

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

**BAZI KAYISI ÇEŞİTLERİNİN FARKLI KANSER HÜCRELERİNDE  
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Canbolat GÜRSES**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ**

**OCAK 2023**

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

**BAZI KAYISI ÇEŞİTLERİNİN FARKLI KANSER HÜCRELERİNDE  
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Canbolat GÜRSES  
23614110202**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ**

**OCAK 2023**

**T.C.**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

**Bazı Kayısı Çeşitlerinin Farklı Kanser Hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stresi  
Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması**

**Tezi Hazırlayan: Canbolat GÜRSES**  
**Doktora Tezi**



## TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Tez çalıŐmalarım boyunca bana her tŸrlŸ maddi ve manevi desteği sağlayan, gerek akademik gerekse idari anlamda biz yakın geleceğin bilgili, saygılı ve özverili akademisyenlerine her zaman çok iyi bir örnek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhittin YŸREKLİ'ye,

Deneysel çalıŐmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle akademik alanda her zaman başka ufuklar açıp bakıŐ aımı tazeleyerek sabırlı yardımlarıyla yeni deneysel çalışmalara imza atmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e,

Bilimsel yolculuğum sŸresince yardımlarını esirgemeyen değerli ğrencilerim Ali KURUÇAY ve Nermin GŸNDŸZ'e,

Tez kapsamında çalışılan kayıŐıları temin ettiğim Malatya KayıŐı Araştırma EnstitŸsŸ MŸdŸrlŸęŸ'ne ve BŸlent ŖZTŸRK'e,

Tezin uygulama aşamasında FDK-2019/1938 proje numarası ile bu doktora tezimi desteklediği için İnŸnŸ Ÿniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

TŸm hayatım boyunca her konuda desteklerini gŸrdŸęŸm, bugŸnlere gelmemi sağlayan canım annem ve canım kardeŐime,

sonsuz teŐekkŸrlerimi sunuyorum.

## ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum “Bazı Kayısı Çeřitlerinin Farklı Kanseri Hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerindeki Etkinliđinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dūřecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden olduğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Canbolat GÜRSES



## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ .....	i
ONUR SÖZÜ .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR .....	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1 Kayısıyla İlgili Genel Bilgiler .....	3
2.2 Endoplazmik Retikulum .....	5
2.2.1 Endoplazmik retikulumun işlevleri.....	6
2.3 Endoplazmik Retikulum Stresi.....	7
2.3.1 Endoplazmik retikulum stresiyle ilgili yollar .....	8
2.3.1.1 Protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK) Sinyal Yolağı .....	11
2.3.1.2 Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) sinyal yolağı .....	12
2.3.1.3 İnositol gerektiren enzim-1 (IRE-1) sinyal yolağı.....	12
2.4 Endoplazmik Retikulum Stresinin Hastalıklarla İlişkisi .....	13
2.4.1 Endoplazmik retikulum stresi ve diyabet .....	14
2.4.2 Endoplazmik retikulum stresi ve osteoporoz.....	19
2.4.3 Endoplazmik retikulum stresi ve nörodejenerasyon.....	19
2.4.4 Endoplazmik retikulum stresi ve kanser.....	22
2.4.5 Endoplazmik retikulum stresi ve viral enfeksiyonlar .....	26
2.4.6 Endoplazmik retikulum stresi ve obezite .....	30
2.5 Thapsigargin .....	31
2.5.1 Sarko/endoplazmik retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPaz (SERCA) pompa inhibitorü olarak thapsigargin .....	32
2.5.2 Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein yanıt (Unfolded Protein Response - UPR) indükleyicisi olarak thapsigargin .....	33
2.5.3 Endoplazmik retikulumdan Ca <sup>2+</sup> boşalması, UPR ve hücre ölümü arasındaki ilişki.....	39
2.6 Tezin Amacı .....	40
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>41</b>
3.1 Materyaller, Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	41
3.2 Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	42
3.2.1 Hücre besiyerinin hazırlanması .....	42
3.2.2 Hücre dondurma çözeltisinin hazırlanması .....	42
3.2.3 MTT çözeltisinin hazırlanması .....	42
3.2.4 Akridin turuncusu ve etidyum bromür boya karışımının hazırlanması .....	42
3.2.5 Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisinin (PBS) hazırlanması .....	42
3.3 Kayısı Çeşitlerinin Metanol Ekstraktlarının Hazırlanması.....	43
3.4 Hücre Kültürü Deneyleri .....	45
3.4.1 Hücrelerin temin edilmesi ve gelişiminin sağlanması .....	45
3.4.2 Hücre kültürü ortamı .....	46
3.4.3 Dondurulmuş hücre hattının açılması .....	46
3.4.4 Hücrelerin pasajlanması .....	47
3.4.5 Hücrelerin dondurulması.....	47

3.4.6 Hücrelerin sayımı .....	48
3.4.7 Hücrelerin plakalara ekimi .....	48
3.4.8 Farklı kayısı ekstraktlarının hücre kültür ortamına eklenmesi.....	50
3.4.9 Farklı kayıslara ait %Canlılık ve IC <sub>50</sub> değerlerinin MTT testiyle belirlenmesi .....	51
3.4.10 Endoplazmik retikulum stresinin oluşturulması için thapsigarginin <i>in vitro</i> olarak hücelere uygulanması.....	53
3.4.11 Akridin turuncusu/etidyum bromür boya karışımının uygulanması.....	53
3.4.12 Yara iyileşme testi.....	54
3.5 ELISA Testleri.....	55
3.6 İstatistiksel Analizler .....	58
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>59</b>
4.1 MCF-7 Hücrelerinin MTT Testi Sonuçları.....	59
4.1.1 Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktlar ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi sonuçları .....	59
4.1.2 Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktların MCF-7 hücrelerindeki IC <sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi .....	68
4.2 MCF-7 Hücrelerinin AT/EB Boyama Sonuçları.....	73
4.3 Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları.....	81
4.4 MCF-7 Hücelerine Ait ELISA Sonuçları.....	89
4.5 HCT116 Hücrelerinin MTT Testi Sonuçları .....	93
4.5.1 Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktlar ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin MTT testi sonuçları .....	93
4.5.2 Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktların HCT116 hücrelerindeki IC <sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi .....	102
4.6 HCT116 Hücrelerinin AT/EB Boyama Sonuçları.....	107
4.7 Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının HCT116 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları.....	116
4.8 HCT116 Hücelerine Ait ELISA Sonuçları.....	124
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>128</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>135</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>158</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	: Thapsigarginin kimyasal yapısı.....	32
Şekil 2.2	: UPR sinyal yollarının şematik gösterimi.....	34
Şekil 3.1	: Hacıhaliloğlu Gün Kurusu ve Kabaası Gün Kurusu kayısının metanol ekstraktlarının fotoğrafları.....	44
Şekil 3.2	: Hacıhaliloğlu Kükürtlü ve Kabaası Kükürtlü kayısının metanol ekstraktlarının fotoğrafları.....	45
Şekil 3.3	: MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop fotoğrafları.....	49
Şekil 3.4	: HCT116 hücrelerinin invert mikroskop fotoğrafları.....	50
Şekil 4.1	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	59
Şekil 4.2	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	60
Şekil 4.3	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	60
Şekil 4.4	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	62
Şekil 4.5	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	62
Şekil 4.6	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	63
Şekil 4.7	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	64
Şekil 4.8	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	64
Şekil 4.9	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	65
Şekil 4.10	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	66
Şekil 4.11	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	66
Şekil 4.12	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	67

<b>Şekil 4.13</b>	: Farklı kayısı türlerinin MCF-7 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmasıyla elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri grafiği.....	<b>68</b>
<b>Şekil 4.14</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>70</b>
<b>Şekil 4.15</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>71</b>
<b>Şekil 4.16</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>72</b>
<b>Şekil 4.17</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>74</b>
<b>Şekil 4.18</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>75</b>
<b>Şekil 4.19</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>76</b>
<b>Şekil 4.20</b>	: Thapsigargin ile 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>77</b>
<b>Şekil 4.21</b>	: Thapsigargin ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>78</b>
<b>Şekil 4.22</b>	: Thapsigargin ile 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>79</b>
<b>Şekil 4.23</b>	: Thapsigarginin ve farklı kayısıların IC <sub>50</sub> değerlerinin birlikte 24 saat boyunca uygulanmasıyla MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>80</b>
<b>Şekil 4.24</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kuru ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kuru kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>82</b>
<b>Şekil 4.25</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kuru ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kuru kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.....	<b>83</b>
<b>Şekil 4.26</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>83</b>
<b>Şekil 4.27</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.....	<b>84</b>
<b>Şekil 4.28</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Gün Kuru ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Gün Kuru kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>85</b>

<b>Şekil 4.29</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.....	<b>86</b>
<b>Şekil 4.30</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>86</b>
<b>Şekil 4.31</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.....	<b>87</b>
<b>Şekil 4.32</b>	: Kontrol grubu, farklı kayısı çeşitleri ve Thapsigargin eklenmiş farklı kayısı çeşitleriyle muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre göçü yüzdesi grafiği.....	<b>89</b>
<b>Şekil 4.33</b>	: MCF-7 hücrelerindeki ATF6 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği...	<b>91</b>
<b>Şekil 4.34</b>	: MCF-7 hücrelerindeki XBP1 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği...	<b>92</b>
<b>Şekil 4.35</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	<b>93</b>
<b>Şekil 4.36</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	<b>94</b>
<b>Şekil 4.37</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği....	<b>94</b>
<b>Şekil 4.38</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>96</b>
<b>Şekil 4.39</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>96</b>
<b>Şekil 4.40</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>97</b>
<b>Şekil 4.41</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>98</b>
<b>Şekil 4.42</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>98</b>
<b>Şekil 4.43</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>99</b>
<b>Şekil 4.44</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>100</b>
<b>Şekil 4.45</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>100</b>

<b>Şekil 4.46</b>	: Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.....	<b>101</b>
<b>Şekil 4.47</b>	: Farklı kayısı türlerinin HCT116 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmasıyla elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri grafiği.....	<b>102</b>
<b>Şekil 4.48</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>104</b>
<b>Şekil 4.49</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>105</b>
<b>Şekil 4.50</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>106</b>
<b>Şekil 4.51</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>108</b>
<b>Şekil 4.52</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>109</b>
<b>Şekil 4.53</b>	: Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>110</b>
<b>Şekil 4.54</b>	: Thapsigargin ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>111</b>
<b>Şekil 4.55</b>	: Thapsigargin ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>112</b>
<b>Şekil 4.56</b>	: Thapsigargin ve farklı kayısıların IC <sub>50</sub> değerlerinin birlikte 24 saat boyunca uygulanmasıyla HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri.....	<b>114</b>
<b>Şekil 4.57</b>	: Thapsigarginin ve farklı kayısıların IC <sub>50</sub> değerlerinin birlikte 24 saat boyunca uygulanmasıyla HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri.....	<b>115</b>
<b>Şekil 4.58</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kuru ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kuru kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>117</b>
<b>Şekil 4.59</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kuru ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kuru kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarı aralığı grafiği.....	<b>118</b>
<b>Şekil 4.60</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>118</b>
<b>Şekil 4.61</b>	: Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarı aralığı grafiği.....	<b>119</b>

<b>Şekil 4.62</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Gün Kuru ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Gün Kuru kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>120</b>
<b>Şekil 4.63</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Gün Kuru ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Gün Kuru kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.....	<b>121</b>
<b>Şekil 4.64</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.....	<b>121</b>
<b>Şekil 4.65</b>	: Kontrol grubu, sadece Kabaası Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.....	<b>122</b>
<b>Şekil 4.66</b>	: Kontrol grubu, farklı kayısı çeşitleri ve Thapsigargin eklenmiş farklı kayısı çeşitleriyle muamele edilen HCT116 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre göçü yüzdesi grafiği.....	<b>124</b>
<b>Şekil 4.67</b>	: HCT116 hücrelerindeki ATF6 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği.	<b>125</b>
<b>Şekil 4.68</b>	: HCT116 hücrelerindeki XBP1 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği.	<b>127</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b>	<b>:</b>	<b>Katlanmamış protein yanıt (UPR) bileşenleri.....</b>	<b>10</b>
<b>Çizelge 2.2</b>	<b>:</b>	<b>Katlanmamış protein yanıt (UPR) hayvan modelleri ve ilişkili fenotipler.....</b>	<b>14</b>
<b>Çizelge 2.3</b>	<b>:</b>	<b>Çeşitli kanser hücre hatlarında Thapsigarginin yer aldığı hücre ölüm çeşidi ve anahtar düzenleyiciler.....</b>	<b>36</b>
<b>Çizelge 4.1</b>	<b>:</b>	<b>Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>61</b>
<b>Çizelge 4.2</b>	<b>:</b>	<b>Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>63</b>
<b>Çizelge 4.3</b>	<b>:</b>	<b>Kabaaşı Gün Kurusu kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>65</b>
<b>Çizelge 4.4</b>	<b>:</b>	<b>Kabaaşı Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>67</b>
<b>Çizelge 4.5</b>	<b>:</b>	<b>Kayısı çeşitlerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri....</b>	<b>68</b>
<b>Çizelge 4.6</b>	<b>:</b>	<b>MCF-7 Deney Grupları.....</b>	<b>81</b>
<b>Çizelge 4.7</b>	<b>:</b>	<b>Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları.....</b>	<b>88</b>
<b>Çizelge 4.8</b>	<b>:</b>	<b>MCF-7 Hücrelerinin ATF6, CHOP ve XBP1 için One-Way ANOVA Sonuçları.....</b>	<b>89</b>
<b>Çizelge 4.9</b>	<b>:</b>	<b>MCF-7 Hücrelerinin ATF6 ELISA Sonuçları.....</b>	<b>90</b>
<b>Çizelge 4.10</b>	<b>:</b>	<b>MCF-7 Hücrelerinin XBP1 ELISA Sonuçları.....</b>	<b>91</b>
<b>Çizelge 4.11</b>	<b>:</b>	<b>Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>95</b>
<b>Çizelge 4.12</b>	<b>:</b>	<b>Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>97</b>
<b>Çizelge 4.13</b>	<b>:</b>	<b>Kabaaşı Gün Kurusu kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>99</b>
<b>Çizelge 4.14</b>	<b>:</b>	<b>Kabaaşı Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık ± Standart Sapma değerleri.....</b>	<b>101</b>
<b>Çizelge 4.15</b>	<b>:</b>	<b>Kayısı çeşitlerinin HCT116 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri..</b>	<b>102</b>
<b>Çizelge 4.16</b>	<b>:</b>	<b>HCT116 Deney Grupları.....</b>	<b>116</b>
<b>Çizelge 4.17</b>	<b>:</b>	<b>Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının HCT116 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları.....</b>	<b>123</b>
<b>Çizelge 4.18</b>	<b>:</b>	<b>HCT116 Hücrelerinin ATF6, CHOP ve XBP1 için One-Way ANOVA Sonuçları.....</b>	<b>124</b>
<b>Çizelge 4.19</b>	<b>:</b>	<b>HCT116 Hücrelerinin ATF6 ELISA Sonuçları.....</b>	<b>125</b>
<b>Çizelge 4.20</b>	<b>:</b>	<b>HCT116 Hücrelerinin XBP1 ELISA Sonuçları.....</b>	<b>126</b>

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Çözeltisi
<b>PI</b>	: Propidyum İyodür
<b>EtBr</b>	: Etidyum Bromür
<b>MTT</b>	: 3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>AMPK</b>	: AMP ile aktive olan protein kinaz
<b>ATF4</b>	: Transkripsiyon faktörü-4 aktifleştirici
<b>ATF6</b>	: Transkripsiyon faktörü-6 aktifleştirici
<b><math>\beta</math>Asp-12ADT</b>	: 8-( $\beta$ Asp-12- aminododekanoiloksi)thapsigargin
<b>BiP</b>	: Bağlayıcı immünoglobulin proteini
<b>CHOP</b>	: Transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteini
<b>DR5</b>	: Ölüm reseptörü
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	: Ökaryotik başlatma faktörü 2
<b>ER</b>	: Endoplasmik retikulum
<b>ERAD</b>	: ER ile ilişkili protein yıkımı
<b>ERK</b>	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
<b>FRs</b>	: Folat reseptörleri
<b>JNK</b>	: c-Jun N-terminal kinaz
<b>LC3B</b>	: Mikrotübül ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3B
<b>Leu-12ADT</b>	: 8-(Leu-12-aminododekanoiloksi)-8-debutanoiloksithapsigargin
<b>MAPK</b>	: Mitojenle aktive protein kinaz
<b>Orai1</b>	: Kalsiyum salınımı ile aktive olan kalsiyum kanal proteini 1
<b>PERK</b>	: Protein kinaz R benzeri ER kinaz
<b>PSA</b>	: Prostat spesifik antijen
<b>PSMA</b>	: Prostat spesifik membran antijeni
<b>SERCA</b>	: Sarko/endoplazmik retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPaz
<b>SOCE</b>	: Depolanmış kontrollü Ca <sup>2+</sup> girişi
<b>SR</b>	: Sarkoplazmik retikulum

<b>STIM1</b>	: Stromal etkileşim molekülü 1
<b>T-ALL</b>	: T hücreli akut lenfoblastik lösemi
<b>Tg</b>	: Thapsigargin
<b>TRAF2</b>	: Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2
<b>TRAIL</b>	: Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
<b>UPR</b>	: Katlanmamış protein yanıt – Unfolded Protein Response
<b>XBP1</b>	: X-box bağlayıcı protein 1
<b>XBP1s</b>	: XBP1'in eklenmiş izoformu
<b>IRE1</b>	: İnositol gerektiren transmembran kinaz/endonükleaz 1
<b>GADD34</b>	: Büyüme durması ve DNA hasarıyla indüklenebilir 34
<b>RIDD</b>	: Ire1'e bağlı düzenlenmiş yıkım
<b>ORP150</b>	: Oksijen regüleli protein 150
<b>BMD</b>	: Kemik mineral yoğunluğu
<b>RP</b>	: Retinitis pigmentosa
<b>AMPK</b>	: Aktive edilmiş protein kinaz yolu
<b>ESCC</b>	: Özofagus skuamöz hücreli karsinom hücre hattı
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü

# ÖZET

Doktora Tezi

## BAZI KAYISI ÇEŞİTLERİNİN FARKLI KANSER HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Canbolat GÜRSES

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

164 + XVII sayfa

2023

Danışman: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Yüksek besin değeri ve fonksiyonel gıda bileşenleri açısından oldukça zengin olan kayısı meyvesi, Malatya bölgesinde en çok üretilen meyve olup önemli bir ihraç ürünüdür. Raf ömrü oldukça kısa olan kayısı, mevcut rengini muhafaza etmek ve raf ömrünü arttırmak amacıyla kükürtleme işlemine tabi tutulmaktadır. Kükürtleme işleminin avantajlarına karşın, yüksek kükürt düzeyinin sağlık açısından riskler oluşturabileceği ile ilgili kaygılar mevcuttur.

Ökaryot hücrelerdeki sitoplazmik organellerin en büyüklerinden biri olan endoplazmik retikulum; kalsiyum depolama, detoksifikasyon, lipid sentezi ve protein katlanması gibi önemli görevlere sahiptir. Proteinler, endoplazmik retikulumda doğru şekilde katlanarak son hedeflerine ulaşmak üzere bu organelden ayrılmaktadırlar. Günümüzde görülme sıklığı her geçen gün artan diyabet, obezite, Alzheimer ve kanser gibi pek çok hastalığın yanlış katlanan proteinlerle ilişkili olduğu düşünüldüğü için endoplazmik retikulum organeli aslında tüm bu hastalıkların merkezindedir.

Bu doktora tezi kapsamında, *Prunus armeniaca* L. Cv. “Hacıhaliloğlu” ve “Kabaası” kayısı çeşitlerinin hem gün kurusu olarak hem de kükürtlenmiş olarak kurutulmuş metanol ekstraktlarının sitotoksik, morfolojik ve hücre göçü özellikleri, MCF-7 (insan meme kanseri) ve HCT116 (insan kolon kanseri) hücre hatları üzerinde *in vitro* olarak incelenmiştir. Çalışmada endoplazmik retikulum stresi oluşturulmasında Thapsigargin kullanılmıştır. Elde edilen MTT testi sonucuna göre, Hacıhaliloğlu Gün Kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü çeşitlerinin IC<sub>50</sub> değerleri MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saat için sırasıyla 60.16, 95.47, 56.32, 108.99 mg/mL ve HCT116 hücre hattı üzerinde 24 saat için sırasıyla 79.97, 110.11, 74.94, 117.77 mg/mL bulunmuştur. Akridin turuncusu ve etidyum bromür boyama yönteminde uygulanan IC<sub>50</sub> kayısı konsantrasyon değerlerine ait floresans mikroskop görüntüleri ile IC<sub>50</sub> belirlemeye yönelik yapılan MTT testi sonucunda invert mikroskopla çekilen hücre fotoğrafları tamamen tutarlıdır. Yara iyileşme testiyle gerçekleştirilen hücre göçü deneyi sonucuna göre, MCF-7 hücre hattında kontrolün dışında Thapsigargin uygulanmış Kabaası Gün Kurusu çeşidinde %9.60 olarak en çok hücre göçü meydana gelmiştir. HCT116 hücre hattında ise kontrolün dışında Thapsigargin uygulanmış Hacıhaliloğlu Gün Kurusu

çeşidinde %41.54 olarak en çok hücre göçü meydana gelmiştir. MCF-7 hücrelerine yönelik ELISA sonuçları incelendiğinde, ATF6 proteini açısından MCF-7 Kontrol grubu diğer tüm gruplardan ortalama olarak daha yüksek değerdedir. Elde edilen ELISA sonuçlarından, MCF-7 ve HCT116 hücrelerinde CHOP proteinine rastlanmamıştır. Endoplazmik retikulum stresinde bir başka yolda yer alan XBP1 proteini açısından ise HCT116 Kontrol grubu diğer tüm gruplardan çok daha yüksek değerdedir ( $p<0.05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Kayısı, Endoplazmik Retikulum Stresi, Katlanmamış Protein Yanıt, Thapsigargin, Kükürtleme.



## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### THE EFFECTIVENESS INVESTIGATION OF SOME APRICOT CULTIVARS ON ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN DIFFERENT CANCER CELLS

Canbolat GÜRSES

Inonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

164 + XVII pages

2023

Supervisor: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Apricot fruit, which is very rich in terms of high nutritional value and functional food components, is the most produced fruit in the Malatya region and is an important export product. Apricot has a very short shelf life and it is subjected to sulphurisation in order to preserve its current color and increase its shelf life. Despite the advantages of sulphurisation, there are concerns that high sulfur levels may pose health risks.

The endoplasmic reticulum is one of the largest of the cytoplasmic organelles in eukaryotic cells. It has significant functions such as calcium storage, detoxification, lipid synthesis and protein folding. Proteins leave this organelle to reach their final destination by folding correctly in the endoplasmic reticulum. Since many diseases, the incidence of which is increasing day by day, such as diabetes, obesity, Alzheimer's, and cancer, endoplasmic reticulum organelle is actually at the center of all these diseases which is thought to be associated with misfolded proteins.

Within the scope of this doctoral thesis, the cytotoxic, morphological and cell migration properties of *Prunus armeniaca* L. Cv. "Hacıhaliloğlu" and "Kabaası" apricot species, both as sun-dried and sulphurized methanol extracts, on MCF-7 (human breast cancer) and HCT116 (human colon cancer) cell lines were investigated *in vitro*. Thapsigargin was used as an endoplasmic reticulum stress inducer. According to the obtained MTT test results, the IC<sub>50</sub> values of sun-dried Hacıhaliloğlu, sulphurized Hacıhaliloğlu, sun-dried Kabaası and sulphurized Kabaası apricots were 60.16, 95.47, 56.32, 108.99 mg/mL for 24 hours against MCF-7 cell line and 79.97, 110.11, 74.94, 117.77 mg/mL for 24 hours against HCT116 cell line, respectively. Fluorescence microscope images of the IC<sub>50</sub> apricot concentration values applied in the acridine orange and ethidium bromide staining method and the cell photos taken with the invert microscope as a result of MTT test performed for IC<sub>50</sub> determination are completely consistent. According to the results of the cell migration test performed with the wound healing assay, the highest number of cell migration except control group occurred in sun-dried Kabaası variety as 9.60%, which was treated with Thapsigargin in the MCF-7 cell line. In HCT116 cell line, the most cell migration occurred as 41.54% in sun-dried Hacıhaliloğlu apricot that was treated with Thapsigargin except control group. When ELISA results for MCF-7 cells are examined, MCF-7 Control group has a higher value on

average than all other groups in terms of ATF6 protein. From obtained ELISA results, CHOP protein was not detected in MCF-7 and HCT116 cells. In terms of XBP1 protein, which is involved in another pathway in endoplasmic reticulum stress, HCT116 Control group has a much higher value than all other groups ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Apricot, Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response (UPR), Thapsigargin, Sulphurisation.





*Canum Anneanneme*

*ve*

*Dostum Sali Kahraman'a*

## 1. GİRİŞ

Yüksek besin değeri ve fonksiyonel gıda bileşenleri açısından oldukça zengin olan kayısı meyvesi (*Prunus armeniaca* L.), Malatya bölgesinde en çok üretilen meyve olup önemli bir ihraç ürünüdür. Raf ömrü oldukça kısa olan kayısı, mevcut rengini muhafaza etmek ve raf ömrünü arttırmak amacıyla kükürtleme işlemine tabi tutulmaktadır. Kükürtleme işleminin avantajlarına karşın, yüksek kükürt düzeyinin sağlık açısından riskler oluşturabileceği ile ilgili kaygılar da mevcuttur. Bununla beraber, kayısı kükürtlemesinin sağlık açısından etkilerini araştıran çalışma sayısı literatürde oldukça kısıtlıdır.

