61: 1693-8, 2001
- 18) Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell*. 138: 377-88, 2009
- 19) Caro-Maldonado A, Tait SWG, Ramírez-Peinado S, Ricci JE, Fabregat I, Green DR, Muñoz-Pinedo C. Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells. *Cell Death and Differentiation* 17: 1335-44, 2010
- 20) Chang SH, Barbosa-Tessmann I, Chen C, Kilberg MS, Agarwal A. Glucose deprivation induces heme oxygenase-1 gene expression by a pathway independent of the unfolded protein response. *J Biol Chem*. 277: 1933-40, 2002
- 21) Chen JQ, Contreras RG, Wang R, Fernandez SV, Shoshani L, Russo IH, Cereijido M, Russo J. Sodium/potassium ATPase (Na⁺, K⁺-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: A new paradigm for development of anti- breast cancer drugs? *Breast Cancer Res Treat*. 96:1-15. 2006
- 22) Chen X, Ding Y, Liu CG, Mikhail S, Yang CS. Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans. *Carcinogenesis*. 23: 123-30, 2002
- 23) Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P. The Warburg effect and its cancer

- therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr.* 39: 267-74, 2007
- 24) Chevalier M, Rhee H, Elguindi EC, Blond SY. Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J Biol Chem.* 275: 19620-7, 2000
- 25) Chueh SC, Guh JH, Chen J, Lai MK, Teng CM. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. *J Urol.* 166: 47-53, 2001
- 26) Cornelius F, Mahmoud YA. Interaction between cardiotonic steroids and Na,K-ATPase. Effects of pH and ouabain-induced changes in enzyme conformation. *Biochemistry.* 48: 10056-65, 2009
- 27) Dakubo GD. Mitochondrial genetics and cancer: Springer Verlag, 39-66, 2010
- 28) Durmaz R. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kurs kitapçığı, Malatya, 16-20, 2007
- 29) Dwarakanath BS. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro. *J Cancer Res Ther.* 1:S27-31, 2009
- 30) Eberhardt NL. A shell program for the design of PCR primers using genetics computer group (GCG) software (7.1) on VAX/VMS systems. *Biotechniques* 13: 914-7, 1992
- 31) Ermakova SP, Kang BS, Choi BY, Choi HS, Schuster TF, Ma WY, Bode AM, Dong Z. (-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 66: 9260-9, 2006
- 32) Freiden PJ, Gaut JR, Hendershot LM. Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. *EMBO J.* 11: 63-70, 1992
- 33) Gaddameedhi S, Chatterjee S. Association between the unfolded protein response, induced by 2-deoxyglucose, and hypersensitivity to cisplatin: a mechanistic study employing molecular genomics. *J Cancer Res Ther.* 5 Suppl 1:S61-6, 2009
- 34) Ghosh B, Kar P, Mandal A, Dey K, Chakraborti T, Chakraborti S. Ca²⁺ influx mechanisms in caveolae vesicles of pulmonary smooth muscle plasma membrane under inhibition of $\alpha 2\beta 1$ isozyme of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain. *Life Sciences* 84: 139-48, 2009
- 35) Gimenez-Cassina A, Lim F, Cerrato T, Palomo GM, Diaz-Nido J. Mitochondrial Hexokinase II Promotes Neuronal Survival and Acts Downstream of Glycogen

- Synthase Kinase-3. *Journal of Biological Chemistry* 284: 3001-11, 2009
- 36) Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J, Pizzo SV. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal* 11: 2299-306, 2009
- 37) Gottlob K. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes & Development* 15: 1406-18, 2001
- 38) Gow A, Wrabetz L. CHOP and the endoplasmic reticulum stress response in myelinating glia. *Curr Opin Neurobiol.* 19: 505-10, 2009
- 39) Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50: 323-54, 2010
- 40) Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 25: 1146-1161, 2005
- 41) Gurumurthy S. Mechanism of cancer selective apoptosis by Par-4. Abstract Of Dissertation, University of Kentucky, 2005
- 42) Haga N, Saito S, Tsukumo Y, Sakurai J, Furuno A, Tsuruo T, Tomida A. Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Science* 101: 1125-32, 2010
- 43) Hamamura RS, Ohyashiki JH, Kurashina R, Kobayashi C, Zhang Y, Takaku T, Ohyashiki K. Induction of heme oxygenase-1 by cobalt protoporphyrin enhances the antitumour effect of bortezomib in adult T-cell leukaemia cells. *British Journal of Cancer* 97: 1099-105, 2007
- 44) Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 6259-63, 1991
- 45) Harwood S, Yaqoob MM. Ouabain-induced cell signaling. *Front Biosci.* 10: 2011-7, 2005
- 46) Harwood SM, Allen DA, Raftery MJ, Yaqoob MM. Calpain is a mediator of myocardial injury in experimental uremia: is it activated by endogenous ouabain? *Kidney Int.* 63: S177-180, 2003
- 47) Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med.* 71: 289-97, 2004