Ökaryot hücrelerdeki sitoplazmik organellerin en büyüklerinden biri olan endoplazmik retikulum; kalsiyum depolama, detoksifikasyon, lipit sentezi ve protein katlanması gibi önemli görevlere sahiptir. Proteinler, endoplazmik retikulumda doğru şekilde katlanarak son hedeflerine ulaşmak üzere ayrılmaktadırlar. Günümüzde görülme sıklığı her geçen gün artan diyabet, Alzheimer ve kanser gibi pek çok hastalık yanlış katlanan proteinlerle ilişkili olduğu için endoplazmik retikulum organeli aslında tüm bu hastalıkların merkezindedir. Ayrıca, obezite ve damar sertliği gibi lipit metabolizmasıyla alakalı sorunların da başlıca araştırılması gereken kaynağı yine endoplazmik retikulumdur. Bu nedenlerle, endoplazmik retikulum stresinin çalışıldığı hücre kültürü araştırmaları son yıllarda giderek önem kazanmaktadır.

İnsan beslenmesindeki ihtiyacın yanı sıra fizyolojik ve metabolik fonksiyonlara da ek yararları olan fonksiyonel gıdaların önemi, özellikle COVID-19 pandemi süreciyle birlikte her geçen gün biraz daha yaşantımıza damga vurmaktadır. Fonksiyonel gıdalar ya da gıda bileşenleri olarak değerlendirilen meyve ve sebzelerin hastalıklardan korunmada veya tedavi sürecinde olumlu katkıları bulunmaktadır. Bu nedenle, meyve ve sebzelere yönelik bilimsel araştırmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Pek çok hastalığın hücresel seviyedeki ana nedeni olarak belirlenen endoplazmik retikulum stresine karşı halihazırda geniş kapsamlı literatür bilgisi bulunmasına rağmen, bu durum en önemli fonksiyonel gıdalardan birisi olarak kabul edilen kayısı meyvesi için ne yazık ki tam tersinedir. Bu doktora tez çalışmasının temel amacı, Malatya ilimizde yetiştirilen kayısı türlerinden farklı kurutma yöntemleriyle hazırlanan metanol ekstraktlarının uygulandığı MCF-7 ve HCT116 insan kanser hücre hatları üzerinde, *in vitro* olarak meydana getirilen endoplazmik retikulum stresi sonrası oluşabilecek sitotoksisite, apoptoz/nekroz ve hücre göçü özelliklerinin yanında bu hücrelerde muhtemel olarak gözlemlenebilecek protein miktarındaki değişikliklerin araştırılmasıdır.

Bu çalışma kapsamında, Malatya'da Haziran-Ağustos ayları arasında olgun meyve olarak yetişen farklı kayısı çeşitlerinden Hacıhaliloğlu ve Kabaası kayısıları toplanmıştır. Malatya'daki kayısı ağaçlarının yaklaşık dörtte üçünü oluşturup en önemli kurutmalık kayısı çeşidi olan Hacıhaliloğlu ve Malatya'da ağaç sayısı bakımından ikinci sırada olan Kabaası çeşitlerine ait kayısıların kükürtlenmiş (2000 ppm) ve gün kurusu olarak güneş ışığı altında kurutulmuş olgun meyvelerinden metanol ekstraktları elde edilmiştir. Daha sonra kükürtlenmiş ve gün kurusu olarak iki farklı yöntemle kurutulmuş iki tür kayısının insan meme kanseri (MCF-7) ve insan kolon kanseri (HCT116) hücre hatları kullanılarak *in vitro* deneysel doz profilleri MTT testi ile sitotoksik özellikleri ortaya çıkarılarak IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. Daha sonrasında, belirlenen kayısı ekstraktlarının IC<sub>50</sub> ve thapsigargin için uygulanan 1 µM değeriyle, hücresel ölümün apoptotik veya nekrotik mi olduğunun saptanması için akridin turuncusu (AT) ve etidyum bromür (EB) boyaları kullanılarak floresans mikroskopla hücre fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca, IC<sub>50</sub> değerleri kullanılarak bu iki farklı hücre hattında gerçekleşen hücre göçü miktarları yara iyileşme testi yapılarak incelenmiştir. Araştırmamızın son aşamasında, kayısı ekstraktları ve thapsigargin verilmiş farklı hücrelerdeki protein izolasyonunu takiben ELISA yöntemiyle endoplazmik retikulum stres yolaklarında etkin faaliyet gösteren bazı spesifik proteinlerin miktarları belirlenerek elde edilen veriler detaylı bir şekilde yorumlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kayısıyla İlgili Genel Bilgiler

Kayısı (*Prunus armeniaca* L.) meyvesi Malatya ilimizle adeta özdeşleşmiştir. Ülkemizin en önemli tarım ürünlerinden biri olan Malatya kayısı, hem sosyoekonomik (Akın ve diğ., 2008) hem de klinik açıdan çok önemli bir meyvedir. Dolayısıyla, dünya kayısı üretiminde lider konumda olan ülkemizde kayısıyla ilgili yapılacak her türlü araştırma büyük önem arz etmektedir ve fevkalade elzemdir. Malatyamız sadece dünya yaş kayısı üretiminin ~%11'ini değil, aynı zamanda kuru kayısı üretiminin ise ~%70'ini tek başına gerçekleştirmektedir (Ünal, 2010). Bundan ötürü kayısı, ülkemiz için benzersiz bir tanıtıcı marka ve üründür.

Gülgiller ağacının sert çekirdekli meyvesi olan kayısı, Dünya'nın pek çok coğrafyasında yetiştirilmektedir. Kayısı ağacının yaprakları geniş, oval ve açık yeşil renklidir. İlkbaharda beyaz renkli çiçek açan kayısı, taze tüketilebildiği gibi, çoğunlukla gün kurusu ya da kükürtlenmiş olarak kurutmalık şeklinde de tüm yıl sofraları süslemektedir. Fruktoz oranı yüksek olan kayısı, A vitamini ve demir açısından oldukça zengindir (Ünal, 2010).

Kayısının kökeninin Ermenistan olduğu şeklindeki uzun süre yanlışlıkla benimsenen görüşe dayalı olarak *Prunus armeniaca* L. isminin verildiği düşünülmektedir. Gerçekte ise kayısı uzak doğu kökenlidir. Çin'in kuzey ve batı bölgelerinden dünyanın en büyük ve en yüksek sıradağları olan Himalaya Dağları boyunca Rusya ve Ermenistan'a doğru dağılmıştır. Ayrıca, Güneybatı Asya tepeleri de kayısı için yabancı tür çeşitliliğinin başka bir noktasıdır. Tarihsel olarak ilk kültür edilen kayısı, yaklaşık 4000 yıl önceye Çin İmparatoru Yu dönemine aittir. Bundan daha önemlisi, kayısı tarımının nasıl yapılması gerektiğinden bu tarihi kayıtlarda bahsedilmektedir. Ayrıca yine Çin'e ait eski kayıtlarda, kayısının aşılınmasıyla türler arasında genetik çeşitlilik sağlanarak çok daha kaliteli kayısıların üretilmesinden söz edilmektedir (Adachi ve diğ., 2007).

Çok iyi antioksidan kaynağı olan kayısı meyvesi; şekerleri, lifleri, özellikle potasyum, kalsiyum, demir, magnezyum, çinko, fosfor ve selenyum gibi mineralleri, biyoaktif fitokimyasalları içeriğinde barındırmaktadır. Ayrıca, vitaminler bakımından A vitamini, C vitamini, tiamin, riboflavin, niasin ve pantotenik asit açısından da zengindir. (Leccese ve diğ., 2007). Kayısının antioksidan içeriğini rutin, klorojenik ve neoklorojenik asitleri de içeren fenolik bileşikler sağlamaktadır.

Kayısı meyvesinin farklı çeşitlerinin meyveleri arasındaki lezzet farklılığı içeriğindeki şekerler, organik asitler, fenolik bileşikler ve uçucu yağların farklı birleşiminden kaynaklanmaktadır. Karbohidratlar olarak içeriğinde glikoz, fruktoz ve sükroz bulunmaktadır. Kayısı çeşidine göre değişiklik göstermekle birlikte, kateşin ve epikateşin kayısıda genelde en çok bulunan flavonoidlerdir. Bunun yanında, kayısıdaki organik asit içeriğinde sitrik asit ve malik asit belirgin olarak bulunmaktadır. Kayısıdaki meyve aromasında ise etil asetat, heksil asetat, limonen,  $\beta$ -siklositral,  $\gamma$ -dekalakton, 6-metil-5-hepten-2-on, 2-heksenal ve heksenal gibi uçucu bileşikler yer almaktadır. Bu uçucu bileşiklerin içerikleri de türden türe göre değişiklik göstermektedir (Roussos ve diğ, 2016).

Malatya yöresinde yetişen kayısı çeşitlerinin başka yerlerdeki çeşitlere kıyasla, kuru madde ve şeker oranı yüksektir. Bunun yanında, fenolik bileşikler, karotenoidler ve  $\beta$ -karoten bakımından zengin besin kaynağı olan Malatya kayısının eşsiz sorbitol oranı diğer kayısı çeşitlerine göre kıyasla oldukça yüksektir. Tüm Malatya kayısı çeşitlerinde malik asit baskındır. Ayrıca, potasyum içeriği bakımından oldukça zengin olan Malatya kayısı içeriğinde magnezyum, selenyum ve çinko gibi önemli mineraller de bulundurmaktadır. Sonuçta Malatya kayısı, besin değerini yükselten fonksiyonel gıda bileşenleri açısından oldukça zengindir (Akin ve diğ, 2008).

Yediklerimizde bulunan antioksidanlar sayesinde reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif hasara karşı koruma sağlanabildiği için özellikle son yıllarda, gıdalardaki polifenollere ve karotenoidlere ilgi giderek artmaktadır (Ali ve diğ, 2011). Fotosentez yapan canlılarda bulunan karotenoidler, doğada yer alan en yaygın pigment grubudur. Meyve ve özellikle çiçeklerin renklerinden karotenoidler sorumludur (Bramley, 2003). Gıdalardaki antioksidanların kardiyovasküler hastalık riskini oldukça düşürdüğü bilinmektedir. Ayrıca, lutein ve zeaksantin gibi görme işlevinde rol oynayan karotenoidlerin sarı nokta hastalığını engelleyebildiği belirlenmiştir (Camppbell ve Padilla-Zakour, 2013).

Kayısıda bulunan yüksek antioksidan miktarın, farmakoloji açısından da önemli fonksiyonelliğe sahip olduğu görülmektedir. Farmakoloji bakımından kayısı, hafif laksatif, ateş düşürücü, antiseptik ve kusturucu özellikleriyle kullanılmaktadır (Ali ve diğ, 2011). Günlük üç adet Japonya kayısı tüketiminin, atrofik gastrit sonucu meydana gelen mukozal enflamasyonu yatıştırıcı etkisinin olduğu bulunmuştur (Enomoto ve diğ, 2010). Ayrıca, kayısının çekirdeği analjezik, antiastım spazm önleyici, göğüs sedatifi olarak değerlendirilmektedir ve kayısının çekirdeğinin yağlarından benzaldehit, kozmetik ve aroma bileşiklerinin üretilmesinde faydalanılmaktadır (Ali ve diğ, 2011).

Malatya kayısı ile yapılan çalışmalardan birinde oksidatif stres bozukluğunun kayısı ve/ya  $\beta$ -karoten tedavisiyle engellenebilmesinin yanı sıra biyokimyasal & histolojik olarak metotreksatla (MTX) muamele sonucunda bağırsakta meydana gelen hasarın düzeltilebileceği bulunmuştur (Vardi ve diğ, 2008). Bir başka kayısı çalışmasına göre, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon modeline sahip sıçanlarda, tüketilen kayısının antioksidan madde içeriği bakımından kalbi koruyucu faaliyet gösterdiği anlaşılmıştır (Parlakpınar ve diğ, 2009). Ayrıca, alkolün sıçan testislerinde yol açtığı histopatolojik değişikliklerin kayısı açısından zengin bir beslenmeyle önlenildiği bir başka araştırmada anlaşılmıştır (Kurus ve diğ, 2009). Malatya kayısının antioksidan savunma sistemlerini harekete geçirerek, sıçanlarda hepatoprotektif etki gösterdiği saptanmıştır (Yurt ve Celik, 2011). Sonuç olarak tüm bu araştırmalar, kayısının insan sağlığı üzerindeki faydalı sonuçları bakımından her yönüyle değerlendirilmesi gerektiğinin altını özellikle çizmektedir.

## **2.2. Endoplazmik Retikulum**

Endoplazmik retikulum (ER) lümeni, kalsiyumun aktif hareketinin meydana geldiği özel bir organel bölmesi olarak hizmet eder. Bu bölme, tüm hücre içi alan boyunca en yüksek kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) konsantrasyonuna sahip yerdir. Genel durumda kalsiyum, ER membranı üzerindeki proton pompası yardımıyla sitozolden ER lümenine alınırken, özel kanallar olan inositol 1,4,5-trifosfat reseptör (IP3R) ve ryanodin reseptör (RyR) ile sitozole salınır. Böylece, ER'deki serbest kalsiyumun stabilitesi sağlanır. Ayrıca bu organel içinde büyük miktarda kalsiyumun yanı sıra, protein katlama ve taşıma işlevine sahip olan kalretikülinler ve glikozla düzenlenmiş protein 78 gibi moleküler şaperonlar da bulunur.

Kalsiyum konsantrasyonundaki bir dengesizlik hücre ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, endoplazmik retikulumdaki kalsiyum seviyelerinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Buna ek olarak, endoplazmik retikulum için bir bariyer olan endoplazmik retikulum plazma zarı, hücre boyunca serbestçe difüze olabilir ve farklı organelleri çeşitli temas bölgeleri aracılığıyla birbirine bağlayabilir. Endoplazmik retikulum-plazma zarı temas bölgeleri, kalsiyum konsantrasyonu homeostazının korunmasında, sinyal iletiminde ve ayrıca lipidlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Hücre içi kalsiyum homeostazının dengesizliği, oksidatif stres, besin yoksunluğu, glikozilasyonun inhibisyonu ve proteinlerin yanlış katlanması gibi durumlar, ER organelinin fonksiyonunu bozabilen ve sonuçta ER stresini indükleyebilen genetik veya

çevresel saldırılara yanıt olarak hücre harekete geçirilebilir. ER stresi meydana geldiğinde, proteinler düzgün bir şekilde katlanamaz ve ER lümeninde birikir. Buna yanıt olarak hücrede, ER stresinde aktif hale geçen PERK-eIF2 $\alpha$ , IRE1-XBP1 ve ATF6-CREBH dahil olmak üzere bir dizi sinyal yolağı aracılığıyla proteinlerin doğru şekilde katlanması sağlanır, protein üretimiyle birlikte birikimi engellenir, işlevsel olmayan toksik proteinlerin bozunması hızlandırılır ve ER stresi ile ilgili genlerin transkripsiyonlarının ve ifadelerinin tetiklenmesinin yanı sıra ER'nin kendi kendini onarma kapasitesi güçlendirilir (Nazi ve diğ, 2016). Bu yanıt dizisi topluca “*katlanmamış protein yanıtı*” olarak adlandırılır ve UPR (Unfolded Protein Response) olarak kısaltılır. ER stresi çok uzun veya yoğunsa ve sonuç olarak hücre ER homeostazını yeniden sağlamak için yeterli değilse hücrede apoptoz meydana gelir.

Ökaryotik hücrelerde ER stresi meydana geldiğinde, UPR çeşitli sinyal yollarını aktive eder. Endoplazmik retikulum üzerindeki efektörleri başlatan farklı sinyal yolları olarak bunlar üç kategoriye ayrılabilir: PKR benzeri ER kinaz (PERK), tip-1 ER transmembran protein kinaz (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) (Szegezdi ve diğ, 2006). Üç transmembran reseptör proteini ve ayrıca endoplazmik retikulumun (ER) lümen bölmesindeki PERK, IRE1 ve ATF6, normal fizyolojik koşullar altında GPR78/BiP ile bağlı bir durumda olup, onları inaktive durumda tutan stabil kompleksler oluşturur. ER'de protein katlanma bozukluğu meydana geldiğinde, çok sayıda katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimi olduğunda ER stresi meydana gelerek GRP78/BiP yukarıdaki üç UPR efektöründen ayrılır ve daha sonra yeni oluşmuş katlanmamış proteinlerle birleştirilir. Ayrıca ayrılmış haldeki üç aktif transmembran reseptör proteini, UPR sinyal kaskadı reaksiyonunu başlatır.

### **2.2.1. Endoplazmik retikulumun işlevleri**

ER; hücrede protein sentezinin, taşınmasının ve katlanmasının, lipid ve steroid sentezinin, karbohidrat metabolizmasının ve kalsiyum depolanmasının yapıldığı ana organeldir (Schwarz ve Blower, 2016).

ER'de proteinlerin katlanması; katlayıcı enzimler (foldazlar), peptidil prolil izomerazlar ve bağlayıcı immünoglobulin protein (BiP: GRP78), kalneksin ve kalretikulin gibi pek çok şaperonlarla gerçekleştirilir. Ayrıca, şaperonlar proteinlerin taşınması ve yıkımını da denetlerler. Doğru olarak katlanan proteinler taşıma kompleksleri ile golgi organeline taşınarak çeşitli hücresel kompartmanlara gönderilir veya endoplazmik

retikuluma yeniden dönerek hücrenin dışına sekresyonları sağlanır. Katlanmamış, yanlış katlanmış ya da kümelenmiş proteinler ubiquitinasyon ve endoplazmik retikulumla ilişkili protein degradasyonu (ERAD) yoluyla yıkılmaları için sitozole tekrar gönderilirler (Wang ve Kaufman, 2016).

Endoplazmik retikulum ayrıca hücre içindeki kalsiyumun depolanmasından da sorumludur. Normal hücre içi sitozolik serbest kalsiyum iyonu ( $Ca^{+2}$ ) derişimi ~100 nM, ER lümeni içerisinde ~100-800  $\mu$ M ve hücre dışı kalsiyum iyonu derişimi ise ~2 mM dolaylarındadır (Clapham, 2007; Samtleben ve diğ, 2013). Sitoplazmada, hücre dışına ve hücre içi depolara kıyasla yaklaşık 10,000 kat az olan kalsiyum miktarı, hücrenin uyarılmasıyla yaklaşık 100-200 katına (~10-20  $\mu$ M) çıkar. Hücrenin çoğu fonksiyonu kalsiyum oranındaki artışla gerçekleşir. Bu yükseliş; protein fosforilasyonu veya defosforilasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, gen transkripsiyonu, hücre hareketi ve apoptoz gibi çoğu hücrenel fonksiyonun düzenlenmesinden sorumludur (Berridge ve diğ, 2003). Hücrede kalsiyum dengesini sağlamak amacıyla  $Ca^{+2}$  akışı, hassas biçimde regüle edilmelidir. Kalsiyum kanalları, pompaları, iyon değıştiricileri ve kalsiyum bağlayan/tamponlayan proteinlerden oluşan hücredeki sistemler, hücrenin içindeki kalsiyum dengesinin sürdürülmesini sağlamaktadır (Krebs ve diğ, 2015).

### **2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi**

ER'nin hücrenel strese karşı hızlı bir şekilde yanıt oluşturma özelliğı, hücrede homeostazın devamı için önemlidir. ER işlev kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda, ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi olur. Bu durum, endoplazmik retikulum stresi olarak adlandırılır (Ron ve Walter, 2007; Zhao ve Ackerman, 2006).

ER homeostazı bozulduğunda, katlanmamış protein yanıt (Unfolded Protein Response – UPR) ismindeki adaptif ve koruyucu yollar devreye girer. Katlanmamış protein yanıt öncelikle endoplazmik retikulumdaki işlevsel ağırlığı azaltmaya çalışır. Çalışmalar şunları içermektedir: i) Endoplazmik retikulumda, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin fazlaca birikmesi nedeniyle yeni protein ifadesinin durdurulması, ii) Yanlış katlanmış veya katlanmamış protein yükünü hafifletmeye yönelik şaperon meydana getiren gen ifadelerinin artırılması, iii) ERAD sisteminin aktive edilmesidir ki bu sistem proteazomal degradasyonla yanlış katlanmış proteinleri yok edebilir (Lynch ve diğ, 2012; Meusser ve diğ, 2005).

### 2.3.1 Endoplazmik retikulum stresiyle ilgili yollar

UPR, üç adet ER transmembran reseptör proteini aracılığıyla gerçekleşir. Bunlar: çift sarmal RNA-aktivasyonlu protein kinaz benzeri ER kinaz (PERK), inositol bağımlı kinaz 1 (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır (Liu ve diğ, 2016; Naidoo, 2009). Bu endoplazmik retikulum stres sensörleri lümenal, transmembran ve sitoplazmik bölgelerden oluşur. Yanlış katlanmış proteinlerin oranındaki yükseliş, sensörün lümenal bölgesiyle algılanarak değişik yollardaki sinyallerle öncelikle sitoplazmaya ve daha sonra da çekirdeğe aktarılır (Bravo ve diğ, 2013).

PERK, ilk olarak memeli pankreas adacık hücrelerinde tanımlanmıştır (Shi ve diğ, 1998). UPR tetiklenmediğinde PERK, BiP ile bağlıdır ve inaktiftir (Bertolotti ve diğ, 2000). UPR yanıtı meydana geldiğinde, BiP/PERK birbirinden ayrılır ve PERK otofosforilasyonla kinaz bölgesini aktif hale geçirir. Fosforlanmış PERK, ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 (eIF2 $\alpha$ )'nin  $\alpha$  alt ünitesini fosforilleyerek aktif hale geçirir (Dever, 2002). eIF2 $\alpha$  aktif hale geldiğinde, genelde mRNA translasyonu inhibisyona uğrar ve böylece protein üretilmesi yavaşlatılır. Sonuçta endoplazmik retikulumun görevi kaynaklı yükü azaltılmış olur. Ayrıca eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu, bir başka UPR yanıt bileşeni olan aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4)'ün ekspresyonunu da meydana getirir (Harding ve diğ, 2000; Cullinan ve diğ, 2003). Hücrenin iç dengesinin oluşumuyla, önceden aktifleşmiş PERK defosforilasyonla aktif olmayan formuna dönüşür.

Başka bir endoplazmik retikulum stres sensörü olan IRE1, bir N-terminal lümenal sensör alanı, bir transmembran alanı ve C-terminal sitozolik efektör alanından oluşur (Walter ve Ron, 2011). Memelilerde iki IRE1 paraloğu (IRE1 $\alpha$  ve IRE1 $\beta$ ) vardır (Iwawaki ve diğ, 2001; Tirasophon ve diğ, 1998). IRE1 $\alpha$ 'nın aktif hale geçmesi, BiP'den ayrılmasına ve doğrudan katlanmamış proteinlerle etkileşimine bağlıdır. BiP'in katlanmamış proteinlere bağlanıp yarışmalı olarak IRE1 $\alpha$ 'dan ayrılması oligomerizasyonu sağlarken, trans-otofosforilasyonla IRE1 $\alpha$  aktivasyonuna neden olur (Kimata ve diğ, 2007). IRE1 $\alpha$  aktifleştiğinde, endoplazmik retikulum stres sinyali sitoplazmaya iletilir. Hemen sonrasında, farklı sinyal yolları aktifleşir. IRE1 $\alpha$ , X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) mRNA'sının uçbirleştirilmesine ve XBP1 proteininin sentezine yol açar. XBP1; ER'de protein sentezlenmesi ve katlanması, ERAD, otofaji, redoks metabolizması, glikozilasyon, lipid biyogenezi ve veziküler trafik ile ilgili genleri düzenler (Walter ve Ron, 2011). IRE1 $\alpha$  ayrıca, TNF reseptör-bağlantılı faktör 2 (TRAF2) üzerinden c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktifleştirerek hücre ölümüne yol açar. JNK'ye benzer şekilde, nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) de TRAF2 aracılığıyla aktif hale geçer (Bravo ve diğ, 2013).

UPR'de üçüncü sinyal yolağı ise ATF6'dır. ATF6, UPR'deki bazı genlerin regülasyonu ile ilgili protein ailesinin bir üyesidir. ATF6 $\alpha$  ve ATF6 $\beta$  olmak üzere iki izoformu bulunan ATF6, endoplazmik retikulum stresi meydana geldiğinde golgiye transloke olur ve sonuçta iki proteaz enzimi tarafından kesilir. Serin proteaz-1 bölgesi ATF6'yı lümenal alanda keserken, metalloproteaz-2 bölgesi N-terminal parçasını keser. Hücre çekirdeğine giren ATF6'nın kesilen N-terminal parçası UPR ile ilgili genlerin yukarı yönlü ifadesini indükler (Liu ve diğ, 2016).

Endoplazmik retikulum stresinin kronik olarak devam ettiği durumlarda, hücre işlev kaybı ve daha sonra hücre ölümü meydana gelir (Hetz, 2012). IRE1 yolağı, hücrenin yaşaması veya ölümüne karar verilme aşamasında anahtar rol oynar. IRE1 hücre koruyuculuğu fonksiyonunun yanında, JNK ve p38 mitojen aktivasyonlu protein kinaz (MAPK) aktivasyonuna da sahiptir (Ron ve Hubbard, 2008). JNK fosforilasyonu, B-hücre Lenfoma 2 (Bcl2) inhibisyonuna yol açar. Bcl2 protein ailesi, Bcl2-bağlantılı X protein (Bax) gibi pro-apoptotik ve Bcl2 gibi anti-apoptotik proteinlerden meydana gelir. Bu proteinler, endoplazmik retikulum stresi aracılı hücre ölümünde oldukça önemli role sahiptir. Diğer taraftan, p38 MAPK transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteinini (CHOP) fosforilleyerek aktifleştirir. CHOP aktivasyonu gen ekspresyonunu apoptoz lehine değiştirir. Bu durum, Bim ifadesini artırırken Bcl2 ifadesini azaltır (Puthalakath ve diğ, 2007; Yamaguchi ve Wang, 2004). Bunun haricinde, IRE1 endoribonükleaz aktivitesiyle miRNA'lar kesilebilir. Bu miRNA'lar, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak hücre ölümünü kolaylaştırabilirler (Dufey ve diğ, 2014).

Endoplazmik retikulum stresi durumunda ATF6 kesilerek aktive olduktan sonra, N-terminal parçası hücrenin çekirdeğine giderek *BiP* ve *CHOP* gibi hedef genleri indükler. ATF6 ayrıca, XBP1'e ait mRNA transkripsiyonunu da artırır (Logue ve diğ, 2013). PERK aktivasyonu gerçekleşen eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu, *ATF4* gibi katlanmamış protein yanıt bağımlı genlerin translasyonuna izin verir. *ATF4*'ün önemli hedefleri CHOP, GADD34 ve ATF3'tür (Sano ve Reed, 2013). PERK, mitokondri-bağlantılı ER membranlarında kalsiyum sinyalinin kontrolünde, ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi yoluyla sitokrom c salınımı ve apoptozun düzenlenmesinde görev alır (Dufey ve diğ, 2014). Katlanmamış protein yanıt (UPR) bileşenlerine Çizelge 2.1'den ulaşılabilir.

**Çizelge 2.1 : Katlanmamış protein yanıt (UPR) bileşenleri.**

	Protein / Gen	Görevi	Referans
ER Stres Sensörleri	BİP (HSPA5, GRP78)	<ul style="list-style-type: none"> <li>UPR aktivasyonu</li> </ul>	Bertolotti ve diğ., 2000; Ng ve diğ., 1992
	ATF6/ <i>ATF6</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ER-hedefli genlerin upregülasyonunu sağlama</li> </ul>	Yoshida ve diğ., 2001
	IRE1/ <i>ERN1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>BP1 aktivasyonu</li> <li>ER-hedefli mRNA (RIDD) degradasyonuna aracılık etme</li> <li>TRAF2 molekülüne bağlanarak Ask1/JNK ve IKK/NF-κB yolağını aktive etme</li> </ul>	Minchenko ve diğ., 2015; Hollien ve diğ., 2009; Urano ve diğ., 2000
	PERK/ <i>EIF2AK3</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>eIF2α'nın fosforilasyonunun sağlanması ile toplam protein translasyonunu azaltarak ER homeostazisini düzenleme</li> </ul>	Harding ve diğ., 2000
Transkripsiyon faktörleri	BİP, p58IPK, ERdj4, HEDJ, PDI-P5, EDEM1, ATF6 ve CHOP	<ul style="list-style-type: none"> <li>ER biyogenezindeki genleri regüle etme</li> <li>Diğer UPR genlerini regüle etme (<i>ATF6</i> ve <i>CHOP</i>)</li> <li>ER şaperonları indüklemeye (Bip, p58IPK, ERdj4, HEDJ, PDI-P5, EDEM1)</li> <li>Oksidatif stres, immün yanıt ve lipogenezi regüle etme</li> </ul>	Chen ve diğ., 2002; Jiang ve diğ., 2015; Glimcher, 2010; Reimold ve diğ., 2000; Zhong ve diğ., 2012; Yamamoto ve diğ., 2007; Yoshida ve diğ., 2000
	ATF4/ <i>ATF4</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stres yanıt genlerini, oksidatif stres ve anjiyogenezi regüle etme</li> </ul>	Harding ve diğ., 2003; Lange ve diğ., 2008; Roybal ve diğ., 2004
	CHOP (DDIT3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proapoptotik ve antiapoptotik genleri regüle etmek, apoptozu başlatma</li> <li><i>GADD34</i> upregülasyonu ile eIF2α defosforilasyonunu indüklemeye</li> </ul>	Marciniak ve diğ., 2004; McCullough ve diğ., 2001
	CREB3L3	<ul style="list-style-type: none"> <li>Akut faz genlerini ve enflamatuvar yanıt genlerini aktive etme</li> </ul>	Zhang ve diğ., 2008
Protein translasyon regülatörleri	eIF2	<ul style="list-style-type: none"> <li>eIF2B inhibisyonu ile genel protein sentezini bloke etme</li> <li>ER stresi sırasında ATF4 ve CHOP translasyonunu artırma</li> </ul>	Ron ve Walter, 2007; Harding ve diğ., 1999
ER şaperonları	CANX	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oligosakkaritleri tanıyarak glikozile proteinlerin katlanmasına yardımcı olma</li> </ul>	Ware ve diğ., 1995
	CALR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glikozile proteinlerin katlanmasına yardımcı olmak ve kalite kontrolü sağlama</li> </ul>	Michalak ve diğ., 1999
	ERdj5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disülfid redüktaz olarak işlev görerek, ER'de hatalı katlanmış proteinlerin degradasyonunu sağlama</li> </ul>	Ushioda ve diğ., 2008
	BİP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlere bağlanarak proteinlerin katlanmasına yardımcı olma</li> </ul>	Ting ve Lee, 1988
	PDI/ <i>PDIA2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disülfid bağ oluşumunu katalizleme</li> </ul>	Hatahet ve Ruddock, 2009

### 2.3.1.1 Protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK) Sinyal Yolağı

Serin/treonin protein kinaz aktivitesine sahip olan PERK, Tip 1 transmembran proteindir. PERK, IRE-1 $\alpha$  ile yapı ve fonksiyon bakımından benzerliklere sahiptir. Fakat, farklılık olarak sitozolik kısmında IRE-1 $\alpha$  gibi RNaz aktivitesi yoktur (Hinnebusch ve Lorsch, 2012; Verfaillie ve diğ, 2012). Aktifleşmiş olan PERK, ökaryotik başlatıcı faktör 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )'nın 51. pozisyonundaki serine fosfor bağlar. Ökaryotik başlatıcı faktör  $\beta$  (eIF2 $\beta$ ), guanozin difosfatın guanozin trifosfat (GTP) ile yer değiştirmesini sağlar. eIF2 $\beta$ , eIF2 $\alpha$ 'ya GTP'yi bağlayamadığından sonuçta translasyon başlangıç kompleksi (eIF2 $\alpha$ /GTP/Met-tRNA<sub>i</sub>) meydana gelemez (Hinnebusch ve Lorsch, 2012; Verfaillie ve diğ, 2012). Endoplazmik retikulum stresinde PERK, mRNA translasyonunu yavaşlatır ve endoplazmik retikulumun görevini hafifletir. Ayrıca, yeni sentezlenen proteinlerin stres altındaki ER'ye girişini de önler. eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonu bu yavaşlamaya yol açmaktadır (Cullinan ve Diehl, 2004). eIF2 $\alpha$ 'nın fosforillenmesi, genelde translasyonu yavaşlatır. Sonuçta, ER'nin kapasitesi artar ve endoplazmik retikulum stresini azaltan aktive edici transkripsiyon faktörü-4 (ATF4) gibi spesifik mRNA'ların ekspresyonu indüklenir. cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) ailesinin bir üyesi olan ATF4, bazı endoplazmik retikulum şaperon proteinlerinin ve katlanmamış protein yanıtla bağlantılı transkripsiyon faktörü genlerinin ifadesini indüklemenin yanında ATF6'yı ER'den golgi aygıtına taşımaktadır (Xu ve diğ, 2010). ATF4 ayrıca, cAMP yanıt elemanına (CRE) bağlanmaktadır. Buna ek olarak, CAAT/artırıcı bağlayıcı proteini (C/EBP7ATF) cevap elemanına bağlayarak hücrel/oksidatif stres ve apoptozdan sorumlu genleri düzenlemektedir (Masuoka ve Townes, 2002; Roybal ve diğ, 2004; Zhang ve diğ, 2011). ATF4'ün araştırılmış en iyi hedef genleri, endoplazmik retikulum stresinde rol oynayan C/EBP homolog protein-10 (CHOP-10) ve DNA hasarı-indüklenebilir geni 153 (GADD153)'tür. CCAAT-artırıcı bağlayıcı homolog proteini (CHOP) sinyalinin tetiklenmesi, endoplazmik retikulum stresindeki hücreleri apoptoza götürür. Bu 3 katlanmamış protein yanıt yolak, CHOP'u aktive edebilir. CHOP transkripsiyonunu indükleyen en etkili transkripsiyon faktörü ATF4'tür. İlaveten, eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu da CHOP düzenlenebilmektedir (Palam ve diğ, 2011). Buna karşılık, DNA hasarı indüklenebilir protein 34 (GADD34) indüksiyonu sonucunda CHOP, eIF2 $\alpha$ 'nın defosforilasyonunu gerçekleştirir. Sonuçta, eIF2 $\alpha$  defosforilasyonu endoplazmik retikulumda translasyon durdurulamaz ve protein sentezi devam eder. Böylece, ER'de artan protein yükü oluşur ve hücre apoptoza girer (Marciniak ve diğ, 2004).

### **2.3.1.2 Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) sinyal yolağı**

Tip-2 transmembran proteini olan ATF6, memelilerde ATF6 $\alpha$  ve ATF6 $\beta$  olarak iki alt tipe sahiptir (Yamamoto ve diğ, 2007). GRP-78'den ER stresinde ayrılan ATF6; IRE-1 ve PERK'in zıttı olarak golgi organeline gider. Golgi cisimciğine yerleşen ATF6, site 1 ve site 2 proteazlar aracılığıyla ikiye bölünerek aktifleşir (Chen ve diğ, 2002). Kesildikten sonra ayrılan parça, aktif bir transkripsiyon faktörüne dönüşür. Bu transkripsiyon faktörü çekirdeğe giderek ERAD ve apoptozda görev alır. ATF6, ayrıca XBP1'e de bağlanmaktadır. XBP1 ve GRP-78 gibi başka şaperonların ifadesini arttırmaktadır. Hemen sonrasında, ER stres yanıt elemanı-1 (ERSE-1) ve ER stres yanıt elemanı-2 (ERSE-2), katlanmamış protein yanıt elemanı ve ayrıca cAMP yanıt elemanı (CRE) genlerinin ifadelerini indüklemek amacıyla çekirdeğe yönelir. XBP1'in ekspresyonunu düzenlemenin yanı sıra ATF6, bu proteine direkt bağlanıp UPR ile ilişkili diğer proteinlere ait genlerin ifadelerini de indükler. Sonuçta, bu bahsedilen süreçlerin hepsi ER'de hasar yaratan, hatalı katlanmış ve katlanmamış proteinlerin birikimini azaltmaktadır. Memeli ATF6 $\alpha$  ER şaperonlarının; transkripsiyonel indüksiyonda ve ERAD bileşenlerinin indüksiyonunda gerekliliği belirlenmiştir (Yamamoto ve diğ, 2007). ATF6 $\alpha$  yokluğu veya eksikliği olan farelerde normal embriyonik/postnatal gelişim meydana gelmiştir. Fakat, ATF6 $\alpha$  ve ATF6 $\beta$ 'nın her ikisinin de eksikliğinde embriyonik ölümler gözlenmiştir (Yamamoto ve diğ, 2007; Yamamoto ve diğ, 2010).

### **2.3.1.3 İnositol gerektiren enzim-1 (IRE-1) sinyal yolağı**

IRE-1 yolağı, mayalardan insanlara kadar evrimsel açıdan iyi şekilde korunmuştur. Hücreyi stres ve ölümden korumada önemli bir görevi olan (Lin ve diğ, 2007) bu yolaktaki IRE-1, ER'de yerleşik Tip 1 transmembran proteindir. Sitozolik kinaz ve endoribonükleaz (RNaz) aktivitelerini barındıran bu proteinin, memelilerde IRE-1 $\alpha$  ve IRE-1 $\beta$  olmak üzere iki izoformu vardır (Ron, 2002). IRE-1 $\alpha$ , genel olarak ifade edilmektedir ve embriyonik dönemde geninde bir hasar meydana gelirse erken ölüme neden olduğu bilinmektedir (Iwawaki ve diğ, 2009). Buna karşıt olarak, IRE-1 $\beta$  ise gastrointestinal epitel hücrelerde az ifade edilmektedir ve RNaz aktivitesine sahip değildir. ER membranında lokalize olabilen her iki izoform, stresle bağlantılı sinyalleşmeyi başlatabilir ve ikisinin de ER membranında sinyal iletme potansiyeli vardır (Bertolotti ve diğ, 2001).

Diğ UPR yolakları gibi GRP-78 ile birlikte bulunduğu aktif olmayan IRE-1, ER stresi sırasında GRP-78'in ayrılmasıyla dimerize olur ve otofosforillenir. Sonuç olarak, RNaz fonksiyonuna sahip kısmı aktifleşir. Aktifleşmiş IRE-1'in RNaz aktivitesiyle X-box

bağlayıcı protein 1 (XBP1)'den 26 nükleotid uzaklaştırılmaktadır. Oluşan kırılmış XBP1 (XBP1s), translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüşmekte ve ER şaperonlarının ve katlanmaya yardımcı olan enzimlerin upregülasyonuna neden olmaktadır (Patil ve Walter, 2001). XBP1 normalde sitoplazmada bulunmaktadır, ancak kırılmamış şekildedir. XBP1s hücre çekirdeğine girer ve sonuçta ERAD, lipid biyosentezi ve protein katlanmasında rol oynayan birçok hedef geni indükler (Chen ve diğ, 2014; Zhang ve diğ, 2017). Ayrıca, IRE-1α bazı miRNA'lara bağlanarak kendi mRNA seviyesini ve apoptoz mekanizmasını da düzenlemektedir (Zhang ve diğ, 2017; Maurel ve Chevet, 2013; Dai ve diğ, 2013). Bir transkripsiyon faktörü olan XBP1, ER şaperonlarının indüksiyonu yoluyla ER stresine adaptif yanıtın ana düzenleyicisi rolündedir. XBP1 eksikliği olan hücreler, oksidatif strese ve enflamasyon kaynaklı hücre ölümlerine karşı oldukça hassastır (Reimold ve diğ, 2000; Zhong ve diğ, 2012; Lee ve diğ, 2002). Ayrıca XBP1; endoplazmik retikulum biyogenezi, fetal gelişim, lipogenez, adipogenez ve diğer hücresel aşamalarda etkin rollere sahiptir (Jiang ve diğ, 2015; Glimcher, 2010).

ER stresi sırasında IRE-1, endoplazmik retikulum hedefli mRNA'ların yıkımına aracılık ederek, ER'de yeni sentezlenmiş proteinlerin yükünü hafifletmeye çalışır. Katlanmamış protein yanıtın bu yolağı, IRE1-bağımlı yıkım (RIDD) olarak adlandırılmaktadır (Hollien ve diğ, 2009). Ayrıca miRNA'nın üretimini ve dejenerasyonunu düzenleyen RIDD, post-transkripsiyonel düzeyde hedef proteinlerin ifadelerini de regüle etmektedir (Upton ve diğ, 2012).

## **2.4 Endoplazmik Retikulum Stresinin Hastalıklarla İlişkisi**

ER stresi ve buna eşlik eden UPR hücre ölümüne yol açabileceğinden, protein yanlış katlanmasında bir artışa veya hücrenin ER'de bu proteinleri işleme kabiliyetinde bir azalmaya yol açan koşulların hücresel işlev bozukluğu ve hastalığa neden olabilmesi şaşırtıcı değildir. Bu tür hastalıklar, hücreden salgılanan veya membran proteinlerini katlama yeteneğinin azalmasından, yanlış katlanmış proteinleri tanıma veya bunlara yanıt verme yeteneğinin azalmasından ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin artan yükünden kaynaklanabilir. UPR'nin uygun olmayan aktivasyonu, hücreyi öldürerek veya hatta hücreyi ölümden koruyarak (örneğin neoplastik transformasyon veya viral enfeksiyon sırasında) zararlı olabilir. Aslında, doğal olarak meydana gelen veya deneysel olarak indüklenen bu durumların her birinin, insanlarda veya model organizmalarda hücresel ve/veya organizma hasarına neden olduğu gösterilmiştir. Katlanmamış protein yanıtıyla ilişkili hayvan modellerini ve meydana gelen fenotipleri Çizelge 2.2 göstermektedir.

**Çizelge 2.2 : Katlanmamış protein yanıt (UPR) hayvan modelleri ve ilişkili fenotipler.**

UPR Elemanı	Hayvan Modeli	Fenotip	Referans
IRE1 $\alpha$	Tamamen Knockout	12.5-13 günlük gebelikten sonra embriyonik ölüm.	Iwawaki ve diğ, 2009; Zhang ve diğ, 2005
IRE1 $\alpha$	Embriyoya özgü koşullu Knockout	Hiperglisemi, hafif hipoinsülinemi. Asiner pankreas ve tükürük seröz dokularının anormal histolojik yapısı.	Iwawaki ve diğ, 2010
IRE1 $\beta$	Tamamen Knockout	Deneyisel kolite karşı artan duyarlılık.	Bertolotti ve diğ, 2001; Iqbal ve diğ, 2008; Martino ve diğ, 2013; Tsuru ve diğ, 2013
XBP1	Tamamen Knockout	Hipoplastik fetal karaciğer, azalmış hematopoez ve gebeliğin 12.5 gününde anemiden embriyonik ölüm.	Reimold ve diğ, 2000
XBP1	Yetişkin karaciğer spesifik Knockout	Büyük karaciğer anormallikleri yok. Hepatik lipid sentezi ve sekresyonunun azalması nedeniyle plazma kolesterol ve trigliserit seviyelerinde azalma.	Lee ve diğ, 2008
XBP1	$\beta$ hücrelerine özgü koşullu Knockout	Bozulmuş proinsülin işleme ve azalmış insülin sekresyonu nedeniyle hafif hiperglisemi ve glikoz intoleransı.	Lee ve diğ, 2011
PERK	Tamamen Knockout	Hiperglisemi, bozulmuş insülin sentezi ve sindirim enzimleri. $\beta$ -Hücre kaybı. Büyüme geriliği ve iskelet displazisi.	Harding ve diğ, 2001; Zhang ve diğ, 2002
PERK	Beyin spesifik Knockout	Bilgi işlemede bilişsel eksiklikler.	Trinh ve diğ, 2012
ATF4	Tamamen Knockout	Arızalı göz merceği gelişimi. Bozulmuş fetal karaciğer hematopoezi nedeniyle şiddetli anemi.	Hettman ve diğ, 2000; Lange ve diğ, 2008; Masuoka ve Townes, 2002
ATF6 $\alpha$	Tamamen Knockout	Farmakolojik olarak indüklenen ER stresine yanıt olarak hipoglisemi, insülin direnci ve karaciğer yağlanması.	Usui ve diğ, 2012; Yamamoto ve diğ, 2010
ATF6 $\beta$	Tamamen Knockout	Belirgin bir fenotip yok.	Yamamoto ve diğ, 2007
ATF6 $\alpha$ ve $\beta$	Çift Knockout	Embriyonik öldürücülük.	Yamamoto ve diğ, 2007

#### 2.4.1 Endoplazmik retikulum stresi ve diyabet

Diabetes mellitus (DM), glikoz metabolizmasının homeostazını sürdürmek için yetersiz insülin fonksiyonundan kaynaklanır. Tip I DM'de, pankreastaki  $\beta$  adacık hücrelerinin yeterli miktarda insülin salgılamada birincil başarısızlığı vardır. Birçok

hastada bu kusur,  $\beta$  hücrelerine yapılan bir otoimmün saldırıdan kaynaklanır. Nadir durumlarda,  $\beta$  hücre yetmezliği ve/veya ölümü mono-genetik bir hastalık olarak kalıtılır. Tip II DM'de patoloji, ilk olarak periferik dokularda insülin direnci, yani normal insülin seviyelerine uygun şekilde yanıt verememe şeklinde ortaya çıkar. Telafi etmek için  $\beta$  hücreleri insülini aşırı salgılar ve sonunda ölebilir.  $\beta$  hücreleri bir tür profesyonel salgı hücresi oluşturduğundan, ER stresi ve UPR'nin, belirli kalıtsal DM formlarında  $\beta$  hücre işlev bozukluğunun yanı sıra apoptoz ile ve ayrıca tip II DM seyrinin sonlarında  $\beta$  hücre tükenmesi ile ilişkilendirilmesi şaşırtıcı değildir. Bununla birlikte daha beklenmedik bir şekilde ER stresi, tip II DM'nin erken evrelerinde, insülin sekresyonunun başarısızlığından ziyade organ insülin direncinin aşırı olduğu bir zamanda ve ayrıca immün aracılı tip I DM'de de yer almaktadır.

İnsan kalıtsal DM'nin bir formu olan Wollcott-Rallison sendromu, *PERK* genindeki varsayılan inaktive edici mutasyonlardan kaynaklanır (Delepine ve diğ, 2000). Benzer şekilde, *PERK* knockout fareler de diyabet geliştirir (Harding ve diğ, 2001). Her iki türde de, muhtemelen ER stresi kaynaklı apoptozun bir sonucu olarak, postnatal gelişim sırasında progresif  $\beta$  hücre kaybı vardır. *PERK*'in yokluğunun, özellikle insülin sentezi ve salgılanması için yüksek talep nedeniyle ER'nin katlama kapasitesinin aşıldığı dönemlerde,  $\beta$  hücrelerinin ER'ye giren proteinlerin yükünü azaltamamasıyla sonuçlanır. Bu durumla uyumlu olarak, fosforile edilemeyen bir eIF2a formuna sahip olacak şekilde tasarlanmış fareler ayrıca diyabet geliştirir (Scheuner ve diğ, 2001) çünkü *PERK*, fosforilasyon yoluyla eIF2a'yı inaktive ederek ER üzerindeki yükü azaltır. İlginç bir şekilde bu eIF2a mutant fareler, *PERK* nakavt farelerden daha erken diyabet geliştirir, bu da diğer eIF2a kinazların aracılık ettiği bazal fosforilasyon seviyesinin  $\beta$  hücrelerini ER stresinden kısmen koruduğunu gösterir. Bununla birlikte, *PERK*'in yalnızca gelişim sırasında gerekli olduğu ve yetişkin farelerin diyabetik olmamak için *PERK*'e ihtiyaç duymadığı gösterilmiştir (Zhang ve diğ, 2006). Bu nedenle *PERK*,  $\beta$  hücre farklılaşması için farelerin hayatta kalmalarından daha önemli bir rol oynayabilir. Gelişim sırasında  $\beta$  hücrelerinde yetişkin yaşamındaki kadar fazla ER stresi olup olmadığı veya *PERK*'in UPR'den ayrı bir hayatta kalma yolağı için önemli olup olmadığı bilinmemektedir. Özellikle, *PERK* eksikliği endokrin pankreas işlev bozukluğuna neden olur. Ancak, karaciğer ve plazma hücreleri gibi ER yoluyla yüksek protein akışı olan diğer dokular üzerinde belirgin bir olumsuz etkisi yoktur (Harding ve diğ, 2001). Tersine, *XBP-1* geni nakavt olan fareler, normal ekzokrin pankreas, hepatositler, plazma hücreleri ve tükürük bezleri geliştiremezler. Ancak, pankreas adacık gelişiminde doğum öncesi bir kusur göstermezler,

doğum sonrası gelişim ise perinatal ölümcüllük nedeniyle incelenemez (Lee ve diğ, 2005). Bu nedenle UPR'nin çeşitli dallarının, farklı salgı hücre türleri için açıkça önemli farklılıkları vardır. Muhtemel bir açıklama, hücre tipine özgü UPR yollarının ve/veya bunların hedeflerinin olmasıdır. Gerçekten de, Wolfram sendromu (bir başka kalıtsal DM formu) olan kişilerde mutasyona uğrayan *WFS1* geninin ürünü (Inoue ve diğ, 1998; Strom ve diğ, 1998) çoğunlukla pankreastaki  $\beta$  hücrelerinde eksprese edilen PERK'e yanıt veren bir proteindir (Fonseca ve diğ, 2005; Ueda ve diğ, 2005).  $\beta$  hücrelerinde hedeflenen *WFS1*'in nakavt edilmesi, bu hücrelerin ER stresi ve apoptozu ile sonuçlanır (Ishihara ve diğ, 2004; Riggs ve diğ, 2005). Bu nedenle, PERK eksikliğinin, en azından kısmen *WFS1*'in yukarı regüle edilememesi nedeniyle  $\beta$  hücre kaybına neden olması olasıdır. eIF2a fosforilasyon kaybının aynı zamanda *WFS1* ekspresyonunun azalmasına yol açıp açmadığını ve *WFS1*'in zorla ifadesinin eIF2a fosforilasyon kaybının neden olduğu DM'yi en azından kısmen kurtarıp kurtaramayacağını belirlemek önemli olacaktır. Her durumda,  $\beta$  hücre gelişiminde çalışan yolları anlamak ve örneğin gelişimin belirli aşamalarında dokuya özgü gen nakavtlarını kullanarak *PERK*'in hem yukarı hem de aşağı yönlü işlevlerini görmek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

İnsülinin kendisindeki kalıtsal bir kusur da farelerde ER stresi yoluyla DM'ye yol açabilir. Akita fareleri olarak adlandırılan fareler, *İNSÜLİN-2* geninde bir yanlış anlamlı mutasyon içerir (Wang ve diğ, 1999). Hem heterozigot hem de homozigot olan bu fareler, yaşamın erken dönemlerinde DM geliştirir. Farelerde insülin için iki lokus bulunduğu ve *İNSÜLİN-2* geninin her iki kopyasının devre dışı bırakılması diyabetik bir fenotipe yol açmadığından, DM'nin dolaşımdaki yetersiz miktarda insülin kaynaklanmadığı açıktır (Leroux ve diğ, 2001). Bunun yerine, Akita fareleri tarafından sentezlenen mutant insülin yanlış katlanır ve ER'de birikir, bu da ER stresine ve ardından  $\beta$  hücre hasarına ve apoptoza yol açar (Oyadomari ve diğ, 2002). ER stresinin hastalık patogenezindeki rolüne bir başka örnek ise, *CHOP* ekspresyonunu devre dışı bırakmanın, heterozigot farelerde *İNSÜLİN-2* mutasyonu için diyabetin başlamasını geciktirdiği gözleminden kaynaklanır (Oyadomari ve diğ, 2002). İnsülin geninin kodlama bölgesindeki mutasyonların insan diyabetinde rol oynadığına dair hiçbir kanıt olmamasına rağmen, Akita faresi ER stresinin  $\beta$  hücre kaybının önemli bir nedeni olabileceğini doğrulamaktadır.

İnsanlarda Tip I DM, sıklıkla  $\beta$  hücrelerine karşı bir otoimmün reaksiyondan kaynaklanır. ER stresi de bu DM formunda yer almıştır. İnflamatuar hücreler tarafından salınan sitokinler ve nitrik oksit, muhtemelen ER stresini indükleyerek UPR'yi aktive ettiği gösterilmiştir (Cardozo ve diğ, 2005; Oyadomari ve diğ, 2001). Bununla birlikte,

model organizmalarda UPR'nin hiçbir deneysel manipölasyonu gerçekleştirilmemiştir. Bu nedenle, ER stresinin DM hastalık patogenezi ile ilgili olup olmadığı açık değildir.