- 48) Horndasch M, Lienkamp S, Springer E, Schmitt A, Pavenstädt H, Walz G, Gloy J. The C/EBP homologous protein CHOP (GADD153) is an inhibitor of Wnt/TCF signals. *Oncogene*. 25: 3397-407, 2006
- 49) Horwich A. Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J Clin Invest* 110: 1221-32, 2002
- 50) Hu CC, Dougan SK, McGehee AM, Love JC, Ploegh HL. XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *EMBO J*. 28: 1624-36, 2009
- 51) Huang YT, Chueh SC, Teng CM, Guh JH. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochem Pharmacol*. 67: 727-33, 2004
- 52) Hybiske K, Fu Z, Schwarzer C, Tseng J, Do J, Huang N, Machen TE. Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and DeltaF508CFTR on inflammatory response, ER stress, and Ca²⁺ of airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 293: L1250-60, 2007
- 53) <http://saturn.med.nyu.edu/research/mp/ronlab/protocols/XBP-1.splicing.04.09.16.pdf> Son Erişim Tarihi: 19/04/2011
- 54) Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, Srivastava PK. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer*. 88:232-8, 2000
- 55) Kang H, Hwang E. 2-Deoxyglucose: An anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sciences* 78: 1392-9, 2006
- 56) Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*. 13: 1211-33, 1999
- 57) Khaitan D, Chandna S, Dwarakanath SB. Short-term exposure of multicellular tumor spheroids of a human glioma cell line to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose is more toxic than continuous exposure. *J Cancer Res Ther*. 1:S67-73, 2009
- 58) Khundmiri SJ, Metzler MA, Ameen M, Amin V, Rane MJ, Delamere NA. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291: C1247-57, 2006

- 59) Kim HP. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *The FASEB Journal* 18: 1080-9, 2004
- 60) Kim KM, Pae HO, Zheng M, Park R, Kim YM, Chung HT. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ Res.* 101: 919-27, 2007
- 61) Kishi S, Shimoke K, Nakatani Y, Shimada T, Okumura N, Nagai K, Shin-Ya K, Ikeuchi T. Nerve growth factor attenuates 2-deoxy-d-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via enhanced expression of GRP78. *Neurosci Res.* 66: 14-21, 2010
- 62) Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 1691-702, 2007
- 63) Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, Savaraj N, Lane AN, Lampidis TJ. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Molecular Cancer Therapeutics* 6: 3049-58, 2007
- 64) Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22: 193-201, 2007
- 65) Larre I, Lazaro A, Contreras RG, Balda MS, Matter K, Flores-Maldonado C, Ponce A, Flores-Benitez D, Rincon-Heredia R, Padilla-Benavides T, Castillo A, Shoshani L, Cereijido M. Ouabain modulates epithelial cell tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 11387-92, 2010
- 66) Ledoux S, Yang R, Friedlander G, Laouari D. Glucose depletion enhances P-glycoprotein expression in hepatoma cells: role of endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 63: 7284-90, 2003
- 67) Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res.* 67: 3496-9, 2007
- 68) Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci.* 26: 504-10, 2001
- 69) Lee GH, Kim HK, Chae SW, Kim DS, Ha KC, Cuddy M, Kress C, Reed JC, Kim HR, Chae HJ. Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated

- reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. *J Biol Chem.* 282: 21618-28, 2007
- 70) Li J, Zelenin S, Aperia A, Aizman O. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol.* 17: 1848-57, 2006
- 71) Li QX, Yu DH, Liu G, Ke N, McKelvy J, Wong-Staal F. Selective anticancer strategies via intervention of the death pathways relevant to cell transformation. *Cell Death Differ* 15: 1197-210, 2008
- 72) Liang M, Tian J, Liu L, Pierre S, Liu J, Shapiro J, Xie ZJ. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J Biol Chem.* 282: 10585-93, 2007
- 73) Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gauntz F, Dennery PA. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem.* 282: 20621-33, 2007
- 74) Lin X, Zhang F, Bradbury CM, Kaushal A, Li L, Spitz DR, Aft RL, Gius D. 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res.* 63: 3413-7, 2003
- 75) Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci.* 58: 931-59, 2001
- 76) Liu CY, Schroder M, Kaufman RJ. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275:24881-5, 2000
- 77) Liu J, Liang M, Liu L, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain-induced endocytosis of the plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells requires caveolin-1. *Kidney Int.* 67: 1844-54, 2005
- 78) Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Schafer AI, Alam J, Durante W. Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. Role in cell survival. *J Biol Chem.* 280: 872-7, 2005
- 79) Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ, Jin Y, Hendershot LM. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones.* 15: 281-93, 2010

- 80) Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, De Young LR, Lampidis TJ. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res.* 64:31-4, 2004
- 81) Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene.* 25: 4777-86, 2006
- 82) Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem.* 276: 43407-12, 2001
- 83) McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 60: 3807-12, 2000
- 84) Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha 2-macroglobulin-dependent signaling. *J Immunol.* 174: 2092-7, 2005
- 85) Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Rivas A. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem* 278: 12759-68, 2003
- 86) Nguyen AN, Wallace DP, Blanco G. Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. *J Am Soc Nephrol.* 18: 46-57, 2007
- 87) Ni M, Zhou H, Wey S, Baumeister P, Lee AS. Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS One.* 4:e6868, 2009
- 88) Ohoka N, Hattori T, Kitagawa M, Onozaki K, Hayashi H. Critical and functional regulation of CHOP (C/EBP homologous protein) through the N-terminal portion. *J Biol Chem.* 282: 35687-94, 2007
- 89) Olej B, dos Santos NF, Leal L, Rumjanek VM. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. *Biosci Rep.* 18: 1-7, 1998
- 90) Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee

- LA, Dang CV. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem*. 275: 21797-800, 2000
- 91) Ouyang YB, Xu LJ, Emery JF, Lee AS, Giffard RG. Overexpressing GRP78 influences Ca²⁺ handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress. *Mitochondrion*. 11: 279-86, 2011
- 92) Oweis S, Wu L, Kiela PR, Zhao H, Malhotra D, Ghishan FK, Xie Z, Shapiro JJ, Liu J. Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290: F997-1008, 2006
- 93) Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 11: 381-9, 2004
- 94) Papalas JA, Vollmer RT, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV, Burchette J, Youens KE, Johnson KB, Selim MA. Patterns of GRP78 and MTJ1 expression in primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*. 23: 134-43, 2010
- 95) Park HR, Tomida A, Sato S, Tsukumo Y, Yun J, Yamori T, Hayakawa Y, Tsuruo T, Shin-ya K. Effect on Tumor Cells of Blocking Survival Response to Glucose Deprivation. *J Natl Cancer Inst*. 96: 1300-10, 2004
- 96) Park JG, Lee SK, Hong IG, Kim HS, Lim KH, Choe KJ, Kim WH, Kim YI, Tsuruo T, Gottesman MM. MDR1 gene expression: its effect on drug resistance to doxorubicin in human hepatocellular carcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 86:700-5, 1994
- 97) Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem*. 10: 1535-51, 2003
- 98) Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40: 171-82, 2008
- 99) Pastorino JG. Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis. *J Biol Chem*. 277: 7610-8, 2002
- 100) Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25: 4633-46, 2006
- 101) Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol*. 23: 1-7, 2010
- 102) Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci*. 63: 2560-70, 2006