$\beta$  hücreleri içindeki ER stresinin tip II DM'de rol oynadığına dair kanıtlar da vardır. ER stresi, doğuştan obez *db/db* farelerin ve tip II DM'li insan hastaların  $\beta$  hücrelerinde bulunmuştur (Laybutt ve diğ, 2007). Kronik hipergliseminin kendisinin (Lipson ve diğ, 2006) yanı sıra serbest yağ asitlerinin de  $\beta$  hücrelerinde doğrudan UPR'yi indüklediği gösterilmiş olmasına rağmen (Cnop ve diğ, 2007) bu durum belki de insülin direncinin üstesinden gelmek için uzun vadeli artan salgılama talebinden kaynaklanmaktadır. Tip II DM'de heterozigot fareler, fosforile edilemeyen eIF2a ER stresi için mekanik bir rolü desteklemek üzere, obezite kaynaklı DM geliştirmeye yönelik artan bir eğilim göstermiştir (Scheuner ve diğ, 2005). Bu veriler, obezitenin neden olduğu insülin direnci ortamında artan insülin sekresyonu talebinin neden olduğu ER stresi nedeniyle  $\beta$  hücrelerinin işlev bozukluğu veya ölümü ile açıklanabilir. Bununla birlikte, verilerin yorumlanması, insülinin hedef organlarında (yani karaciğer, yağ dokusu ve iskelet kası) ER stresi ve insülin direnci arasındaki ilişkinin ortaya çıkmasıyla oldukça karmaşıktır. Özcan ve arkadaşları (Özcan ve diğ, 2004) tarafından obezitenin karaciğerde ER stresini indükleyip daha sonra IRE1 ve JNK aktivasyonu yoluyla insülin reseptör substratı 1 fosforilasyonu ile insülin sinyalleşmesinin inhibisyonuna yol açtığı bir çalışma vardır. Bir başka çalışmada ise, CHOP ile indüklenen protein TRB3 tarafından Akt'nin inhibisyonudur (Du ve diğ, 2003). Leptin eksikliği olan *ob/ob* farelerinin, salgı proteinlerinin uygun şekilde katlanması için şaperon görevi gören küçük moleküller ile tedavisi, karaciğerdeki ER stresinin giderilmesi, kan glikoz seviyelerinin normalleşmesi, insülin duyarlılığının restorasyonu ve steatoz (basit karaciğer yağlanması) kaybı ile sonuçlanmıştır (Özcan ve diğ, 2006). Dikkat çekici bir şekilde, bu şaperonlar hem hepatik glikoz çıkışını baskılamış hem de periferik dokularda, muhtemelen iskelet kası ve yağ dokusunda artan glikoz atılımını engellemiştir. Benzer şekilde Nakatani ve ark., obez *db/db* farelerin de karaciğerde ER stresinden muzdarip olduğunu göstermiştir (Nakatani ve diğ, 2005). ER stresini hafifletmeye yardımcı olan tek bir ER şaperon proteini olan oksijen regüleli protein 150 (ORP150)'nin karaciğere özgü aşırı ekspresyonu, glikoz toleransında ve insülin duyarlılığında belirgin bir iyileşme sağlarken, genetik olarak normal farelerin karaciğerinde ORP150 ekspresyonunu azaltıp insülin duyarlılığının azalmasına neden olmuştur (Nakatani ve diğ, 2005). Bu çalışmalar, insülin direncine neden olarak ER stresinin önemini teyit etmekte ve bu model organizmalarda diyabetin iyileşmesine yol açanın  $\beta$  hücrelerinden ziyade hedef dokularda ER stresinin hafifletilmesi olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, eIF2a yolundaki

heterozigot kusurların  $\beta$  hücrelerinde, hedef organlarda veya her ikisinde de etkileri yoluyla tip II DM riskini artırıp arttırmadığını belirlemek önemli olacaktır. UPR'ye dahil olan çeşitli genlerin dokuya özgü nakavtına sahip fareler, bu konuda yine son derece faydalı olacaktır. Ayrıca insülin direncinin gelişmesinde ER stresi ve UPR'nin rolüyle tutarlı olarak, ATF6 $\alpha$  polimorfizmleri hem Pima yerlilerinde hem de Kuzey Kafkasya'dan göç eden Hollandalılar'da tip II DM ile ilişkilendirilmiştir (Thameem ve diğ, 2006; Meex ve diğ, 2007).

Obezitenin periferik dokularda ER stresini indüklenme mekanizması, serbest yağ asitlerinin olaya dahil olmasına rağmen hala belirsizdir (Kharroubi ve diğ, 2004). Ne olursa olsun, tip II DM'nin çoklu evreleri ve ilişkili organları için ER stresinin potansiyel önemi göz önüne alındığında, ER stresini hafifletmeye yardımcı olan küçük moleküler şaperonların sistemik uygulanması, bu yaygın ve yıkıcı hastalıkta potansiyel olarak üç kat faydalı olabilmektedir. Bu fayda şu şekilde özetlenebilir: glikoz çıkışını azaltarak karaciğerden, periferik dokular tarafından glikoz kullanımının artırılması ve artan talep ve/veya hipergliseminin neden olduğu ER stresinin bir sonucu olarak  $\beta$  hücrelerinin kaybının önlenmesi. Bununla birlikte, ER stresi koşulları altında  $\beta$  hücre sağkalımının, muhtemelen protein birikiminin neden olduğu oksidatif strese karşı yardımcı olan antioksidan genlerin ekspresyonuna yol açarak, PERK'in aşağı akış hedefi olan ATF4'ün ekspresyonu ile ER stresi iyileştirdiği belirlenmiştir (Harding ve diğ, 2003). Benzer şekilde, *db/db* farelerinin glukagon benzeri peptit reseptörü 1'e bağlanan ve cAMP yoluyla ATF4 ekspresyonunu artıran bir molekül olan eksendin-4 ile tedavisi, bu obez farelerde DM'yi iyileştirmiştir (Yusta ve diğ, 2006). Bu nedenle, birikmiş tüm ER proteinlerini temizlemeden veya UPR'nin diğer aşağı akış efektörlerini bloke etmeden ATF4'ün sentezini engelleyebilen ER stresinin kısmi rahatlaması, paradoksal olarak  $\beta$  hücrelerinin ölümünü maalesef artırabilir. UPR'nin hücre üzerinde uyguladığı ikili koruyucu ve proapoptotik etkiler ışığında böyle bir etki şaşırtıcı olmayacaktır. Örneğin, eIF2a'nın geçici fosforilasyonu, hücreleri ER stresinin neden olduğu apoptoza karşı korur (Lu ve diğ, 2004), ancak eIF2a fosforilasyonunun aşağı akışındaki bir transkripsiyon faktörü olan CHOP, muhtemelen ER protein yükünü ve oksidatif stresi artırarak hücre ölümüne neden olur (Marciniak ve diğ, 2004). Açıkçası, uygun terapötik dozajların yanı sıra çeşitli kimyasal şaperonların yararlılığını belirlemek için çeşitli model organizmalarda uzun süreli tedavi boyunca her farklı doku türünün daha ayrıntılı analizi gereklidir.

#### **2.4.2 Endoplazmik retikulum stresi ve osteoporoz**

Osteoporoz yaşlılarda kemik ağrısı, azalmış kemik gücü, artan kemik kırılabilirliği ve doku mikromimarisinin dejenerasyonu ile karakterize yaygın bir sistemik metabolik hastalıktır. Osteoporoz, düşük kemik mineral yoğunluğu (BMD) ile kendini gösterir. Düşük BMD, endoplazmik retikulum stresi ile ilişkilidir. PERK-eIf2 $\alpha$  sinyal yolu, doğumdan sonra pankreas ve iskelet kası sistemlerinin büyümesi ve gelişmesi için gereklidir (Zhang ve diğ, 2002; Harding ve diğ, 2001). ATF4, osteoblastlar içinde osteokalsin ekspresyonunu uyarmak için cbfa1 ile sinerji oluşturabilen bir PERK yolu aşağı akış hedef molekülüdür. Bu durum, ATF4'ün osteoblast farklılaşması, olgunlaşması ve kemik gelişiminde önemli bir rol oynadığını gösterir.

Osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki denge, normal kemik büyümesi ve gelişimi için önemlidir. Çalışmalar, fosfataz inhibitörü salubrinal'in, eIf2a fosforilasyonunu inhibe ederek osteoblast farklılaşmasını artırabildiğini göstermiştir. Bu nedenle, endoplazmik retikulum stresinin eIf2a ve ATF4 tarafından düzenlenmesinin osteoporoza karşı engellenebileceği tahmin edilmektedir. İnsülin eksikliği ve hiperglisemi, düşük kemik-mineral yoğunluğuna neden olarak kemik oluşumunu bozduğu için diyabetik hastalarda kalça ve üst ekstremitte kırıklarına yatkınlık vardır. Ek olarak, diyabetin kendisinin, osteoblastlarda endoplazmik retikulum stresi karakteristiği olan apoptotik yoldaki proteinlerin ekspresyonunu indükleyebildiği ve osteoblast apoptozuna yol açabileceği bildirilmiştir (Liu ve diğ, 2013). Böylece, osteoblast/osteoklast oranındaki bir dengesizlik iskelet bozukluklarına yol açar ve sonunda diyabetik osteoporoza ilerler. Patolojik koşullar altında, IRE1a - XBP1 yolu, osteoblast olgunlaşmasında, kemik oluşumunda ve kemik erimesinde önemli bir rol oynar (Tohmonda ve diğ, 2012). Ayrıca yapılan çalışmalar, GRP78/BiP ve protein disülfid izomeraz gibi endoplazmik retikuluma özgü şaperonların osteoporoz hastalarından alınan osteoblast örneklerinde azaldığını bildirmiştir (Hino ve diğ, 2010). Bu bulgular, ER stresinin osteoporoz ve iskelet gelişimi ile yakından ilişkili olduğunu ve ER stresinin kemik hastalıkları için terapötik bir anahtar olarak kullanılabileceğini akla getirmektedir.

#### **2.4.3 Endoplazmik retikulum stresi ve nörodejenerasyon**

Retinitis pigmentosa (RP), kalıtsal retina dejenerasyonunun en yaygın nedenidir ve gözdeki (Berson, 1993) ışığı algılayan ve bu bilgiyi beyne ileten özelleşmiş çubuk fotoreseptör nöronlarının ilerlemiş kaybına bağlıdır. Işığı algılamak için fotoreseptörler

yapısal olarak, fotoreseptör hücresindeki tüm proteinlerin %30'unu oluşturan ve ışığa duyarlı bir kromofor olan rodopsin üretir. Rodopsin, ışığa duyarlı küçük molekül 11-cis-retinale kovalent olarak bağlanmış 348 amino asit transmembran apoprotein opsin'den oluşur. Opsin protein katlanması, yeni oluşan polipeptidin, stabil bir fonksiyonel konformasyon için gerekli olan disülfid bağ oluşumuna ve glikozilasyon modifikasyonlarına maruz kaldığı ER'de meydana gelir. Düzgün bir şekilde katlandığında, opsin ER'den çıkar ve rodopsin oluşturmak üzere bir lizin kalıntısında 11-cis-retinale kovalent olarak bağlandığı çubuk fotoreseptör dış segmentine taşınır. Işık rodopsine çarptığında, 11-cis-retinal, 11-trans-retinale izomerleşir. Işıkla aktive olan bu durumda rodopsin, bir elektrik sinyalinin üretilmesine ve görsel sinir devresinin aktivasyonuna yol açan bir biyokimyasal sinyal transdüksiyon yolağı başlatır.

Çoğu RP vakası, *OPSİN* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Rodopsin'de retinal dejenerasyonuna yol açan yüzün üzerinde farklı mutasyon tanımlanmıştır ve Amerika Birleşik Devletleri'nde otozomal dominant RP'ye yol açan en yaygın rodopsin mutasyonu, opsinin 23. pozisyonunda (P23H) bir prolinin histidine değişmesidir (Sohocki ve diğ, 2001). P23H mutasyonunun rodopsin olgunlaşması ve işlevi üzerindeki biyokimyasal ve hücrel sonuçları kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve P23H-rodopsin'in ER'de yanlış katlandığı sonucuna varılmıştır (Liu ve diğ, 1996; Kaushal ve Khorana, 1994; Sung ve diğ, 1991). Yabanıl tip protein ile karşılaştırıldığında P23H-rodopsin, tripsine karşı anormal hassasiyet gösterir. P23H-rodopsin yetersiz bir şekilde glikozile edilir. P23H-rodopsin, ER'de yerleşik şaperonlarla ilişkili bulunmuştur. P23H-rodopsin birincil olarak ER/Golgi'de lokalize olurken, yabanıl tip rodopsin yüzey zarında bulunur. *In vitro*, P23H-rodopsin, 11-cis-retinale bağlanmada başarısız olur ve işlevsel bir ışık sensörü olarak fonksiyon gösteremez. Sonuç olarak P23H-rodopsin eksprese eden fotoreseptörler, tam olarak anlaşılamayan bir mekanizma yoluyla ölürlür. Bununla birlikte bir araştırmada, *Drosophila*'daki P23H-rodopsin ekspresyonunun sağlam *XBP-1* mRNA uçbirleştirmesini tetiklediği gösterilmiştir (Ryoo ve diğ, 2007). Kümülatif olarak tüm bu bulgular, yanlış katlanmış P23H-rodopsin'in ER stresine neden olduğuna ve otozomal dominant RP'de rodopsin yanlış katlanmasından kaynaklanan retinal nörodejenerasyona neden olan UPR sinyalini içerdiğine dair hücrel ve genetik kanıtlar sağlamaktadır.

Alzheimer hastalığı, hipokampus ve bazal ön beyinde seçici nöronal kayıp ile karakterizedir. Plaklar ve yumaklardan oluşan anormal protein kümeleri, Alzheimer'ın patognomonik özellikleridir. Birincil insan Alzheimer beyin dokularının ölüm sonrası çalışması, UPR aktivitesinin spesifik belirteçleri için gelişmiş ER şaperon ekspresyonu ve

immünohistokimyasal reaktivite formunda ER stresinin kanıtını sağlamıştır (Unterberger ve diğ, 2006; Hoozemans ve diğ, 2005). Bununla birlikte, Alzheimer'daki kümelenmiş proteinler (yumaklar ve plaklar) ER içinde bulunmadığından bu bulgular, Alzheimer'da UPR sinyalini aktive eden ER stresinin kaynağı sorusunu gündeme getirmektedir.

$\beta$ -amiloid, Alzheimer hastalarında bulunan önemli bir yanlış katlanmış polipeptittir ve salgı yolunda olgunlaşması sırasında trans-membran  $\beta$ -amiloid öncü proteinin proteolitik işlenmesinden kaynaklanır (Selkoe, 2001).  $\beta$ -amiloidin nörotoksitesi deneysel sistemlerde gösterilmiştir ve en azından kısmen Alzheimer'da gözlemlenen patolojik değişikliklerin altında yattığı öne sürülmüştür (Schenk ve diğ, 1999).  $\beta$ -amiloidde yanıt olarak sitotoksositeye aracılık eden sinyal yolları, yoğun bir çalışma alanıdır ve birkaç araştırma, UPR'yi  $\beta$ -amiloidin sitotoksitesine dahil etmiştir. Hücre kültür sistemlerinde yapılan bu araştırmalarda  $\beta$ -amiloid ekspresyonunun, ER şaperon seviyelerini ve aktive edilmiş kaspaz-12'yi (Ferreiro ve diğ, 2006) arttırmasının yanında kaspaz-4'ün yıkılması veya kaspaz-12'nin nakavt edilmesiyle,  $\beta$ -amiloid aracılı sitotoksositeye direnç kazandırıldığı bulunmuştur (Nakagawa ve diğ, 2000; Hitomi ve diğ, 2004). Kültürlenmiş Ask1<sup>-/-</sup> nöronlarının,  $\beta$ -amiloid sitotoksitesine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir (Kadowaki ve diğ, 2005). Bu nedenle, IRE1-ASK1-JNK yolu  $\beta$ -amiloid aracılı hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde, sıçan PC12 hücrelerinde  $\beta$ -amiloidin ekspresyonu, diğer IRE1a ve PERK yan sinyal yollarını indüklemeyen ASK1 ve JNK sinyalleşmesini seçici olarak aktive etmiştir (Kadowaki ve diğ, 2005). Birlikte ele alındığında bu bulgular  $\beta$ -amiloidin, nöronlarda sitotoksositeye aracılık etmede UPR sinyal yollarının ayrı bileşenlerini seçici olarak kullanma olasılığını akla getirmiştir. Fakat, yabancı tipte  $\beta$ -amiloid öncü proteinin ekspresyonu, sadece mutant amiloidojenik  $\beta$ -amiloid öncü proteininden değil, aynı zamanda hücreleri ER stresinin neden olduğu apoptozdan da korumuştur (Koge ve diğ, 2003; Esposito ve diğ, 2004). Sonuçta bu durum, hastalığın gerçekte nöronların karşılaştığı bazal ER stres seviyesine karşı  $\beta$ -amiloid öncü proteininin koruyucu bir fonksiyonunun kaybından kaynaklanma olasılığını yükseltmiştir.

ER stresi ve UPR aktivasyonu, kusurlu presenilin işlevine bağlı olarak Alzheimer hastalığında da ortaya çıkabilir. Presenilinler,  $\beta$ -amiloid üretmek için  $\beta$ -amiloid öncü proteininin proteolizinde yer alan  $\gamma$ -sekretaz enzimatik kompleksinin katalitik alt birimi olarak meydana getirdikleri görev için çok iyi çalışılmış olan, ER'de yerleşik zar proteinleridir (Koo ve Kopan, 2004). Presenilinlere ayrıca, ER lümeninden kalsiyum çıkışına izin veren iyon kanalları olarak hareket ettikleri ikinci bir bağımsız görev atanmıştır (Tu ve diğ, 2006). Presenilinlerde, ailesel Alzheimer hastalığı formlarına neden

olan çok sayıda mutasyon tanımlanmıştır (Tandon ve Fraser, 2002). Bu mutasyonlar, presenilin *in vitro* iyon kanalları oluşturma yeteneğini bozar ve ER lümenindeki kalsiyum seviyeleri, yabancı tip presenilin ile karşılaştırıldığında ailesel Alzheimer hastalığı ile ilişkili presenilinleri eksprese eden hücrelerde önemli ölçüde yüksektir (Tu ve diğ, 2006; Leissring ve diğ, 2000; Yoo ve diğ, 2000). ER kalsiyum homeostazının farmakolojik bozulmasının UPR sinyal yollarını aktive ettiği iyi bilinmektedir. Tipik olarak, bu ajanlar ER lümenindeki kalsiyum havuzunu tüketerek ER stresine neden olur. Örneğin, thapsigargin kalsiyumu bağladığında ve sitozolden kalsiyum alımını engellediğinde ER stresi meydana gelir (Lytton ve diğ, 1991). Presenilin disfonksiyonu tarafından indüklenen ER kalsiyum aşırı yüklenmesinin ER'nin protein katlama ortamını ve UPR'nin aktivitesini nasıl etkilediği çok net değildir. Bununla birlikte artan ER içi kalsiyum konsantrasyonu, ER stresini takiben artan apoptoza yol açabileceğinden (Oakes ve diğ, 2006) presenilin'deki mutasyonların, hipoksi veya besin açlığı gibi koşullar tarafından dış ortamdan indüklenen hafif fakat tekrarlanan ER stresine karşı nöronları duyarlı hale getirmesi de mümkündür (Bailly-Maitre ve diğ, 2006). Alzheimer hastalığının ilerleyici ve uzun seyri göz önüne alındığında, bağımsız olarak ER stresini ortaya çıkaran çoklu kronik hareketler, nöronlara zarar vermek için mutant presenilin ile kümülatif olarak sinerji oluşturup kişiye oldukça büyük zararlar verebilir.

#### **2.4.4 Endoplazmik retikulum stresi ve kanser**

Kanser gelişimi transforme hücrelerin her zaman kontrolsüz büyümesi ve proliferasyonu ile karakterize edilir. Bu durum, kompakt bir hücre kümesi yani en azından katı tümörler için oksijen ve glikoz eksikliği ile karakterize bir tümör ortamı ve ayrıca iyi karakterize edilmiş ER stres uyaranları olan iki koşul ile sonuçlanır. Bu nedenle, UPR aktivasyonunun, ER stres ana proteini olan GRP78'in yukarı regülasyonu ile birlikte birkaç insan kanserinin ayırt edici özelliğini temsil etmesi hiç de şaşırtıcı değildir. Aslında UPR aktivasyonu, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar. Sonuç olarak bu durum, olumsuz çevresel koşullara uyumu artırır ve geleneksel kemoterapiye direnci destekleyen uyku halini tetikleyerek tümörün büyümesinin durmasına yol açar (Fels ve Koumenis, 2006; Ranganathan ve diğ, 2006; Romero-Ramirez ve diğ, 2004; Shuda ve diğ, 2003). UPR ayrıca önemli olarak, özellikle hipoksi ve glikoz eksikliğinin tümör büyümesini tehlikeye atabileceği erken hücre proliferasyonu sırasında tümörle uyarılan anjiyogenezde yer alır. Aslında UPR ve hipoksi, ana gen *VEGF*'nin ekspresyonunu sırasıyla PERK/ATF4 ve HIF1/2 yollarıyla uyararak bağımsız olarak anjiyogenezini indükleyebilmesine rağmen,

iki sinyal yolunun eşzamanlı aktivasyonu, *VEGF*'nin etkileyici bir şekilde yukarı regülasyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle, yalnızca iki bağımsız uyarının (*ATF4* ve *HIF* tarafından) toplamı, güçlü bir şekilde anjiyogenezi uyarır. Aslında bu fenomen, hem *VEGF* promotörünün iki transkripsiyon faktörü tarafından pozitif olarak düzenlenmesinin hem de *VEGF*'e ait mRNA'nın stabilizasyonunun bir sonucudur. Böylece, hep birlikte tutarlı bir şekilde arttırılmış gen ekspresyonu meydana gelir (Pereira ve diğ, 2014; Garg ve diğ, 2014).

UPR'nin tümörjenezdeki rolüne bir örnek olarak melanomajenez verilebilir. Gerçekten de *NRAS* veya *BRAF* mutasyonları, melanom gelişimini yönlendiren ana gücü temsil etseler de, bu mutasyonlar aynı zamanda iyi huylu nevüslerde de mevcut olduğundan, "kendi başlarına" yeterli değildirler. Bu nedenle, melanosit transformasyonu ve melanom gelişimini yönlendirmek için diğer faktörlerin gerekliliği vurgulanmaktadır (Cantwell-Dorris ve diğ, 2011; Aguisa-Touré ve Li, 2012). Elde edilen bazı kanıtlar ER stresinin, melanom gelişiminde önemli bir ikincil durum oluşturduğunu ve pro-apoptotik proteinler yerine hayatta kalmanın kalıcı ifadesi yoluyla apoptoza karşı dirence katkıda bulunduğunu göstermiştir (Hersey ve Zhang, 2008). Ayrıca bu bağlamda UPR indüksiyonu sırasıyla bazal otofaji artışı, tümör hücresinin hayatta kalması, tümörün büyümesi ve kemoterapiye direnç ile sonuçlanır (Giglio ve diğ, 2015; Corazzari ve diğ, 2015; Corazzari, 2013). Bununla birlikte UPR'nin üç kolunun, farklı tümör tiplerinde ve ayrıca ilginç bir şekilde gelişme, ilerleme ve tedaviye direnç gibi çeşitli tümör "*fazlarında*" farklı şekilde etkilenebileceğini göstermektedir. Aslında bu görüşü destekleyen örneklerden birkaçı, IRE1 sinyalinin hepatosellüler karsinom başlangıcı sırasında çok önemli olduğu ve tümör oluşturulduktan sonra PERK aktivasyonunun gerekliliğidir (Vandewynckel ve diğ, 2014). PERK sinyali, kolorektal karsinomda kanser hücrelerinin hipoksik strese karşı adaptasyonunda kritik bir faktördür (Blais ve diğ, 2006). Ayrıca PERK sinyali, skuamöz hücreli karsinomda olumsuz mikroçevresel koşullar altında tümör dormansisini desteklemektedir (Ranganathan ve diğ, 2006). Hem *GRP78* yukarı regülasyonundan hem de *XBP1* üretiminden sorumlu olan UPR yolları, tümör hücrelerinin glikoz yoksunluğuna verdiği yanıtta, tümör hücresinin hayatta kalmasının sürdürülmesiyle de ilişkilendirilmektedir (Spiotto ve diğ, 2010; Shiu ve diğ, 1977). Bununla birlikte, üç UPR sinyal faktörünün hepsinin birlikte aktive olduğu ve aynı anda prostat kanserinin malign ilerlemesinde rol oynadığı gözlemlenmiştir (Liu ve diğ, 2017).

ER stres yanıtına karşı ortaya çıkan UPR'nin tümörigeneze katkısı olarak kanser hücrelerine stresle başa çıkma yeteneği verilmesi, tümör büyümesi, ilerlemesi ve tedaviye

direnç ile sonuçlanan ana özelliği ile ilişkilendirilmesine rağmen, UPR'nin başka bir karanlık tarafı daha ortaya çıkmakta ve kanser durumunda *ATF6*, *IRE1* ve *PERK* olmak üzere UPR sensör genlerinde meydana gelen mutasyonlara dayanmaktadır. Aslında elde edilen veriler ışığında, bu genlerde hatalı, anlamsız ve sessiz mutasyonların varlığı ortaya çıkarılmıştır. Mutasyon türü bakımından *PERK*'te yanlış anlamlı mutasyonlar, *ATF6*'da anlamsız mutasyonlar ve *IRE1*'de ise sessiz mutasyonlar mevcuttur. Bununla birlikte bu mutasyonların, hücre transformasyonu ve tümör gelişimi üzerindeki etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla analiz yapılması gerekmektedir (Greenman ve diğ, 2007). Daha da önemlisi mutasyon oranları kanserler arasında farklılık gösterdiğinden, bu mutasyonların tümör veya dokuya özgü önemi üzerinde durulmaktadır (Chevet ve diğ, 2015). Bu nedenle, tümörigenezin tüm aşamalarında ve/veya fazlarında UPR'nin yer almasına rağmen, UPR'nin kanser üzerindeki gerçek etkisini tam olarak belirlemek için tümöre özgü her bileşenin görevinin saptanabilmesi için daha fazla çalışmanın gerekli olduğu çok açıktır.

Hipoksinin ER içindeki normal oksidatif ortamı bozduğu ve böylece proteinin yanlış katlanmasına yol açtığı düşünülmektedir. Hipoksi, kültürlenmiş memeli hücre hatlarında güçlü bir PERK sinyali tetikleyicisidir (Koumenis ve diğ, 2002; Bi ve diğ, 2005). Önceden bahsedildiği gibi PERK aktivitesi, translasyon başlatma faktörü eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonuna ve hücredeki mRNA'ların büyük çoğunluğunda protein sentezinin baskılanmasına yol açar. PERK'in veya aşağı akış efektörleri eIF2 $\alpha$  ve ATF4'ün işlevini bozan genetik mutasyonlar taşıyan hücrelerin tümü, düşük oksijen seviyeleri ile muamele edildiğinde hayatta kalma ve çoğalma düzenlerinde bozulma gözlenir (Koumenis ve diğ, 2002; Bi ve diğ, 2005). Sonuç olarak bu tarz araştırmalar, PERK sinyalinin hipoksi sırasında hücre sağkalımını destekleyebileceğine dair genetik kanıt sağlamaktadır.

Kanser hücresinin hızlı proliferasyonu damar sisteminin oksijen verme yeteneğini geride bıraktığından, katı tümörlerde hipoksi sıklıkla gelişir. Kanserde hipoksinin varlığı kemo ve radyoterapiye direnç, metastaz olasılığının artması ve kötü prognoz dahil olmak üzere önemli klinik etkilere sahiptir (Koumenis, 2006). Birkaç çalışma, PERK sinyalini gelişmiş tümör büyümesi ve hipoksik koşullar altında hayatta kalma ile ilişkilendirmiştir. Biet ve ark. (Bi ve diğ, 2005) melanomlar, glioblastoma, meme ve serviks kanserleri dahil olmak üzere çok çeşitli birincil insan tümörlerinde PERK aktivasyonunun moleküler kanıtını elde etmişlerdir. Aynı araştırmada, PERK veya eIF2 $\alpha$  işlevine sahip kötü huylu murin hücrelerinin daha küçük tümörler oluşturduğu ve apoptoza daha yatkın olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Tümör büyümesine dayalı bir başka fare modelinde, Blais ve ark. (Blais ve diğ, 2006) PERK sinyali kesildiğinde bozulmuş vaskülogenez ve kanser

hücreleri proliferasyonu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, bu bilim insanları şaşırtıcı bir şekilde birkaç anjiyogenezi teşvik eden gende uORF'leri (yukarı akış açık okuma çerçeveleri) tanımladılar ve çevirilerinin, mRNA'dan geliştirilmiş protein sentezine benzer bir şekilde PERK sinyali tarafından uyarıldığını öne sürmüşlerdir. Bu araştırmalar, tümör hücrelerinin (a) translasyonel aktiviteyi azaltarak hipoksik bir ortamda canlılığı arttırmak, böylece hücre içindeki metabolik talepleri azaltmak ve (b) düşük oksijen seviyelerine tepki olarak anjiyojenik faktörlerin üretimini artırarak tümör büyümesini teşvik etmek için PERK sinyalinin manipüle ettiği bir model önermektedir.

PERK'in proapoptotik fonksiyonlarının tümörizasyondaki rolü hakkında az şey bilinmektedir. PERK tarafından translasyonun zayıflatılması ölçülü olarak koruyucu faydalar sağlarken, protein sentezi hücre fonksiyonları sürdürmek için gerekli seviyelerin altına düşerse sonuçta bu durum hücre için zararlı olacaktır. Tümör hücrelerinin özellikle PERK tarafından translasyonun zayıflatılmasına toleranslı olup olmadığı açık değildir. PERK sinyali ayrıca *CHOP* geninin spesifik transkripsiyonel indüksiyonu ve aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü doğrudan desteklemektedir (Zinszner ve diğ, 1998). Solid tümörlerde, *CHOP*'un belirli koşullar altında antiapoptotik fonksiyonlara sahip olabileceği akılda tutulmalıdır. Ayrıca, PERK sinyalinin bu bölgelerde apoptozu teşvik edebileceğini gösteren artmış *CHOP* seviyeleri de bildirilmiştir (Arnal ve diğ, 1999; Forus ve diğ, 1994; Southwood ve diğ, 2002; Mayerhofer ve Kodym, 2003). Tümör hücrelerinin, PERK sinyalinden oluşturulan sitotoksik sonuçlara karşın kendisi için faydalı durumları nasıl dengelediği açık değildir. Merkezi nekroz alanları sıklıkla hızla büyüyen katı tümörlerde gözlenir ve hipoksiden sonra tetiklenen PERK sinyalinin koruyucu veya toksik özellikleri arasındaki dinamik geçişin belirtileri olabilir. PERK sinyalinin seçici modülasyonu, vasküler büyümeyi ve oksijen kaynağını kontrol eden ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında ise tümör ilerlemesini inhibe etmek için terapötik fırsatlar sağlayabilir.

PERK'in aracılık ettiği hipoksik koşullar altında tümör hücrelerinin hayatta kalması, UPR'nin karsinogenezde yer alabileceği tek mekanizma değildir. XBP-1 ve ER şaperon GRP78 dahil olmak üzere UPR'nin diğer bileşenlerinin de birçok kanserde yukarı doğru düzenlendiği ve tümör büyümesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Romero-Ramirez ve diğ, 2004; Jamora ve diğ, 1996). Ayrıca ER stresinin, tümör baskılayıcı p53'ün bozulmasını arttırdığı gösterilmiştir (Pluquet ve diğ, 2005). Bu nedenle, ER stresinin habis transformasyonu destekleyebileceği birçok farklı mekanizma olabilir ve UPR'nin manipülasyonunun kanseri tedavi etmek için yeni bir modalite olduğu kanıtlanabilir.

Multipl miyelom, immüoglobulin salgılayan plazma hücrelerinin transformasyonundan kaynaklanan hematolojik bir malignitedir. Hem normal hem de transforme plazma hücrelerinin ayırt edici bir özelliği, immüoglobulin sentezine uyum sağlamak için ER'nin kapsamlı olarak genişlemesidir. UPR'nin IRE1 kolu, plazma hücresi üretimi için gereklidir ve IRE1 $\alpha$ 'nın veya onun aşağı akış efektörü XBP-1'in genetik ablasyonu, öncü  $\beta$ -lenfositlerden plazma hücrelerinin gelişimini ciddi şekilde tehlikeye atar (Reimold ve diğ, 2001; Zhang ve diğ, 2005). IRE1 sinyali immüoglobulin üretimi ve salgılanması için ER'nin protein katlama kapasitesini optimize ederek plazma ve multipl miyelom hücrelerinde XBP-1 üretimini artırır (Shaffer ve diğ, 2004). Ancak, muhtemelen plazma hücrelerinde ve bunların öncül lenfositlerinde XBP-1'in aşırı ekspresyonu transgenik farelerde multipl miyelom benzeri bir hastalığın gelişmesine neden olduğu için XBP-1, plazma hücrelerinin gelişiminde ve proliferasyonunda ek roller de oynamaktadır (Carrasco ve diğ, 2007). Şaşırtıcı bir şekilde, normal gelişim ve fonksiyon için plazma hücrelerinde IRE1 sinyali aktive edilirken, UPR'nin PERK yolağı bu hücrelerde gereksiz ve/veya inaktif görünmektedir (Zhang ve diğ, 2005). PERK yokluğunda IRE1'in seçici aktivasyonu, plazma hücrelerinde IRE1 sinyalini tetikleyen fizyolojik uyarıcının kimliği sorusunu gündeme getirmektedir. Çünkü en azından hücre kültürü çalışmalarında ER stresini ortaya çıkaran ajanlar, hem IRE1 hem de PERK sinyalini aktive eder. Plazma hücreleri, gelişimleri sırasında spesifik olarak farklı UPR sinyal yollarını kullanmak için transkripsiyon faktörü Blimp1 gibi hücre tipine özgü mekanizmalar kullanabilir (Shaffer ve diğ, 2004).

#### **2.4.5 Endoplazmik retikulum stresi ve viral enfeksiyonlar**

Zarflı virüslerin morfogenezi için büyük miktarda zar proteiniyle birlikte lipidin kullanılması gerektiğinden ve ayrıca zarfsız birçok virüsün bile replikasyon ve/veya morfogenezi için hücre içi zarlara ihtiyaç olduğundan, birbiriyle ilgisiz çeşitli virüslerin indüklediği ER stresinin yanı sıra bu virüsler tarafından UPR'nin manipüle edilmesi şaşırtıcı değildir. Buna ek olarak diğer hastalıklarda olduğu gibi, her bir virüs ile konakçı tarafından meydana getirilen UPR arasındaki etkileşim karmaşıktır ve henüz tam olarak anlaşılammıştır. UPR'nin PERK yolu PKR (bu kinaz, hücrel antiviral silahlanmanın bir parçası olduğu bilinen çift sarmallı RNA ile aktive olan bir protein kinazdır) ile homolog olduğundan ve benzer kinaz aktivitesine sahip olduğundan, bir konakçıda antiviral savunma işlevi görebilir. Nitekim, Baltzis ve ark. (Baltzis ve diğ, 2004) PERK'te eksik olan fibroblastların, yabancı tip fibroblastlardan çok daha yüksek seviyelerde veziküler stomatit

virüsü replikasyonunu desteklediğini göstermişlerdir. Sonuçta meydana gelen hücre ölümünün, ER'nin viral enfeksiyonun artan yüküne yanıt verememesinden mi yoksa yüksek hücrese viral yükün başka bir sitopatik etkisinden mi kaynaklandığı açık olmamakla birlikte, konakçı hücrelerin apoptozunda bir artış gözlenmektedir. Beklenmedik bir şekilde, PKR aktivasyonu da hücrelerde kısmen kusurludur. Bu durum, bu iki kinaz arasında şimdiye kadar şüphelenilmeyen bir çapraz konuşmayı düşündürmektedir. Diğer çalışmalar da benzer şekilde, eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonunu bloke etmenin artan veziküler stomatit virüsü replikasyonuna ve sitopatik etkilere yol açtığını göstermiştir (Perkins ve Barber, 2004). Bu olay, PERK'in antiviral etkilerini bir translyasyon bloğu yoluyla uyguladığını doğrulamaktadır.

PERK aracılı eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu, viral replikasyonu kontrol etmek için önemli bir hücrese mekanizma olduğundan virüsler bu yola karşı koymak için mekanizmalar geliştirmiştir. Herpes simpleks virüsü tip I buna örnek olarak verilebilir. Bu virüs, eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonuna aracılık eden hücrese protein GADD34'e homolog olan ICP34.5 olarak bilinen bir proteini kodlar (Chou ve Roizman, 1994). ICP34.5, belirli hücre tiplerinde herpes simpleks virüsünün replikasyonu için önemlidir (Chou ve Roizman, 1994). Önemli olarak ICP34.5'in yokluğu, virüsün konakçı organizmada büyüme ve yayılma yeteneğini azaltır (Whitley ve diğ, 1993) ve eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonunu bloke eden küçük bir molekül olan salubrinal, murin korneasında herpes simpleks virüsünün replikasyonunu azaltır (Boyce ve diğ, 2005). Bu veriler, antiviral etkilere sahip eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu ile tutarlıdır. Benzer şekilde, Afrika domuz ateşi virüsü zarflı bir virüs olmasına rağmen, enfekte hücrelerde eIF2 $\alpha$  fosforilasyonuna neden olmaz (Netherton ve diğ, 2004). Enfekte hücreler ayrıca ER stresinin kimyasal indükleyicilerine yanıt vermediğinden, bu yanıt eksikliği UPR'deki spesifik bir bloktan kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Bu etkiden sorumlu viral faktörün, herpes simpleks virüsü ICP34.5 proteinine homoloji gösteren ve aynı zamanda eIF2 $\alpha$  fosforilasyonunu azaltmada veya viral replikasyonu kolaylaştırmada bu proteinin doğrudan bir rolü olmasına rağmen, eIF2 $\alpha$ 'yı defosforile eden enzim olan DP71L ile ilişkilidir (Zhang ve diğ, 2010). Hem PERK hem de PKR eIF2 $\alpha$  fosforilasyonunu indüklediğinden, PERK yolunun aslında ICP34.5, DP71L ve benzer viral proteinler tarafından hedeflenen eIF2 $\alpha$ 'nın ana aktivatörü olduğu bellidir. Bununla birlikte, hem hepatit C virüsü (Pavio ve diğ, 2003) hem de herpes simpleks virüsü (Mulvey ve diğ, 2007) tarafından PERK'nin spesifik inhibisyonu gösterilmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, her iki virüs için de bu işlevden sorumlu proteinler viral zarf glikoproteinleridir: hepatit C virüsü için E2 ve herpes simpleks virüsü için gB.

Bu proteinler ER stresini indüklemektedir ve aslında hepatit C virüsüne ait E2 proteini, düşük seviyelerde ifade edildiğinde GRP78'in indüklenmesiyle ölçülmüştür (Pavio ve diğ, 2003; Liberman ve diğ, 1999). Bu nedenle bahsedilen virüsler, ER stresinin indükleyicilerini ER stresinin inhibitörleri olacak şekilde uyarlamış olarak görünmektedirler. Hem E2 hem de gB, ilgili virüslerin temel yapısal bileşenleridir. Bu yüzden, adı geçen proteinlerin silinmesinin virüs üretiminin azalmasına yol açıp açmadığı belirlenemez. Her durumda E2 ve gB'nin bu işlevi, en azından UPR'nin PERK yolunun antiviral işlevlere sahip olduğunu desteklemektedir.

UPR'nin diğer yolları, bazı virüsler onları manipüle ediyor gibi görüldüğü için antiviral konak savunması olarak da işlev görebilir. Örneğin, insan sitomegalovirüs (Isler ve diğ, 2005) ve hepatit C virüsü (Tardif ve diğ, 2004) ER stresini *Xbp-1* mRNA'nın uçbirleştirilmesiyle indükler. Ancak bu durum, *EDEM* geninin XBP-1'e bağlı transkripsiyonunun indüksiyonunu göstermez. Bu spesifik blokaj, XBP-1 tarafından aktive edilen bazı genlerin, ER ile ilişkili protein degradasyonunda yer alan proteinleri kodladığı gerçeğine bağlı olabilir (Yoshida ve diğ, 2003). Bu nedenle bu yolun aktivasyonu, viral replikasyon ve/veya morfogenez için gerekli olan viral veya hücrel ER proteinlerinin istenmeyen kaybına yol açabilir.

Bununla birlikte ER stresi ve UPR, viral enfeksiyondan korunmada değil, daha çok viral replikasyona yardımcı olmakla ilişkilendirilmiştir. Sitomegalovirüs US11 proteininin, sınıf I majör doku uyumluluk kompleksi proteinlerinin (Tirosh ve diğ, 2005) yıkımını arttırmak için UPR'yi aktive ettiği ve bunun sonucunda da konakçının immün yanıtından kaçışla sonuçlandığı varsayılmıştır. eIF2 $\alpha$  fosforilasyonunu daha iyi replike eden suşlar olan reovirüsler, artan ATF4 ekspresyonunun yanı sıra stres granülleri olarak adlandırılan ifade edilmemiş mesajlar içeren rekabet eden konakçı mRNA moleküllerinin alıkonulması nedeniyle daha iyi çoğalırlar (Smith ve diğ, 2006). Hepatit B virüsü, ER stresi tarafından yukarı regüle edilen bir promotöre bile sahiptir (Huang ve diğ, 2005). Bu nedenle, bazı virüslerin ER stresinin olumsuz sonuçlarından kaçmak için mekanizmalar geliştirmesi ve aynı zamanda UPR tarafından indüklenen bazı spesifik faktörleri kendi avantajları için kullanmaları muhtemeldir.

Son olarak, ER stresi viropatik etkilerde ve dolayısıyla virüslerin neden olduğu hastalıklarda rol oynayabilir. Bazı murin retrovirüsleri, nörodejenerasyon ve gliosis ile süngerimsi ensefalopatiye neden olmaktadır. İlginç bir şekilde, bu tür virüslerin beyinde ER stresine neden olduğu gösterilmiştir (Liu ve diğ, 2006; Dimcheff ve diğ, 2003). Yalnızca zarf proteinleri farklı olan izogenik virüsler kullanılarak, retrovirüs FrCas<sup>E</sup>

durumunda hem ER stresi hem de hastalık tezahürünün zarf proteinine bağlı olduğu açıklanmıştır (Dimcheff ve diğ, 2004). Bunun haricinde Borna hastalığı virüsünün, ER stresine neden olan viral protein tanımlanmamasına rağmen, ER stresini ve ardından hipokampusta nöronal hasarı indüklediği belirlenmiştir (Williams ve Lipkin, 2006).

Aslında yukarıda belirtilen örnekler, virüs tarafından enfekte olan ve ER stresine maruz kalan glial hücrelerdir. Bu nedenle, nöronal hasar veya ölüm ya glial hücre desteğinin olmaması ya da hasarlı glial hücreler ve/veya enflamatuvar hücreler tarafından toksik sitokinlerin salgılanması nedeniyle ikincil olarak kaynaklanır. Enfekte hücrelerin ER stresi yoluyla doğrudan yaralanması, diğer viral hastalıklarda rol oynar. Borna hastalığı virüsü ile enfekte olan farelerin beyinciklerindeki nöronal Purkinje hücrelerinin ER stresi göstererek ölmelerine rağmen ER stresi ile nöropati arasında doğrudan bir ilişki kanıtlanamamıştır (Williams ve Lipkin, 2006). Benzer şekilde, sığır viral diyare virüsü olan pestivirüsün sitopatik bir suşu ER stresini indükler. Ancak, sitopatiklik ile ER stresine neden olma yeteneği arasında sıkı bir korelasyon gösterilememiştir (Jordan ve diğ, 2002). Bununla birlikte flavivirüs olan Japon ensefalit virüsünün sadece güçlü sitopatik etkiler gösteren hücre tiplerinde ER stresine neden olduğu gösterilmiştir (Su ve diğ, 2002). Bu durum ER stresinin, sitopatik etkilerin en azından bir kısmının aracısı olduğu fikriyle tutarlıdır. Son örnek olarak, hepatit B virüsü normalde sitopatik değildir ve enfeksiyon sırasında meydana gelen karaciğer hasarınının, konakçı bağışıklık hücrelerinin saldırısına bağlı olduğuna inanılmaktadır. Bununla birlikte, insan veya murin gibi bağışıklığı yetersiz konakçılarda, virüs aşırı yüksek düzeyde çoğalabilir ve görünüşte sitopatik hale gelebilir (Davies ve diğ, 1991; Meuleman ve diğ, 2006). Hepatit B virüsüne ait zarf proteinlerinden birinin birikmesiyle oluşan fibrozan kolestatik hepatitli hastalarda viral lipoprotein partiküllerinin ER-Golgi ara bölmesinde tutulması, ER'nin balonlaşmasına ve sonuçta apoptoza neden olur (Lau ve diğ, 1992). Bu bulgular kültürlenmiş hücrelerde ve yalnızca geniş yüzey proteinini eksprese eden transgenik farelerde tekrarlanmıştır (Foo ve diğ, 2002). Ayrıca, tek başına büyük yüzey proteininin de hem transgenik farelerde hem de kültürlenmiş hücrelerde ER stresini indüklediği gösterilmiştir (Xu ve diğ, 1997). Bunun aksine, yüzey proteininin diğer formları ile birlikte normal miktarlarda büyük yüzey proteininin ekspresyonu, hücresel hasara yol açmamaktadır. Bu nedenle, fibrozan kolestatik hepatitin, viral bir zarf proteininin anormal ekspresyonu nedeniyle bir ER stres hastalığı olması kuvvetle muhtemeldir ve protein katlanmasına yardımcı olan küçük moleküller, hastalık tezahürünü iyileştirmede terapötik olarak faydalı olabilir. Bununla birlikte PERK ve UPR'nin diğer dallarının olası antiviral işlevleri göz önüne alındığında,

bu tür bir tedavinin enfekte hücrelerden viral üretimin artmasına yol açarak ters etki göstermesi de mümkündür.

#### 2.4.6 Endoplazmik retikulum stresi ve obezite

Beden kitle indeksinin erişkinler erkekler için  $30 \text{ kg/m}^2$ 'den yüksek veya vücuttaki yağ oranının %25'ten fazla olması obezite olarak nitelendirilmektedir. Kadınlar içinse yağ oranının %30'dan fazla olması halinde obez bir vücuttan bahsedilmektedir (Newbold, 2010; Diamanti-Kandarakis ve diğ, 2009). Araştırmalar, obezitenin sebebiyet verdiği patolojik durumların en önemli nedenlerinden birinin ER stresi ve JNK aktivasyonu ile enflamatuvar cevabın meydana gelmesi ve böylece insülin direncinin tetiklenmesi olduğunu göstermiştir (Hotamisligil, 2005; Ozcan ve diğ, 2004).

Kronik ER stresi; insülin ve leptin direnci, enflamasyon,  $\beta$  hücrelerinin harabiyeti ve sonuçta apoptoz meydana getirerek obezite ve diyabet başta olmak üzere pek çok metabolik hastalığa neden olabilmektedir. ER stresi sonucunda, ektopik yağ depoları glikoz taşınımıyla birlikte insülin sinyallerini engeller ve dolayısıyla insülindeki bu değişim iskelet kasında yağ birikimine yol açmaktadır (Coen ve Goodpaster, 2012). 16 kDa ağırlığında ve heliks yapıda bir protein olan leptin, *OB* geninin ifadesiyle sentezlenir (Zhang ve diğ, 1994). Hipotalamustaki reseptörleri aracılığıyla vücuda yiyecek alımını ve enerji metabolizmasını negatif geri bildirim ile düzenleyen leptin, böylelikle obezite meydana gelmesini engeller (Pellemounter ve diğ, 1995). Başlıca üretildiği yer yağ hücreleri olan leptin (Friedman ve Halaas, 1998), hücre içinde malonil-CoA ve karnitin açıl transferaz-I gibi yağ asidi sentezleyen enzimlerin inhibe etmektedir. Ayrıca, mitokondriyal  $\beta$ -oksidasyonunu azaltmaktadır. Bunun yanında, yağ asidi kullanımını artırarak hücre içindeki yağ asidi miktarını da azaltmaktadır. Bunlara ek olarak leptin; plazmadaki kolesterol, trigliserid ve glikoz düzeyini de azalttığı belirlenmiştir. Artan endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein yanıtın, obez farelerin hipotalamusunda leptin reseptör sinyaline engel olduğu saptanmıştır. Ayrıca başka araştırmalarda, ER stresinin leptin direncine sebebiyet vererek obeziteye neden olduğu gösterilmiştir (Ozcan ve diğ, 2009). Hem genetik, hem de diyetle meydana getirilen *in vivo* obez modellerin, hipotalamusta oluşan ER stresine ilişkili protein ekspresyonlarını indüklediği kanıtlanmıştır (Zhang ve diğ, 2008). Örneğin; hücre kültüründe hipotalamusa ait hücreler thapsigargin, tunikamisin, brefeldin A veya ditiotreititol gibi ER stres indükleyicileriyle muamele edildiklerinde, leptinle başlatılan STAT3 fosforilasyonunun engellendiği belirlenmiştir. Öte yandan, bahsedilen ER stres unsurları farelere

intraserebroventriküler olarak uygulandığında, hipotalamusta ER stresinin meydana geldiği ve leptin direnci sonucunda besin alımındaki artışa bağlı olarak oluşan kilo artışı gösterilmiştir (Hosoi ve diğ, 2008).

## 2.5 Thapsigargin

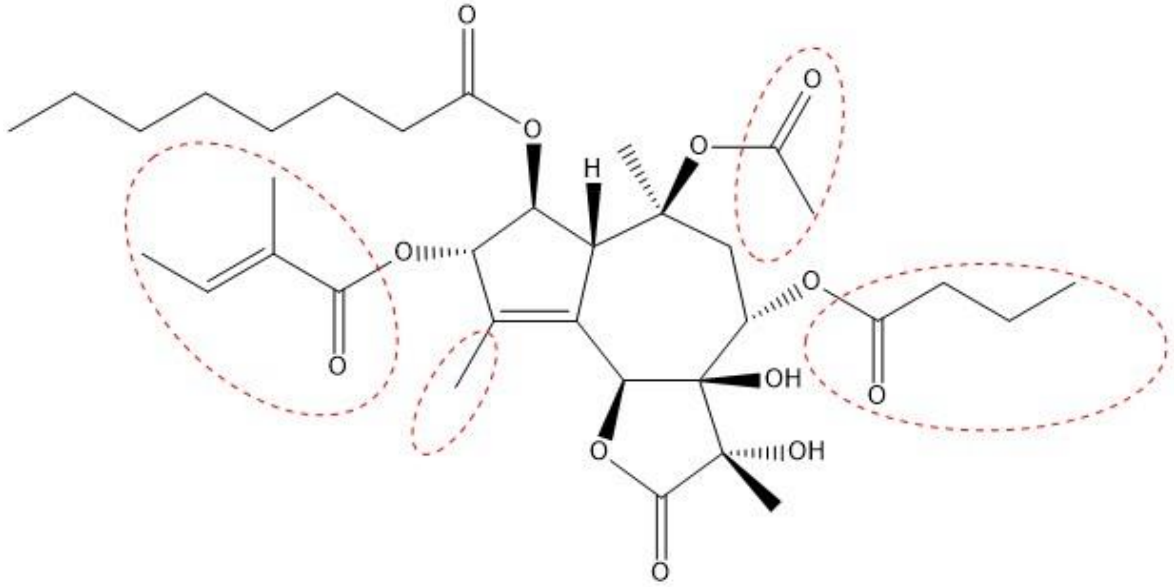
Guaianolid tipi bir seskiterpen lakton olan Thapsigargin (Tg), koyun ve sığırlar için yüksek toksisitesi nedeniyle “ölümcül havuç” olarak bilinen yaygın Akdeniz otu *Thapsia garganica*'da (Apiaceae) bol miktarda bulunur. Bu bitkinin cildi tahriş edici özellikleri ve tıbbi kullanımı eski zamanlardan beri bilinmektedir. *T. garganica*'nın köklerinden ve meyvelerinden elde edilen reçine yüzyıllardır halk hekimliğinde akciğer hastalıkları, kadın kısırlığı, nezle, ateş ve romatizma gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Andersen ve diğ, 2015; Dey ve Bajaj, 2018).