- 103) Quintas LEM, Pierre SV, Liu L, Bai Y, Liu X, Xie Z-J. Alterations of Na⁺/K⁺-ATPase function in caveolin-1 knockout cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49: 525-31, 2010
- 104) 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.* 514: 122-8, 2002
- 105) Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem.* 278: 20915-24, 2003
- 106) Riganti C, Campia I, Polimeni M, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A. Digoxin and ouabain induce P-glycoprotein by activating calmodulin kinase II and hypoxia-inducible factor-1alpha in human colon cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 240: 385-92, 2009
- 107) Saito S, Furuno A, Sakurai J, Sakamoto A, Park HR, Shin-Ya K, Tsuruo T, Tomida A. Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer Res.* 69: 4225-34, 2009
- 108) Saunders R, Scheiner-Bobis G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur J Biochem.* 271: 1054-62, 2004
- 109) Scheiner-Bobis G, Schoner W. A fresh facet for ouabain action. *Nat Med.* 7: 1288-9, 2001
- 110) Scheiner-Bobis G. The Na(+), K(+)-ATPase: more than just a sodium pump. *Cardiovasc Res.* 89: 6-8, 2011
- 111) Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *European Journal of Biochemistry* 269: 2440-8, 2002
- 112) Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 74: 739-89, 2005
- 113) Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 28: 79-92, 2004
- 114) Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene.* 29: 3873-80, 2010

- 115) Simpson CD, Mawji IA, Anyiwe K, Williams MA, Wang X, Venugopal AL, Gronda M, Hurren R, Cheng S, Serra S, Beheshti Zavareh R, Datti A, Wrana JL, Ezzat S, Schimmer AD. Inhibition of the sodium potassium adenosine triphosphatase pump sensitizes cancer cells to anoikis and prevents distant tumor formation. *Cancer Res.* 69: 2739-47, 2009
- 116) Soares MP, Marguti I, Cunha A, Larsen R. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? *Curr Opin Pharmacol.* 9: 482-9, 2009
- 117) Sun Z, Zhao Z, Li G, Dong S, Huang Z, Ye L, Liang H, Qu J, Ai X, Zhang W, Chen X. Relevance of two genes in the multidrug resistance of hepatocellular carcinoma: in vivo and clinical studies. *Tumori* 96: 90-6, 2010
- 118) Swerts K, Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippe J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *European Journal of Cancer* 42: 295-309, 2006
- 119) Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7: 880-5, 2006
- 120) Tsukano H, Gotoh T, Endo M, Miyata K, Tazume H, Kadomatsu T, Yano M, Iwawaki T, Kohno K, Araki K, Mizuta H, Oike Y. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:1925-32, 2010
- 121) Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci.* 94: 15-21, 2003
- 122) Ubeda M, Vallejo M, Habener JF. CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Molecular and Cellular Biology* 19: 7589-99, 1999
- 123) Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D. Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol.* 16: 1479-89, 1996
- 124) Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 279: 17250-9, 2004

- 125) Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal*. 11: 2307-16, 2009
- 126) Wang M, Ye R, Barron E, Baumeister P, Mao C, Luo S, Fu Y, Luo B, Dubeau L, Hinton DR, Lee AS. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ*. 17: 488-98, 2010
- 127) Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85, 2005
- 128) Wu CP, Calcagno AM, Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol*. 1: 93-105, 2008
- 129) Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv*. 3: 157-68, 2003
- 130) Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656-64, 2005
- 131) Xu ZW, Wang FM, Gao MJ, Chen XY, Hu WL, Xu RC. Targeting the Na⁺/K⁺-ATPase alpha1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting. *Biol Pharm Bull*. 33: 743-51, 2010
- 132) Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res*. Mar 56: 1164-7, 1996
- 133) Yu DH, Macdonald J, Liu G, Lee AS, Ly M, Davis T, Ke N, Zhou D, Wong-Staal F, Li QX. Pyrvinium targets the unfolded protein response to hypoglycemia and its anti-tumor activity is enhanced by combination therapy. *PLoS One*. 3: e3951, 2008
- 134) Zhang L, Zhang Z, Guo H, Wang Y. Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundam Clin Pharmacol*. 22: 615-21, 2008
- 135) Zhang L-H, Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 110: 1299-305, 2010
- 136) Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell Surface Relocalization of the Endoplasmic Reticulum Chaperone and Unfolded Protein Response Regulator

GRP78/BiP. *Journal of Biological Chemistry* 285: 15065-75, 2010

137) Zhao Y, Rangnekar VM. Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. *Cancer Biol Ther.* 7: 1867-74, 2008

138) Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, Takano Y. Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum Pathol.* 39: 1042-9, 2008

139) Zhong D, Xiong L, Liu T, Liu X, Chen J, Sun SY, Khuri FR, Zong Y, Zhou Q, Zhou W. The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R. *J Biol Chem.* 284: 23225-33, 2009

140) Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 259: 523-6, 1999