Tg adlı cildi tahriş edici bileşen, 1978'de Christensen ve çalışma arkadaşları tarafından yapısal olarak ilişkili diğer guaianolidlerle birlikte *T. garganica*'dan izole edilmiştir (Rasmussen ve diğ, 1978; Smitt ve Christensen, 1991). Ayrıca, bu bileşenin tam kimyasal yapısı ve mutlak konfigürasyonu 1985 yılında belirlenmiştir (Christensen ve Norup, 1985).

Kimyasal yapı olarak Tg, bir sikloheptan, siklopenten ve bir  $\gamma$ -laktonun üçlü kaynaşmış halkasal yapısından oluşur (Şekil 2.1). Bu karbon iskeletinin yapısal karmaşıklığı, organik kimyagerler için başta oldukça zorlayıcı olmuştur (Dey ve Bajaj, 2018). %0.6 toplam verimle 42 adımda elde edilen (*S*)-karvon'dan Tg'nin ilk toplam sentezi, 2007'de Ley'in grubu tarafından rapor edilmiştir (Andrews ve diğ, 2007; ve Ball ve diğ, 2007). Christensen ve arkadaşları, 2015 yılında nortribolid'den Tg'nin daha kısa bir sentezini gerçekleştirmişlerdir (Crestey ve diğ, 2015). 2016'da Baran ve çalışma arkadaşları (*S*)-dihidrokarvon ile başlayarak 11 aşamalı toplam sentez içeren ikinci bir kısa sentezi başardılar (Chu ve diğ, 2017). 2017 yılında, ticari olarak mevcut (*R*)-karvon'dan %5.8 toplam verimle 12 aşamalı bir başka sentezi bildirilmiştir (Chen ve Evans, 2017).

Tg'nin ilginç biyolojik aktivitelerinden özellikle yüksek sitotoksitesi, bu bileşiğe karşı artan talep sebebiyle antikanser ajanı olarak kullanımının yolunu açmıştır. Tg'nin *T. garganica*'dan düşük verimli izolasyonunun yanında zahmetli ve pahalı kimyasal sentezi, Tg'nin mevcudiyetini çok sınırlı hale getirmiştir. Buna çözüm olarak, *T. garganica* bitkisinin tarımı ve birkaç şirket tarafından halihazırda devam etmekte olan Tg üreten bitki doku kültürleri de dahil olmak üzere (Andersen ve diğ, 2015; Makunga ve diğ, 2006), Tg

için yeni üretim platformlarının geliştirilmesinin yanı sıra daha kısa ve dolayısıyla uygun maliyetli sentetik yaklaşımlarına da ihtiyaç vardır (Dey ve Bajaj, 2018).



**Şekil 2.1 :** Thapsigarginin kimyasal yapısı. (Biyolojik aktivite için önemli olan farmakoforik gruplar kırmızı kesikli çizgilerle daire içine alınmıştır.)

### 2.5.1 Sarko/endoplazmik retikulum $Ca^{2+}$ -ATPaz (SERCA) pompası inhibitörü olarak thapsigargin

Sarko/endoplazmik retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPaz (SERCA) pompası, hücre sinyalizasyonu ve hücre sağkalımı için çok önemli olan kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde eşsiz bir rol oynar (Tadini-Buoninsegni ve diğ, 2018; Peterková ve diğ, 2020). SERCA pompası, iskelet ve kalp kası hücrelerinde düşük sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun korunmasında  $Ca^{2+}$  iyonlarını sitoplazmadan sarkoplazmik retikulum (SR) lümenine ve kas dışındaki hücrelerin endoplazmik retikulumuna (ER) pompalamak için ATP hidrolizinin enerjisini kullanan bir P tipi ATPaz'dır (Aguayo-Ortiz ve Espinoza-Fonseca, 2020).  $Ca^{2+}$ 'un hücre içinde bu şekilde bölümlere ayrılmış dağılımı çoğalma, kasılma, protein katlanması, gen transkripsiyonu ve apoptoz gibi çeşitli hücre fonksiyonların düzenlenmesinden sorumludur (Tadini-Buoninsegni ve diğ, 2018; Primeau ve diğ, 2018; Rahate ve diğ, 2020). SERCA, üç *ATP2A1-3* geni tarafından kodlanan farklı hücre tipine bağlı (dokuya özgü) olarak birkaç izoformda bulunur (Chemaly ve diğ, 2018). Bu izoformlar, homolojilerinin yüksek yüzdesine rağmen farklı  $Ca^{2+}$  afinitelerine ve enzim kinetiğine sahiptirler (Aguayo-Ortiz ve Espinoza-Fonseca, 2020; Wootton ve

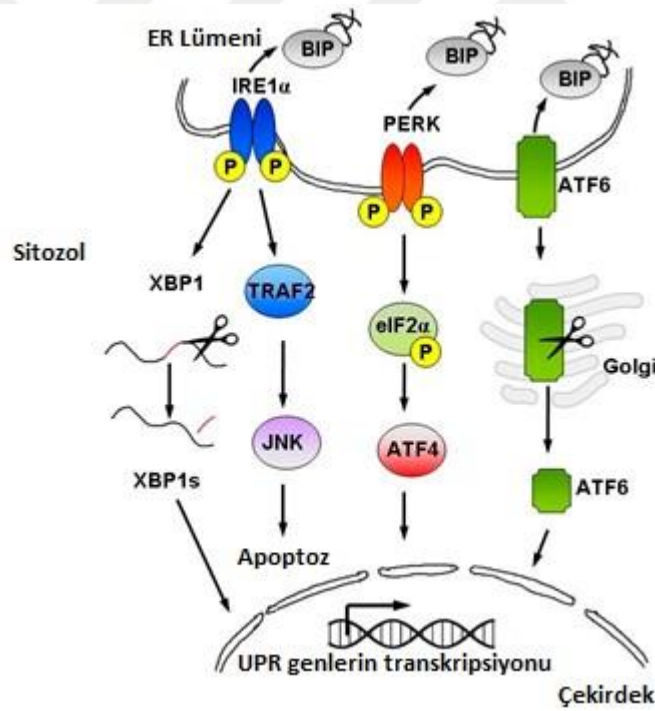
Michelangeli, 2006). Bozulmuş SERCA işlevi, hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyelerinin yükselmesine ve ER depolarında  $Ca^{2+}$  tükenmesine yol açarak ER stresini ve stres kaynaklı apoptozu tetikler (Chemaly ve diğ, 2018).  $Ca^{2+}$  metabolizmasının düzensizliği kas hastalıklarına ve kardiyovasküler hastalıklara, diyabete ve ayrıca kansere neden olmaktadır (Tadini-Buoninsegni ve diğ, 2018; Rahate ve diğ, 2020; Chemaly ve diğ, 2018).

Öte yandan, SERCA inhibitörlerinin kanser tedavisinde yeni terapötik ajanlar olarak kullanımını öneren yayınlar literatürde mevcuttur (Tadini-Buoninsegni ve diğ, 2018; Peterková ve diğ, 2020). SERCA inhibitörlerinin en iyi bilinen ve en çok çalışılan temsilcisi Tg'dir (Peterková ve diğ, 2020; Michelangeli ve East, 2011). Tg, subnanomolar veya düşük nanomolar konsantrasyonlarda SERCA-ATPaz aktivitesini bloke eder (Wootton ve Michelangeli, 2006; Sagara ve Inesi, 1991) ve bu konsantrasyonlarda plazma membranının  $Ca^{2+}$ -ATPaz veya  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPaz üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Lytton ve diğ, 1991). SERCA pompası, hidrolize ATP molekülü başına iki  $Ca^{2+}$ 'yı taşıırken, enzim iki ana konformasyonel durum olan E1 ve E2 arasında karşılıklı dönüşüm gerçekleştirir (Das ve diğ, 2017). E1 durumunda, ATPaz iki  $Ca^{2+}$  iyonunun bağlanmasıyla aktive edilir, E2 durumunda ise iki  $Ca^{2+}$  iyonu ER lümenine salınır. Bu nedenle, E1 ve E2 durumları sırasıyla  $Ca^{2+}$  iyonları için yüksek ve düşük afinite ile karakterizedir. Tg, kalsiyum içermeyen bir E2 konformasyonel durumunda SERCA pompası ile stokiyometrik olarak etkileşime girer ve  $Ca^{2+}$  bağlanmasının yanında ATPaz aktivasyonunu önleyen geri dönüşsüz, katalitik olarak aktif olmayan bir inhibitör kompleksi oluşturur (Tadini-Buoninsegni ve diğ, 2018; Michelangeli ve East, 2011; Sagara ve diğ, 1992).

### **2.5.2 Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein yanıt (UPR) indükleyicisi olarak thapsigargin**

ER,  $Ca^{2+}$  depolanmasında ve dinamiğinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, ER ökaryotik hücrelerde protein sentezi, katlanması ve olgunlaşması için önemli bir organeldir (Adams ve diğ, 2019). Lümen içinde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine ve protein katlanma kusurlarına yol açan ER işlev bozuklukları, ER stresi ile sonuçlanır (Hetz ve diğ, 2015). Bu stresi hafifletmek için hücreler, hasar düzeyine bağlı olarak protein homeostazını (adaptif UPR) eski haline getiren veya apoptozu (apoptotik UPR) tetikleyen, katlanmamış protein yanıt olarak bilinen bir sinyal yolları ağını aktive eder (Hetz ve diğ, 2015; Hetz ve Papa, 2018; Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016; Qi ve diğ, 2017).

UPR yoluyla sinyal vermek, protein sentezini inhibe ederken protein katlanmasını, taşınmasını ve ER ile ilişkili protein parçalanmasını (ERAD) artırır (Qi ve diğ, 2017). UPR, transmembran ER sensörleri tarafından kontrol edilen üç paralel sinyal yolunu içerir: protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK), transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) ve inositol gerektiren enzim 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) (Adams ve diğ, 2019; Karagöz ve diğ, 2019) olduğu gibi aşağı akış yönünde kontrol edilen transkripsiyon faktörleri: X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1), aktive edici transkripsiyon faktörü-4 (ATF4) ve transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteinidir (CHOP) (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016). Stresli olmayan hücrelerde ER sensörleri, bağlayıcı immünoglobulin protein BiP (GRP78 olarak da bilinir) ile ilişkilerinden dolayı inaktif durumda kalır. ER stresi ve katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi üzerine BiP, homeostazı yeniden sağlamak için ilgili UPR yollarını aktive ederek üç ER proteini olan IRE1 $\alpha$ , PERK ve ATF6'dan Şekil 2.2'deki gibi ayırır (Adams ve diğ, 2019; Karagöz ve diğ, 2019).



**Şekil 2.2 :** UPR sinyal yollarının şematik gösterimi. (UPR, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesi ve ardından üç ER stres sensöründen, yani IRE1 $\alpha$ , PERK ve ATF6'dan BiP'in ayrılmasıyla aktive edilir.)

Bununla birlikte ER stresi kalıcı ve çözülmemiş olduğunda, UPR ciddi şekilde hasar görmüş hücreleri ortadan kaldırmak için spesifik apoptotik yolları tetikler

(Yamaguchi ve Wang, 2004; Lu ve diğ, 2014; Sehgal ve diğ, 2017). ER stresinin neden olduğu hücre ölümü, Bcl-2 proteinleri (Bim, Noxa ve Puma) ve tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörlerini içeren hem içsel hem de dışsal apoptotik yolların aktivasyonu yoluyla meydana gelebilir (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016).

Kronik ER stresi ve UPR sinyalleşmesindeki kusurlar, kanser, diyabet, nörodejeneratif ve otoimmün bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilir (Oakes ve Papa, 2016; Wang ve Kaufman, 2016). UPR, hücrenin ölüm kararlarının merkezinde yer alır. Sonuçta, ya hayatta kalma ya da apoptotik aktivasyonu sağlar. Bu nedenle ER stresi ve UPR yoluyla hücre ölümünün uyarılması, kanser hücrelerini öldürmek için umut verici bir terapötik strateji olarak görülmektedir (Wang ve Kaufman, 2014).

Tg, UPR aracılı apoptozu başlatan bir ER stres etkeni olarak bilinir (Sehgal ve diğ, 2017; Lindner ve diğ, 2020; Lam ve diğ, 2018) ancak hücre ölümünün başlatılmasında yer alan çeşitli UPR bileşenlerinin katkıları hala belirsizliğini korumaktadır. Çizelge 2.3'te de görülebileceği üzere kanser hücre hatları üzerine yapılan çok sayıda çalışmada, ölüm reseptörü 5'in (DR5 veya TRAIL-R2 olarak adlandırılır) ve kaspaz-8'in ER strese yanıt olarak UPR yoluyla Tg ile indüklenen apoptozda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Yamaguchi ve Wang, 2004; Lu ve diğ, 2014; Lindner ve diğ, 2020; Lam ve diğ, 2018; Ma ve diğ, 2016; Muñoz-Pinedo ve López-Rivas, 2018).

**Çizelge 2.3 :** Çeşitli kanser hücre hatlarında Thapsigarginin yer aldığı hücre ölüm çeşidi ve anahtar düzenleyiciler.

Ölüm Çeşidi / Anahtar Protein	Düzenleyici	Hücre Hattı	Referans
Apoptoz / DR5	CHOP	HCT116 LNCaP DU145 A2780	Yamaguchi ve Wang, 2004
Apoptoz / DR5 ve Kaspaz 8	-	HCT116 SK-MES-1 KSM11 RPMI-8226	Lu ve diğ, 2014
Apoptoz	-	PC3 LNCaP MCF-7	Sehgal ve diğ, 2017
Apoptoz / DR5 ve Kaspaz 8	LC3B CHOP PERK ATF4 IRE1	HCT116 LNCaP	Lindner ve diğ, 2020
Apoptoz / DR5 ve Kaspaz 8	-	HCT116 Cas9	Lam ve diğ, 2018
Apoptoz / DR5 Hücre göçünün, yapışmasının ve invazyonunun inhibisyonu TRAIL-DR5-AMPK sinyali yoluyla TRAIL aracılı apoptoza duyarlılık	CHOP ATF4 PERK eIF2 $\alpha$ AMPK sinyal yolağı ROS	EC109 TE12 C109	Ma ve diğ, 2016
DR5 yoluyla TRAIL kaynaklı apoptoza duyarlılık	IRE1 $\alpha$ ATF6 CHOP	Mel-RM MM200 IgR3 Mel-CV Me4405 Sk-Mel-28 Mel-FH	Chen ve diğ, 2007
JNK ve ERS (JNK/MAPK/ERK sinyaliyle) yoluyla apoptoz Proliferasyonun, göçün ve invazyonun inhibisyonu	<i>JNK, ATF6, PERK, LC3B, BCL-2</i> genleri JNK, MAPK, ERK proteinleri	SW-13 NCI-H295R	Wu ve diğ, 2019
Apoptoz	<i>SEC24A</i> geni	HAP1	Chidawanyika ve diğ, 2018
Apoptoz	XBP1s ATF4 CHOP	PC3 LNCaP MCF-7	Szalai ve diğ, 2018

Lindner ve ark. Tg'ye maruz kalan insan prostat (LNCaP) ve kolorektal (HCT116) kanser hücre hatlarında, normalde otofajiyile ilgili olan mikrotübül ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3B'nin (LC3B), kaspaz-8'in optimal aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermişlerdir (Lindner ve diğ, 2020). Bilim insanları, PERK ve aşağı akış transkripsiyon faktörleri olan ATF4 ve CHOP'un, Tg'nin neden olduğu hücre ölümü için gerekli olduğunu, ancak şaşırtıcı bir şekilde, doğrusal bir yol yerine birbirlerine paralel olarak hareket ettiklerini göstermişlerdir. Hem DR5 hem de LC3B'nin ekspresyonu, ATF4 ve CHOP tarafından kontrol edilirken, hücre apoptozu için PERK'in gerekli olduğu ve bu yolağın ancak diğer yollar aracılığıyla etki ettiği belirlenmiştir (Lindner ve diğ, 2020).

CHOP'un DR5'in yukarı regülasyonunda ve Tg ile muamele edilen hücrelerde apoptozun teşvik edilmesinde rol oynadığı diğer araştırmacılar tarafından da gözlemlenmiştir (Yamaguchi ve Wang, 2004; Ma ve diğ, 2016; Chen ve diğ, 2007). Chen ve arkadaşları, Tg uygulanan melanom hücrelerinde DR5'in yukarı regülasyonunun, transkripsiyon faktörü CHOP ile birlikte IRE1 $\alpha$  ve ATF6 sinyal yollarının işbirliğiyle aracılık ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, Tg'nin melanom hücrelerinin TRAIL kaynaklı apoptoza duyarlı hale getirilmesinde faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (Chen ve diğ, 2007). Benzer şekilde Ma ve meslektaşları özofagus skuamöz hücreli karsinom hücre hattı (ESCC) üzerinde yaptıkları çalışmada, TRAIL/DR5-AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) yoluyla TRAIL kaynaklı apoptoza Tg'nin duyarlı hale getirdiğini göstermişlerdir (Ma ve diğ, 2016). Ayrıntılı çalışmalar, Tg'nin neden olduğu ER stresinin CHOP ifadesini arttırdığını ve böylece DR5'i yukarı doğru düzenlediğini ortaya koymuştur. TRAIL/DR5 aktivasyonu, AMPK fosforilasyonu yoluyla oksidatif stresin aracılık ettiği ESCC hücrelerinde apoptozu indüklemiştir. Ek olarak, ER stresini indükleyen Tg, apoptozu ayrıca teşvik eden AMPK fosforilasyonunu doğrudan aktive edebilir (Ma ve diğ, 2016). TRAIL, DR5'e bağlandığında normal hücreleri korurken çeşitli kanser hücre tiplerinde apoptoza neden olabilen tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin bir üyesidir (Wong ve diğ, 2019). Bu nedenle, bir ER stres indükleyicisi olarak Tg'nin kullanılması, TRAIL bazlı anti-kanser ajanların etkinliğini arttırmak için faydalı olabilir (Ma ve diğ, 2016; Chen ve diğ, 2007).

IRE1 $\alpha$ , ER stresine yanıtındaki rolü karmaşık olan ve tam olarak açıklanamayan başka bir UPR sensörüdür. Hem hücrenin hayatta kalmasını hem de apoptozun devam kararını kontrol eder. IRE1 $\alpha$ 'nın aktivasyonu, alternatif olarak uçbirleştirilmiş XBP1 izoformlarının üretilmesine yol açar ki bu durum, c-Jun N-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu ile ER stres tepkisinin sonlarında hücre ölümüyle sonuçlanan kararlı veya

nispeten daha ılımlı ER stresi sırasında hücrenin hayatta kalmasına katkıda bulunur (Adams ve diğ, 2019; Brown ve diğ, 2016).

JNK sinyal yolunun Tg aracılı ER stres apoptozuna dahil olması, birkaç kanser hücre hattında ve *in vivo* modelde doğrulanmıştır (Lindner ve diğ, 2020; Wu ve diğ, 2019; Brown ve diğ, 2016). Wu ve arkadaşları adrenokortikal karsinom hücrelerinde apoptozun teşvik edilmesinin ve Tg ile muamele edilen farelerde adrenokortikal karsinom ksenograft büyümesinin baskılanmasının, JNK sinyalleriyle ilgili belirteçlerin yukarı regülasyonundan kaynaklandığını göstermişlerdir (Wu ve diğ, 2019). Tg, JNK sinyaliyle ilgili genlerin (*JNK*, *ATF6*, *PERK*, *LC3B* ve *BCL-2*), proteinlerin (JNK, MAPK, ERK) ve bunların fosforile edilmiş formlarının ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır. Bu durum da, adrenokortikal karsinom hücrelerinde Tg ile indüklenen apoptoz JNK/MAPK/ERK sinyal yolunun aktivasyonunu düşündürmüştür (Wu ve diğ, 2019). Ayrıca, JNK sinyalinin işlevsel olarak farklı iki aşamasının olduğu öne sürülmüştür. Bunlar sırasıyla, ER stres yanıtında erken bir sağkalım ve geç proapoptotik fazın varlığı ve Tg'nin bu her iki fazda JNK aktivitesini arttırmış olmasıdır (Lindner ve diğ, 2020; Brown ve diğ, 2016). Brown ve ark., Tg ile indüklenen ER stresine yanıt olarak JNK aktivasyonunun ilk fazının hem IRE1α'ya hem de tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2'ye (TRAF2) bağlı olduğunu ve hücreleri apoptoza gitmekten koruyan anti-apoptotik sinyaller ürettiğini göstermişlerdir (Brown ve diğ, 2016). Öte yandan Lindner ve ark., hücre tipine bağlı olarak kaspaz aktivasyonu ve apoptozu indükleyen Tg tarafından JNK'nin ikinci faz aktivasyonu için IRE1-XBP1'in gerekli olduğunu göstermişlerdir (Lindner ve diğ, 2020). Araştırmacılar, Tg'nin prostat kanseri hücrelerinde (LNCaP) apoptozu indüklediğini, JNK'nin ölüm öncesi etkilerine duyarlı olduğunu, ancak kolon kanseri hücrelerinde (HCT116) ise JNK'den bağımsız olmadığını bulmuşlardır (Lindner ve diğ, 2020).

Chidawanyika ve ark., Tg ile indüklenen apoptoza katılan genleri araştırmışlardır. Haploide yakın bir hücre hattı (HAP1) kullanarak, HAP1 hücrelerinde Tg ile indüklenen sitotoksosite için gerekli olan yeni bir gen olan *SEC24A*'yı tanımlamışlardır. *SEC24A*'nın ER stresinin neden olduğu hücre ölümünü kolaylaştırma yeteneğinin Tg'ye özgü olduğunu ve *SEC24A*'nın Tg'nin neden olduğu UPR ve apoptozun önemli bir aracısı olduğunu göstermişlerdir (Chidawanyika ve diğ, 2018).

### 2.5.3 Endoplazmik retikulumdan Ca<sup>2+</sup> boşalması, UPR ve hücre ölümü arasındaki ilişki

SERCA pompasını bloke etmenin bir sonucu olarak Tg, ER'deki Ca<sup>2+</sup> depolarını tüketir ve UPR'yi aktive eder. Bu durum da, sonuçta hücre ölümüyle sonuçlanabilir (Lu ve diğ, 2014; Sehgal ve diğ, 2017; Lindner ve diğ, 2020). Bununla birlikte, SERCA inhibisyonunun UPR ve apoptozu indüklediği kesin mekanizma hala anlaşılamamıştır. Sehgal ve ark. (Sehgal ve diğ, 2017), Tg'nin ER Ca<sup>2+</sup> depolarını tüketme yeteneği ile hücre canlılığı üzerindeki zararlı etkileri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmacılar Tg'nin, SERCA1a aracılı Ca<sup>2+</sup> taşınmasını güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, prostat (PC3, LNCaP) ve meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde bir günlük Tg maruziyetinin ER'deki Ca<sup>2+</sup> depolarının aşırı drenajına neden olduğunu bulmuşlardır. Bu Ca<sup>2+</sup> tükenmesini, belirgin olarak azalmış hücre proliferasyon oranları ve 2-4 gün içinde gelişen ve hücre ölümüyle sonuçlanan morfolojik değişiklikler izlemiştir. PC3 hücrelerinde yapılan başka bir çalışma ise, apoptozu indükleyen UPR için gerekli olan Tg tarafından uyarılan ER'deki Ca<sup>2+</sup> tükenmesinin derecesine ve süresine odaklanmıştır (Szalai ve diğ, 2018). Tg (1-3 nM) ile gözlemlenen ER'deki toplam Ca<sup>2+</sup> seviyelerinde meydana gelen kademeli düşüş, UPR aktivasyonunun yokluğunda ve hücre ölümü meydana gelmeksizin PC3 hücre proliferasyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bilim insanları ayrıca, hücre proliferasyonunu azaltmak için ER'deki Ca<sup>2+</sup>'nın kısmi tükenmesinin yeterli olduğunu da göstermişlerdir. Ancak hücreler, herhangi bir UPR belirtisi göstermeden ER'deki Ca<sup>2+</sup>'daki güçlü ve sürekli düşüşleri tolere edebilir. Daha yüksek sitotoksik Tg konsantrasyonlarında (>3 nM), hücre ölümünde muhtemelen UPR'nin neden olduğu kademeli, kaspaz bağımlı bir artış gözlemleyen araştırmacılar, bunun nedeni olarak artmış XBP1, ATF4, CHOP, BiP ve LC3B seviyelerini bulmuşlardır. Szalai ve arkadaşları, UPR aktivasyonunun ve hücre ölümünün, ER'deki Ca<sup>2+</sup> seviyelerini önemli ölçüde boşaltmak için esasen daha yüksek Tg konsantrasyonları gerektiği sonucuna varmışlardır (Szalai ve diğ, 2018).

Bazı bilim insanları, ER'deki Ca<sup>2+</sup> tükenmesinin neden olduğu hücre ölümü için depolanmış kontrollü Ca<sup>2+</sup> girişinin (SOCE) aracılık ettiği sitozolik Ca<sup>2+</sup> seviyelerindeki artışların gerekli olduğunu belirtmişlerdir (Tombal ve diğ, 2000; Flourakis ve diğ, 2010). Bununla birlikte daha yakın zamanda, Tg tarafından indüklenen apoptozu, daha önce belirtildiği gibi sitozolik Ca<sup>2+</sup> seviyelerindeki artışın eşlik etmediği gösterilmiştir. İki temel SOCE bileşeninin, kalsiyum salınımı ile aktive olan kalsiyum kanal proteini 1 (ORAI1) ve stromal etkileşim molekülü 1'in (STIM1) yıkılması, PC3, LNCaP veya MCF-7 hücrelerindeki Tg sitotoksitesini azaltmamıştır. Bu durum, SOCE ile aracılık edilen

sitozolik  $Ca^{2+}$ 'daki artışın, Tg'nin neden olduğu hücre ölümü için kritik olmadığını göstermiştir (Sehgal ve diğ, 2017). Bundan başka Tg, sitozolik  $Ca^{2+}$  seviyelerindeki saptanabilir artışları indüklemek için gerekenden önemli ölçüde çok daha düşük konsantrasyonlarda maksimum hücre ölümü meydana getirmiştir (Sehgal ve diğ, 2017; Dubois ve diğ, 2013).

Özetle, Tg ile indüklenen apoptozun ER'deki  $Ca^{2+}$  tükenmesi ve sürekli UPR aktivasyonu ile başlatıldığı, buna karşın hücre ölümü olaylarını başlatmak içinse yüksek sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu ve SOCE'nin gerekmediği saptanmıştır (Sehgal ve diğ, 2017; Szalai ve diğ, 2018).

## 2.6. Tezin Amacı

Bu tez çalışmasındaki temel amacımız, gün kurusu ve kükürtlü olarak Malatya genelinde en çok ağaca sahip olan iki tür olan Hacihaliloğlu ve Kabaşı kayısıların, MCF-7 insan meme kanseri ve HCT116 insan kolon kanseri hücre kültür sistemleri üzerinde thapsigarginle meydana getirilen endoplazmik retikulum stresi sonucunda hücrelerin sitotoksikite, morfoloji ve göç yeteneğinin yanı sıra farklı endoplazmik retikulum stres yollarıyla ilgili proteinlerin miktarlarındaki değişikliklerin incelenmesidir.

Bu bağlamda, kapsamlı deneysel çalışma sonuçlarının ve aynı sistemde hem gün kurusu olarak ve hem de kükürtlü olarak kurutulup tüketime sunulan en yaygın ağaca ve dolayısıyla da tüketime sahip iki kayısı türünün endoplazmik retikulum stresi üzerine etkilerinin karşılaştırılmasını içeren objektif bilgilerin ortaya konmasını, ülkemizin en önemli ihracat kalemlerinden birisi olan Malatya kayısılarımız açısından oldukça önemli olacağı, elde edilen deneysel sonuçlarla birlikte endoplazmik retikulum stresinin ve dolayısıyla endoplazmik retikulum stresine bağlı hastalıkların görülme sıklığının azaltılması yönünde hem Malatya kayısılarımızın bilimsel ve sağlık açısından tanıtımına daha fazla destek sağlayarak tüketiminin artırılmasının yolunu açacağı hem de sonuçta ülkemiz özelinde Malatya için daha fazla katma değer elde edileceği kanaatindeyiz.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyaller, Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan Hacihaliloğlu ve Kabaası kayısı çeşitleri Malatya Kayısı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. Bu kayısı çeşitlerine ait olgun meyveler Haziran-Ağustos aylarında toplanmıştır. Toplanan olgun kayıların çekirdekleri çıkarılarak gün ışığı altında kurutulmuştur. Bunun haricinde, olgun kayıların bir kısmı standart olarak kullanılan 2000 ppm'de kükürlenerek hazır hale getirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, Hacihaliloğlu ve Kabaası çeşitlerine ait gün kurusu olarak kurutulmuş ve ayrıca kükürlenmiş olarak tüketime hazır hale getirilmiş kayıların metanol ekstraksiyonları yapılarak deneylerde kullanılmıştır.

Farklı kayısı çeşitlerine ait deneylerde kullanılan kimyasallar olarak 3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), PBS ve DMSO (Moleküler biyoloji saflığında,  $\geq 99.5\%$ ) Merck firmasından tedarik edilmiştir. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Streptomisin/Penisilin, metanol, tripan mavisi, akridin turuncusu ve EtBr ise Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak kullanılan Thapsigargin, Abcam firmasına (1 mg, ab120286, Lot: APN18067-1-1) aittir. Ayrıca, LabSolute marka 6, 24 ve 96 kuyucuklu plakalar hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. ELISA çalışmalarından ATF6 ve XBP1 kitleri Abbexa LTD firmasından, CHOP (DDIT3) kiti ise Reddot Biotech Inc. şirketinden satın alınmıştır.

Deneyler boyunca kullanılan cihazlar ve markaları şöyledir: Distile su cihazı (Millipore, Almanya), hassas terazi (Shimadzu, Japonya), %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Esco, Singapur), sıcaklık ayarlı çalkalayıcı (Miprolab, Türkiye), hemositometre (Marienfeld, Almanya), blender (Tefal, Fransa), buzdolabı (Arçelik, Türkiye), -40 °C derin dondurucu (Uğur, Türkiye), -80 °C derin dondurucu (New Brunswick, Kanada), invert floresan mikroskop (Olympus, Japonya), spektrofotometre – mikroplaka okuyucu (Eon Biotek, A.B.D.), laminar flow kabin (Teknomar, Türkiye), santrifüj (Nüve, Türkiye), otoklav (Nüve, Türkiye), pH metre (Hanna Instruments, A.B.D.), su banyosu (WiseBath, Almanya), vorteks (Dragon Lab, Çin), sıvı azot tankı (International Cryogenics, A.B.D.).

## **3.2. Çözeltiler ve Hazırlanmaları**

### **3.2.1. Hücre besiyerinin hazırlanması**

Tez projemizdeki deneyler sırasında MCF-7 (insan meme kanseri hücreleri) ve HCT116 (insan kolon kanseri hücreleri) hücre hatlarıyla çalışıldığı için bu hücrelerin besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) satın alınmıştır. Besiyerleri kullanılmadan önce içerisine %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenmiştir.

### **3.2.2. Hücre dondurma çözeltisinin hazırlanması**

Hücrelerle ilgili herhangi bir deney yapılmayacağı zaman hücreleri dondurarak stoklamamız için fetal sığır serumu (FBS, %90) ve dimetilsülfoksit (DMSO, %10) kullanılarak toplam hacim 1 mL olacak şekilde hücre dondurma çözeltisi hazırlanmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen peletteki hücreler bu çözeltiliye koyularak -20 °C'de dondurulmuştur. Daha sonra, dondurulan hücreler sıvı azot tankına koyularak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süre muhafaza edilmeleri sağlanmıştır.

### **3.2.3. Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisinin (PBS) hazırlanması**

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılmıştır. Daha sonra, 900 mL deiyonize su içinde çözülmüştür. pH 7.4'e ayarlanmış ve son hacim 1 litre olacak şekilde deiyonize su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan PBS çözeltisi otoklavda 1 atm basınç altında 121 °C'de 20 dakika boyunca steril edilmiştir.

### **3.2.4. MTT çözeltisinin hazırlanması**

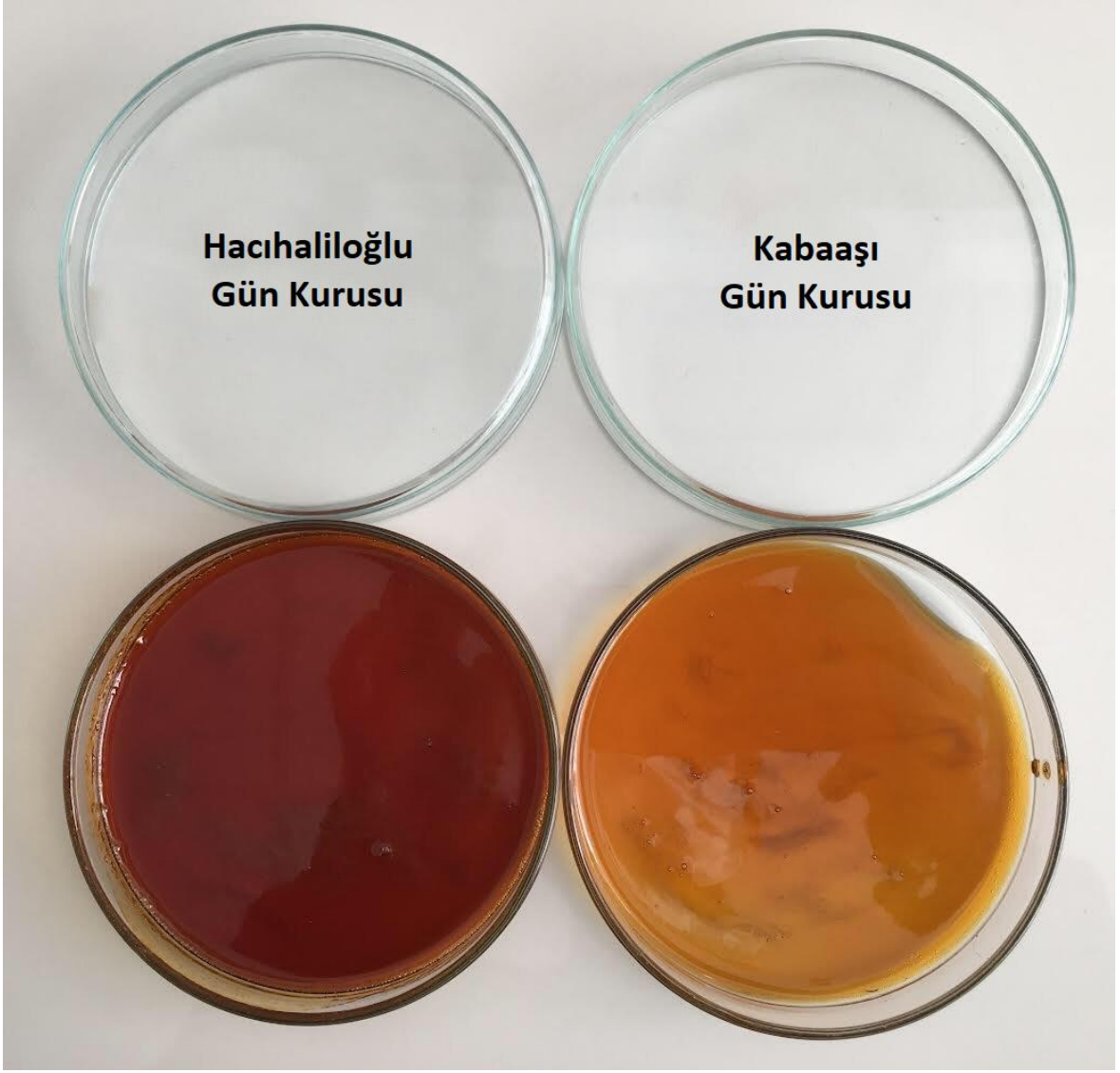
Son konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde PBS ile hazırlanan MTT çözeltisinden ışık geçmemesi sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti daha sonra 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir ve +4 °C'de bir hafta boyunca saklanmıştır. İhtiyaç halinde yeniden hazırlanarak kullanılmıştır.

### **3.2.5. Akridin turuncusu ve etidyum bromür boya karışımının hazırlanması**

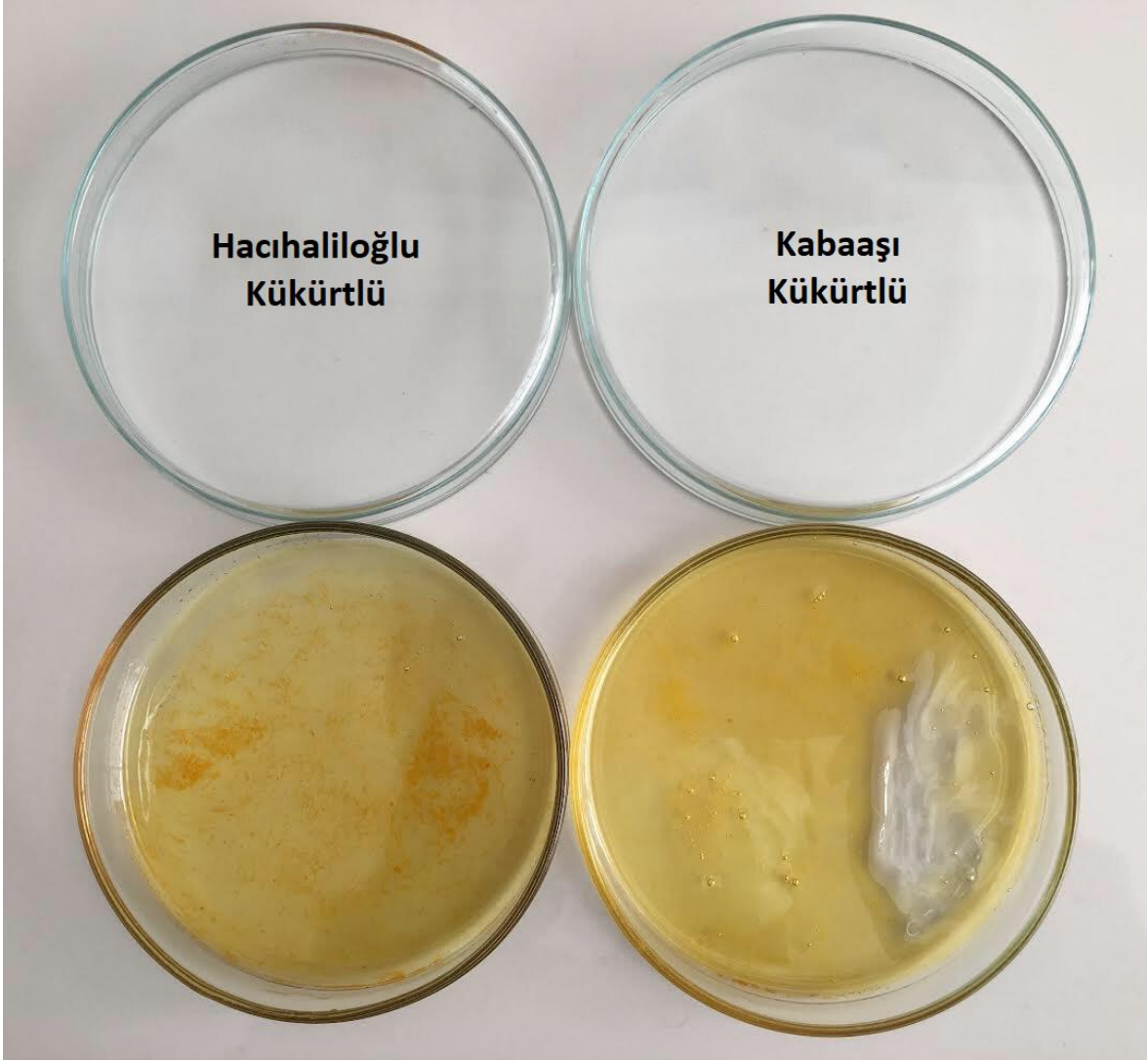
Toz halindeki akridin turuncusu boyasından steril bir falkon tüp içerisine 1 mg tartım yapılarak toplam hacim 1 mL olacak şekilde etanolla çözülmüştür. Bu stok boyadan, ihtiyaca göre 1 µg/mL olacak şekilde steril fosfat tamponu (pH: 7.4) içinde seyreltme yapılabilir. Bu seyreltme sonunda, içerisinde 1 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür boyasından katılmıştır (Carl Roth, ana stok: 10 mg/mL). Bu boya karışımı, hücrenin üzerini kaplayacak şekilde uygulanmıştır. Yaklaşık 3-4 dakika sonra boya çekilip atılmıştır ve bol miktarda steril PBS ile hücreler 3 kere yıkanmıştır.

### 3.3. Kayısı Çeşitlerinin Metanol Ekstraktlarının Hazırlanması

2019 yılının hasadı olan Hacıhaliloğlu ve Kabaası çeşitlerine ait gün kurusu ve kükürlenmiş (2000 ppm) olarak kurutulmuş kayısıların ekstraksiyonları yapılmıştır. Ekstraksiyonlar için, literatürde en fazla tercih edilen polar çözücülerden biri olan metanol kullanılmıştır. Deneydeki ekstraksiyonların polar çözücü ile yapılmasının nedeni ise polar çözücüler (metanol veya etanol gibi alkoller) ekstraksiyon için yüksek verim sağlarken, apolar çözücüler (toluen, n-heksan ve sikloheksan vb.) ekstraksiyon veriminin zayıf olmasına neden olmaktadır (Schneider ve diğ, 2009). Hassas terazide kayısı örneklerinden elliser gram tartılmıştır ve daha sonra blender içine alınmıştır. Her bir örneğin üzerine 150 mL soğuk metanol ilave edilmiştir. Örnekler, 30 saniye boyunca düşük hızda ve 1 dakika boyunca da yüksek hızda blender ile parçalanmıştır. Bu sırada blenderda meydana gelen ani sıcaklık artışının önüne geçerek örneklerin içeriğindeki proteinlere herhangi bir zarar gelmemesi için işlem buz içerisinde yapılmıştır. Daha sonra, homojenat filtre kağıdıyla süzülerek örnekler 1 hafta boyunca ısıtıcılı çalkalayıcı üzerinde 37 °C ve 80 rpm'de çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda metanolün buharlaşmasıyla çözücünden arındırılan örnekler, petri kaplarına alınarak deney gününe kadar +4 °C'de saklandı. Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de farklı kayısı çeşitlerine ait hazırlanan metanol ekstraksiyon fotoğrafları görülmektedir.



**Şekil 3.1** : Hacıhaliloğlu Gün Kuru ve Kabaası Gün Kuru kayısların metanol ekstraktlarının fotoğrafları.



**Şekil 3.2 :** Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Kabaası Kükürtlü kayısıların metanol ekstraktlarının fotoğrafları.

### **3.4. Hücre Kültürü Deneyleri**

#### **3.4.1. Hücrelerin temin edilmesi ve gelişimlerinin sağlanması**

Hücre kültürü deneyleri İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan MCF-7 hücreleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan, HCT116 hücreleri ise İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Hücreler düzenli olarak invert mikroskopla incelendi. Hücrelerin hücre kültür flaskının yüzeyini tamamen kaplaması durumu olan konfluentlik meydana gelene kadar üç günde bir eski besiyerleri yeni besiyerleri ile değiştirilmiştir. Hücreler tamamen konfluent olduklarında ise pasajları veya deneyler için ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin bir kısmı ise tezdeki çalışmaların sürekliliği açısından sıvı azot tankında dondurularak saklanmıştır.

### **3.4.2. Hücre kültürü ortamı**

Hücre kültüründe yapılan deneylerde, hücrelerin laboratuvar koşullarında yaşayıp çoğalabilmeleri için doğal ortamlarını taklit eden gerekli besiyerleri temin edilmelidir. Besiyerinin farklı içeriği genellikle hücrelerin tipine bağlı olmakla birlikte, hücrenin elde edildiği organizmanın türüne göre de farklı olabilmektedir. Hücreler değişik besiyerlerinde kendilerinden beklenen karakteristiği sergileyemediklerinden, yürütülen araştırmanın ana hedefine göre hücrenin ihtiyaçları karşılanmalıdır. Araştırmalarımızda besiyeri ortamı olarak hem MCF-7 hem de HCT116 hücre hatları için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmıştır. Ayrıca, besiyerinin içerisine ek besleyici olarak %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik karışımı da herhangi bir bakteriyel kontaminasyonu önlemek için eklenmiştir. %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde, 37 °C'de ve %95 neme sahip ortamda inkübe edilen hücrelerin gelişimleri düzenli olarak gözlenmiştir.

### **3.4.3. Dondurulmuş hücre hattının açılması**

Dondurulmuş hücre hatları deneysel kullanım için açılırken hızlıca hücre dondurma çözeltisinin erimesi sağlanır. Bunun için gerekli hücre hatlarını içeren kriyoviyal tüp -196 °C'den alınarak 37 °C'lik su banyosunda eritilmiştir. Daha sonra, hücre dondurma çözeltisinin içinde bulunan DMSO'dan hücreleri arındırmak için 9 mL besiyerinin içine kriyoviyal tüpteki hücreler eklenerek 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjten sonra süpernatant atılarak 6 mL taze besiyeriyle peletteki hücreler nazikçe pipetaj yapılarak T25'lik flaslara alınmıştır. Hücrelerin flask tabanının yüzeyine tutunup çoğalmaları için T25 flaslara inkübatöre konmuştur. Sonraki gün hücrelerin besiyeri değiştirilmiştir. Düzenli olarak hücrelerin morfolojileri invert mikroskop altında gözlemlenmiştir. Kültür ortamındaki hücreler her gün invert mikroskop ile kontrol edilerek konfluent hale geldiklerinde pasajlanmıştır.

#### **3.4.4. Hücrelerin pasajlanması**

Hücreler konfluent olduğunda diğer bir deyişle kültür flasklarının yüzeyleri hücreler tarafından tamamen kaplandığında hücrelerin ölmemesi için bir an önce pasaj yapılmalıdır. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırıp pasajlamak için öncelikle flask içerisindeki eski, açık sarıya yakın renkli besiyeri çekilerek atılmıştır. Daha sonra flask yüzeyine yapışık haldeki hücreler PBS ile yıkanarak kirli besiyeri kalıntıları PBS ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. T25'lik flask içerisine 1.5 mL olacak şekilde tripsin enzimi flask yüzeyine yapışan hücrelerin flasktan ve birbirlerinden ayrılmaları için eklenmiştir. Tripsinin optimum çalışma sıcaklığı 37 °C olduğundan tripsinli flask CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, invert mikroskop ile hücrelerin flaskın yüzeyden ayrıldığı kontrol edilerek tripsini inhibe etmek için, tripsin hacminin en az iki katı olacak şekilde besiyeri eklenmiştir. Bu işlemin çok hızlı bir biçimde yapılması gerekmektedir zira tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücrelerle birlikte bekletildiği süre boyunca hücrelere zarar vermektedir. Sonrasında hücreler birkaç kez pipetlenerek birbirlerinden ayrılmaları sağlanarak tek hücre süspansiyonu haline getirilip falkon tüpe alınmıştır. Elde edilen süspansiyon, 2000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek süpernatant ortamdan çekilerek atılmıştır. Hücreler 10 mL besiyerinde seyreltilerek hücrelerle ilgili yapılacak deney zamanına göre flasklara belirli miktarlarda hücre koyulup flasklar karbondioksitli inkübatöre kaldırılmıştır. Eğer deneyde kullanmak için çok fazla sayıda hücreye ihtiyaç olması halinde T75'lik flasklar kullanılmıştır.

#### **3.4.5. Hücrelerin dondurulması**

T25'lik flask içerisinde bulunan eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile dikkatli bir şekilde yıkanıp daha sonra PBS atılmıştır. Flask yüzeyinde yapışmış hücrelerin üzerine tripsin konularak karbondioksitli inkübatörde 5 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin hacminin en az iki katı kadar DMEM besiyeri eklenerek tripsinin etkinliği azaltılmıştır. Hücrelerin birbirinden ayrılmaları için pipetleme işlemi yapılarak hücrelerin tek hücre süspansiyonu haline gelmesi sağlanmıştır. Sonrasında, süspansiyon bir falkon tüpe aktararak 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek oluşan süpernatant atılmıştır. Falkondaki hücre pelleti üzerine toplam hacim 1 mL olacak şekilde %90 FBS ve %10 DMSO eklenmiştir. 1 mL'lik hücre çözeltisi dondurma işlemi için özel olarak üretilmiş kriyoviyal tüplere alınmıştır. Hücrelere zarar gelmemesi açısından kademeli olarak dondurma işlemi yapabilmek için

tüpler ilk olarak 24 saat boyunca -20 °C'ye, ardından bir tam gün boyunca da -80 °C'de bekletilmiştir. Sonunda, -80 °C'den alınan kriyoviyal tüpler -196 °C'deki sıvı azot tankına aktarılmıştır.

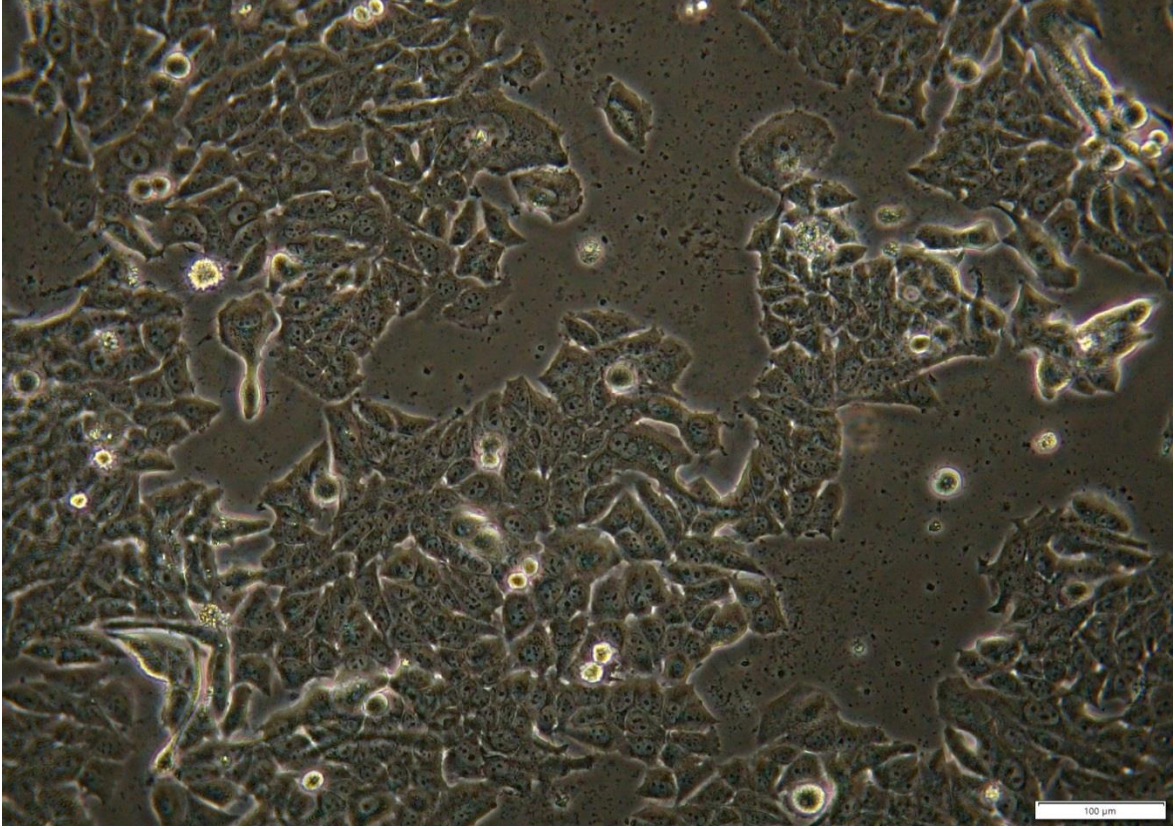
#### **3.4.6. Hücrelerin sayımı**

Flask içerisindeki eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır ve serumdan arındırmak için hücreler PBS kullanılarak yıkanmıştır. Hemen sonrasında, PBS de flasktan çekilerek atılmıştır. Tripsinle inkübatörde 5 dakika süresince inkübe edilen hücrelerin üzerine kullanılan tripsin hacminin 2-3 katı kadar besiyeri eklenerek enzimin aktivitesi azaltılmıştır. Birbirine yapışan hücreleri ayırmak ve homojen dağılmalarını sağlamak amaçlarıyla pipetaj yapılmıştır. Tek hücre olarak süspansiyon haline gelen hücreler bir falkon tüpe serolojik pipet yardımıyla alınmıştır. Daha sonra, falkon tüp 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek oluşan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Falkon tüp içindeki hücre pelletinin üzerine 10 mL DMEM besiyeri eklendi ve iyice pipetaj yapılmıştır. Sonrasında, bu hücre süspansiyonu karışımından bir ependorf tüpe 100 µL alınmış ve ayrıca üzerine de 100 µL tripan mavisi eklenerek nazikçe birkaç kez pipetleme gerçekleştirilmiştir. Sayım için temiz bir lamel hemositometrenin üzerine koyulduktan sonra ikisinin arasındaki boşluktan tripan mavisi içeren hücre süspansiyonu mikropipet kullanılarak bırakılmıştır. İnvirt mikroskop altında 4 bölgeyi kapsayan 16 küçük karenin içindeki hücreler sayılmıştır. Hesaplama olarak ise, 4 bölgede sayılan hücrelerin ortalaması mililitredeki hücre sayısını bulmak amacıyla  $10^4$  ile çarpılmıştır. Bulunan sayısal değer, tripan mavisiyle tek hücre süspansiyonu iki kat seyreltildiği için 2 ile çarpılmıştır. Elde edilen sonuç, 1 mL'deki yaklaşık hücre sayısını göstermektedir. Falkon tüpün içerisinde 10 mL besiyeri olduğundan çıkan sonuç 10 ile çarpılarak toplam hücre sayısı yaklaşık olarak bulunmuştur.

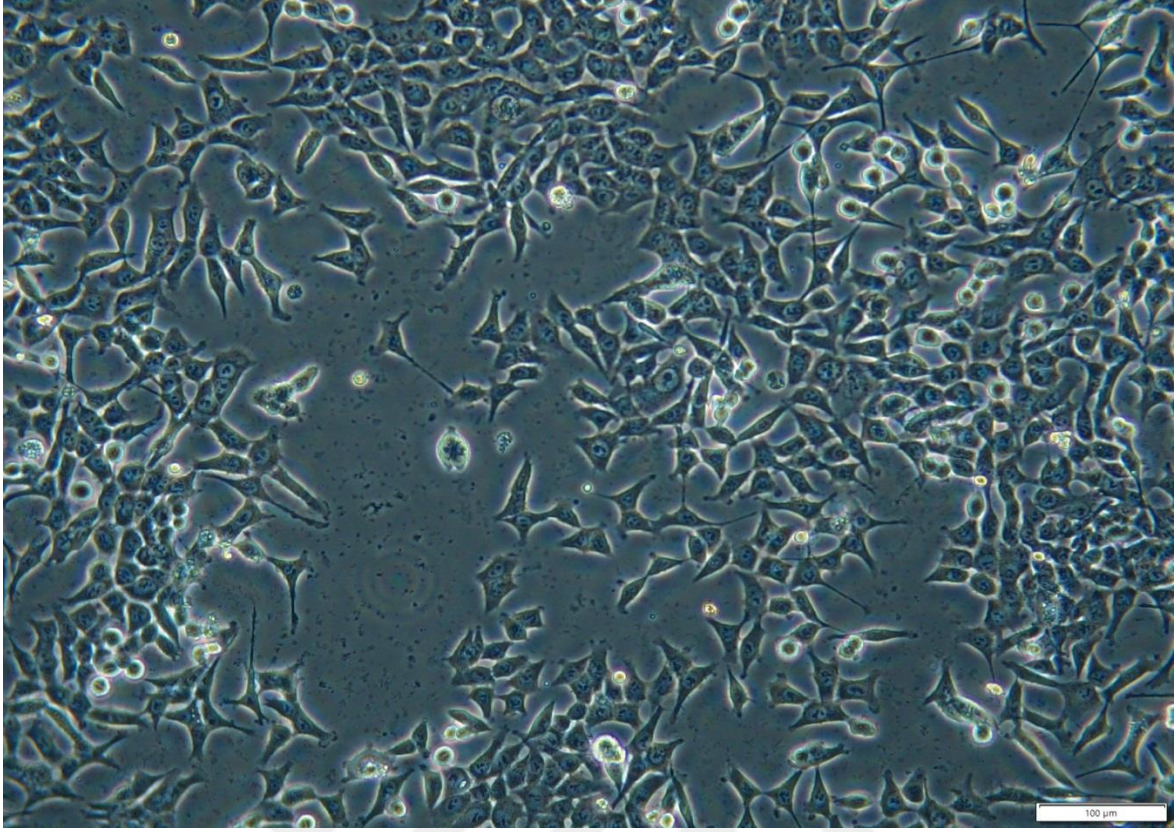
#### **3.4.7. Hücrelerin plakalara ekimi**

MTT testi için, 96'lık plakanın her bir kuyucuğuna 100'er µL olacak şekilde MCF-7 hücre hattından 10,000 ve HCT116 hücre hattından ise 15,000 hücre ekilmiştir. Hücre göçü, akridin turuncusu/etidyum bromür boyama ve ELISA yöntemleri için, 6'lı plakanın her bir kuyucuğuna MCF-7 hücre hattından 300,000 ve HCT116 hücre hattından ise 450,000 hücre ekilmiştir. Ekilen hücreler 24 saat süresince %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik

ortamda hücrelerin plaka yüzeyine tutunmaları için inkübe edilmiştir. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te sırasıyla inkübasyondan sonraki MCF-7 ve HCT116 hücre hatlarına ait 200X büyütme invert mikroskop fotoğrafları görülmektedir.



**Şekil 3.3** : MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop fotoğrafları (200X) (Bar = 100 µm).



**Şekil 3.4** : HCT116 hücrelerinin invert mikroskop fotoğrafları (200X) (Bar = 100 µm).

#### **3.4.8. Farklı kayısı ekstraktlarının hücre kültür ortamına eklenmesi**

MCF-7 ve HCT116 hücreleri kullanılarak yapılan MTT testi için, ekimin ertesi günü hücreler plaka yüzeyine yapıştıktan sonra 96'lık plakanın tüm kuyularındaki besiyeri plaka ters çevrilerek dökülmüştür. Hemen sonra, ölmeleri için hücrelerin üzerine 50 µL DMEM besiyeri eklenmiştir. MCF-7 hücreleri ekilmiş kuyucuklara Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı türününün 24 saatlik inkübasyonu için 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 mg/mL, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu için 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 mg/mL; Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı türününün 24 saatlik inkübasyonu için 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mg/mL, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu için 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 mg/mL; Kabaaşı Gün Kurusu kayısı türününün 24 saatlik inkübasyonu için 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 mg/mL, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu için 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 mg/mL; Kabaaşı Kükürtlü kayısı türününün 24 saatlik inkübasyonu için 100, 105, 110, 115, 120 ve 125 mg/mL, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu için 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 mg/mL konsantrasyonlara sahip besiyeri içinde hazırlanmış kayısı ekstrakt çözeltilerinden 50'şer µL koyulmuştur. HCT116 hücreleri ekilmiş kuyucuklara Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı türününün 24 saatlik inkübasyonu için 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 mg/mL, 48 saatlik inkübasyonu için 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 mg/mL, 72

saatlik inkübasyonu için 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 mg/mL; Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı türünün 24 ve 48 saatlik inkübasyonu için 100, 105, 110, 115, 120 ve 125 mg/mL, 72 saatlik inkübasyonu için 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mg/mL; Kabaası Gün Kurusu kayısı türünün 24 saatlik inkübasyonu için 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 mg/mL, 48 saatlik inkübasyonu için 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 mg/mL, 72 saatlik inkübasyonu için 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 mg/mL; Kabaası Kükürtlü kayısı türünün 24 ve 48 saatlik inkübasyonu için 100, 105, 110, 115, 120 ve 125 mg/mL, 72 saatlik inkübasyonu için 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 mg/mL konsantrasyonlara sahip besiyeri içinde hazırlanmış kayısı ekstrakt çözeltilerinden 50'şer µL koyulmuştur. Kontrol kuyucuklarındaki hücrelere sadece toplamda 100 µL olacak şekilde DMEM besiyeri eklenmiştir. Farklı konsantrasyondaki örnekler içeren hücre plakaları 24, 48 ve 72 saatlik süreler boyunca 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletilmiştir.

#### **3.4.9. Farklı kayıslara ait %Canlılık ve IC<sub>50</sub> değerlerinin MTT testiyle belirlenmesi**

*In vitro* koşullar altında hücre canlılık değerleri MTT testiyle belirlenmiştir. Kantitatif olan bu testin mantığı, spektrofotometrik bir metottur ve genel olarak belirli bir dalga boyunda herhangi bir çözeltideki renk değişiminin ölçümüne dayanmaktadır. 3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur. Bu tuzun, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimine afinitesi vardır. Canlı hücrelerde bu tuz suda çözünmeyen formazana indirgenir. Sonuçta, formazanın bir organik çözücü olan DMSO ile çözünür hale gelmesiyle oluşan mavi-mor renk spektrofotometre cihazı kullanılarak 540 nm dalga boyunda ölçülür ve elde edilen değer canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak değişir.

Farklı kayısı çeşitlerine ait yüzde canlılık ve sonuçta IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenebilmesi için uygulanan MTT testinde, kayıslar 1 mg/mL olacak şekilde DMEM besiyerinde (%10 FBS ve %1 Streptomisin/Penisilin) hazırlanmış ve daha sonra farklı konsantrasyonlara yine aynı besiyeri kullanılarak seyreltilmişlerdir. Deneyin 1 gün öncesinde 96-kuyucuklu plakalara sırasıyla 10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk ve 1.5x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde MCF-7 ve HCT116 hücreleri ekilerek 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün hücreler üzerindeki besiyerleri atılmış ve hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki kayısı çözeltileri 100 µl/kuyucuk olacak şekilde plakalara koyulup 24, 48 ve 72 saat sürelerle 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri

kuyucuklardan çekilerek atılmış ve kuyucuklara 10 µL olacak şekilde MTT (%10 hacim/hacim) (5 mg/mL PBS, pH 7.4) çözeltisi içeren taze besiyeri karanlık ortamda eklenerek 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda 96-kuyucuklu plakalardaki vasat atılarak plakalardaki her bir kuyucuğa karanlık ortamda 100 µL DMSO eklenmiştir. Bu işlemin hemen ardından, spektrofotometre cihazı kullanılarak 540 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüş ve hücre canlılık değerleri yüzde olarak belirlenmiştir. Herhangi bir kayısı çözeltisi içermeyip sadece hücre barındıran (+) kontrol kuyucuklarının absorbans değerleri yüzde yüz canlı olarak kabul edilmiştir. Kayısı çözeltilerinin yüzde hücre canlılığı sonuçları (+) kontrol grubuyla karşılaştırılarak belirlenmiştir. Besiyeri yerine sadece DMSO içeren ortam, (-) kontrol olarak değerlendirilmiştir. Bu doktora tez çalışmasındaki sonuçlar, değişik yöntemlerle hazırlanmış kayısı çeşitlerine ait farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin MCF-7 ve HCT116 hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik direkt hücre canlılık ve yüzde inhibisyon yani sitotoksosite (%100 - % Hücre canlılık değerleri) değerleri ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlardaki kayısı çözeltilerinden elde edilen yüzde hücre canlılığı sonuçlarıyla oluşturulan standart grafiklerden ( $0.95 < R^2$ )  $IC_{50}$  (%50 hücre inhibisyonu sağlayan ekstrakt konsantrasyonu) değerleri belirlenmiştir. Düşük  $IC_{50}$  değeri, yüksek sitotoksik aktivite göstermektedir. Çalışmadaki bütün analizler üç paralel olarak çalışılmıştır ve her bir paralel deney en az 6 tekrardan oluşmaktadır.

MCF-7 hücre hattında Hacıhaliloğlu Gün Kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraksiyonları sırasıyla 24 saat için 60.16, 95.47, 56.32 ve 108.99 mg/mL  $IC_{50}$  değerlerine sahip olduğundan akridin turuncusu/etidyum bromür boyama, hücre göçü ve ELISA deneylerinde bu değerler kullanılmıştır.

HCT116 hücre hattında Hacıhaliloğlu Gün Kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraksiyonları sırasıyla 24 saat için 79.97, 110.11, 74.94 ve 117.77 mg/mL  $IC_{50}$  değerlerine sahip olduğundan akridin turuncusu/etidyum bromür boyama, hücre göçü ve ELISA deneylerinde bu değerler kullanılmıştır.

### **3.4.10. Endoplazmik retikulum stresinin oluşturulması için thapsigarginin *in vitro* olarak hücrelere uygulanması**

MCF-7 ve HCT116 hücrelerinde endoplazmik retikulum stresinin meydana getirilmesi için hücrelerin ekim yapıldığı plaka hangi tip olursa olsun endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak kullanılan Thapsigargin'in son konsantrasyonu DMEM besiyerinin içinde 1 µM olacak şekilde ana stoktan (Thapsigargin ana stoğu: 1 mg/mL DMSO. Thapsigargin, DMSO içinde çözünebildiği için besiyeri yerine sadece DMSO içeren ortam bu tez çalışmasında (-) kontrol olarak kullanılmıştır.) seyreltildikten sonra hücreler, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde 24 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra, yapılacak deneyin içeriğine göre diğer aşamalara geçilmiştir.

### **3.4.11. Akridin turuncusu (AT)/etidyum bromür (EB) boya karışımının uygulanması**

Hücre ölüm çeşitlerinden apoptoz ve nekrozun morfolojik olarak tespiti için floresan mikroskopu kullanılarak akridin turuncusu ve etidyum bromür boyamaları yapılmıştır. Bu metod DNA'ya bağlanan floresan özellikteki boyalar olan akridin turuncusu ve etidyum bromürün; canlı, apoptotik veya nekrotik hücreler tarafından hücre içine farklı miktarlarda alınarak hücrelerin sağlıkları hakkında bilgi vermektedir. Akridin turuncusu hem canlı hem de ölü hücreler tarafından hücre içine alınmaktadır. Bu boya, çift sarmallı nükleik asitlere bağlanınca yeşil floresans; tek sarmallı nükleik asitlerle etkileşime girip bağlanınca kırmızı renkli floresans ışık yaymaktadır. Diğer bir floresans boya olan etidyum bromür ise sadece ölü hücrelerdeki DNA'ya bağlanarak kırmızı floresans ışık yaymaktadır. Sonuçta, canlı hücreler parlak açık yeşil bir çekirdek ve nispeten daha koyu yeşil renkte sitoplazmaya sahiptir. Erken apoptotik bir hücrenin henüz membran bütünlüğü bozulmamıştır fakat yeşil renkli çekirdeğinde bulunan DNA'sı parçalanmaya yeni başlamıştır. Bu durumda, hücrenin çekirdeği sarı, açık kahverengi halinde gözlenmektedir. Geç apoptotik bir hücrenin çekirdeğindeki DNA aşırı şekilde parçalandığı için koyu kahverengi ve kırmızı renklerde görülmektedir. Buna karşın, nekrotik bir hücrede bulunan çekirdek, düzgün ve parlak turuncu renginde gözükmektedir (Takahashi vd. 2004; Nikhil vd. 2013).

Akridin turuncusu/etidyum bromür boyama yöntemi için, MCF-7 ve HCT116 hücreleri sırasıyla 300,000 ve 450,000 hücre/kuyu olacak şekilde 6'lı plakalara ekilerek 24 saat inkübasyondan sonra kuyucukların yüzeyine yapışmış olan hücreler üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. Dışarıdan müdahaleyle herhangi bir zarar vermemek için

dikkatlice PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine MTT testinden elde edilen 24 saatlik IC<sub>50</sub> değerlerine göre gün kurusu ve kükürtlü kayısı ekstraktlarının farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Daha sonra, plaka inkübatöre kaldırılarak hücrelerin örneklerle birlikte 37 °C’de 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. Toz halindeki akrinin turuncusu boyasından steril bir kabın içerisine 1 mg/mL olacak şekilde tartım yapılarak etanolde çözülmüştür. Stok boyadan ihtiyaca göre 1 µg/mL olacak şekilde steril fosfat tamponuyla (pH: 7.4) seyreltme yapılarak kullanılmıştır. Bu seyreltme sonunda, içerisinde 1 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür boyasından (10 mg/mL) katılmıştır. Bu boya karışımı kullanılarak boyanacak hücrenin üzerini geçecek şekilde uygulanmıştır. Yaklaşık 3-4 dakika sonra boya ortamdaki çekilerek atılmış ve bol miktarda steril PBS ile 3 kere yıkanmıştır. Hücre zarı geçirgenliğini, çekirdek ve sitoplazma morfolojisini inceleyip hücrelerin sağlıkları hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla, hücreler akrinin turuncusu/etidyum bromür boya karışımıyla boyanarak invert mikroskopun 200X’lik objektifle floresans fotoğrafları çekilmiştir.

#### **3.4.12. Yara iyileşme testi**

Hücrelerin göçü, yara iyileşme testi yapılarak incelenmiştir. MCF-7 ve HCT116 hücrelerinin ekimi 24’lük plakanın her bir kuyucuğunda MCF-7 ve HCT116 hücreleri için sırasıyla mL’de 60,000 ve 90,000 hücre olacak şekilde 400 µL besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre ekiminin ardından plakalar %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatöre kaldırılmıştır. Sonraki gün hücreler plaka yüzeyine yapıştıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kontrol kuyucukları da dahil olmak üzere tüm kuyucuklar PBS ile yıkanarak temizlenmiştir. %70’lik alkolle steril hale getirilen bir kürdan kullanılarak kuyucukların tam ortasına düz çizgiler çizilerek *in vitro* olarak yara meydana getirilmiştir. Bu işlemin hemen sonrasında plakanın yüzeyinden kalkan veya tam olarak plakadan ayrılmamış hücreleri uzaklaştırmak için kuyucuklar PBS ile tekrar yıkanmıştır. Farklı kayısı türlerinin MTT sonuçlarından elde edilen 24 saatlik IC<sub>50</sub> değerlerine ait konsantrasyonlar hücrelere uygulanarak invert mikroskop kamerasıyla hücre proliferasyonundaki değişimler 0. ve 24. saatlerdeki fotoğraflar 100X büyütmede çekilerek gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.5. ELISA Testleri

Abbeva LTD firmasına ait insan ATF6 (Test Aralığı: 0.312 ng/mL – 20 ng/mL, Duyarlılık: 0.19 ng/mL), XBP1 (Test Aralığı: 78 pg/mL – 5000 pg/mL, Duyarlılık: 46.9 pg/mL) ve Reddot Biotech Inc. firmasına ait CHOP (Test Aralığı: 0.312 ng/mL – 20 ng/mL, Duyarlılık: <0.138 ng/mL) ELISA kitleri firmaların protokollerine göre çalışılmıştır. Buna göre, hücre içi içeriğin elde edilmesi için hücre örnekleri birkaç kere dondurup çözündürülmüştür. Bu yol sayesinde, hücrelerin parçalanmasıyla elde edilen homojenat 20 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj edilerek supernatant toplanmıştır. Daha sonra, mikrosantrifüj tüplerinde 400 µL olacak şekilde toplanan supernatantlar (~400 mg) 1:1 oranında PBS tamponu ile seyreltilip ELISA protokollerine geçilmiştir:

#### 1. ELISA Standartlarının Seyreltilmesi:

##### ATF6

ATF6'ya ait ELISA için 96 kuyucuklu plakada her bir standart için üçer tekrarlı olmak üzere toplamda 21 kuyucuk ayarlanmıştır. Ayrıca, standart içermeyen kör için de üçer tekrarlı olmak üzere toplamda 3 kuyucuk boş bırakılmıştır. Kitten çıkan standardın içine yine kitten çıkan standart seyreltici solüsyondan 1 mL eklenerek konsantrasyonun 20 ng/mL olması sağlanmıştır. Daha sonra, steril 6 mikrosantrifüj tüpünün içine standart seyreltici solüsyondan 500 µL eklenmiştir. Hemen ardından, 20 ng/mL olarak hazırlanan ana stoktan 500 µL alınarak steril 6 mikrosantrifüj tüpünün ilkinde ilave edilmiştir. Sonrasında, ilave edilen bu ilk mikrosantrifüj tüpünden başlayarak sırasıyla bir önceki mikrosantrifüj tüpünden 500 µL alınıp sonraki mikrosantrifüj tüpüne ilave edilerek standartların seri seyreltilmesi yapılmıştır. Standartlar mikrosantrifüj tüplerinde seri olarak seyreltilip ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, tüm standart kuyucuklarına toplam hacim 100 µL olarak yüklenmiştir. Standartlara ait son konsantrasyonlar sırasıyla 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.63 ng/mL ve 0.31 ng/mL'dir.

##### CHOP

CHOP'a ait ELISA için 96 kuyucuklu plakada her bir standart için üçer tekrarlı olmak üzere toplamda 21 kuyucuk ayarlanmıştır. Ayrıca, standart içermeyen kör için de üçer tekrarlı olmak üzere toplamda 3 kuyucuk boş bırakılmıştır. Kitten çıkan standardın içine yine kitten çıkan standart seyreltici solüsyondan 1 mL eklenerek konsantrasyonun 20 ng/mL olması sağlanmıştır. Daha sonra, steril 6 mikrosantrifüj tüpünün içine standart

seyreltici solüsyondan 500 µL eklenmiştir. Hemen ardından, 20 ng/mL olarak hazırlanan ana stoktan 500 µL alınarak steril 6 mikrosantrifüj tüpünün ilkinde ilave edilmiştir. Sonrasında, ilave edilen bu ilk mikrosantrifüj tüpünden başlayarak sırasıyla bir önceki mikrosantrifüj tüpünden 500 µL alınıp sonraki mikrosantrifüj tüpüne ilave edilerek standartların seri seyreltmesi yapılmıştır. Standartlar mikrosantrifüj tüplerinde seri olarak seyreltilip ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, tüm standart kuyucuklarına toplam hacim 100 µL olarak yüklenmiştir. Standartlara ait son konsantrasyonlar sırasıyla 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL ve 0.312 ng/mL'dir.

### **XBP1**

XBP1'e ait ELISA için 96 kuyucuklu plakada her bir standart için üçer tekrarlı olmak üzere toplamda 21 kuyucuk ayarlanmıştır. Ayrıca, standart içermeyen kör için de üçer tekrarlı olmak üzere toplamda 3 kuyucuk boş bırakılmıştır. Kitten çıkan standardın içine yine kitten çıkan standart seyreltici solüsyondan 1 mL eklenerek konsantrasyonun 5000 pg/mL olması sağlanmıştır. Daha sonra, steril 6 mikrosantrifüj tüpünün içine standart seyreltici solüsyondan 500 µL eklenmiştir. Hemen ardından, 20 ng/mL olarak hazırlanan ana stoktan 500 µL alınarak steril 6 mikrosantrifüj tüpünün ilkinde ilave edilmiştir. Sonrasında, ilave edilen bu ilk mikrosantrifüj tüpünden başlayarak sırasıyla bir önceki mikrosantrifüj tüpünden 500 µL alınıp sonraki mikrosantrifüj tüpüne ilave edilerek standartların seri seyreltmesi yapılmıştır. Standartlar mikrosantrifüj tüplerinde seri olarak seyreltilip ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, tüm standart kuyucuklarına toplam hacim 100 µL olarak yüklenmiştir. Standartlara ait son konsantrasyonlar sırasıyla 5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312 pg/mL, 156 pg/mL ve 78.1 pg/mL'dir.

2. Gruplara ait örnekler 100 µL olarak kuyucuk duvarına değmeden plakanın dibine yüklenmiştir.
3. **İnkübasyon:** Plakanın üzeri yapışkan filmle tamamen kapatıldıktan sonra spektrofotometre (mikroplaka okuyucu), önceden ayarlanan Gen5 programı sayesinde plakayı içine alıp 5 saniye boyunca orbital olarak sallayıp iyice karıştırması sağlanmıştır. Cihaz içindeki ATF6, CHOP ve XBP1 plakaları 37 °C'de 90 dakika inkübe edilmiştir.

4. Plakaların üzerini kapatmak için kullanılan yapışkan filmler dikkatlice kaldırılarak atılmıştır. Kuyucuklardaki solüsyon aspire edilmiştir. Tespit etme solüsyonu A'dan 100'er  $\mu\text{L}$  olmak üzere tüm kuyucuklara eklenmiş ve plakaların üzeri yapışkan filmlerle tamamen kapatıldıktan sonra plakalar spektrofotometre tarafından 5 saniye boyunca orbital olarak sallanıp iyice karıştırılmıştır. Hemen sonrasında plakalar, ATF6 ve XBP1 için 1 saat; CHOP için 45 dakika süresince 37 °C'de inkübe edilmiştir.
5. **Yıkama 1:** Plakaların üzerini kapatmak için kullanılan yapışkan filmler dikkatlice kaldırılarak atılmıştır. Kuyucuklardaki solüsyon aspire edilmiştir. Kitteki yıkama solüsyonuyla ATF6 ve XBP1 için 350  $\mu\text{L}$ , CHOP için 300  $\mu\text{L}$  olmak üzere plaka üzerindeki her kuyucuk toplamda 3 kez yıkanmıştır.
6. Daha sonra, tespit etme solüsyonu B'den 100'er  $\mu\text{L}$  olmak üzere tüm kuyucuklara eklenmiş ve plakaların üzeri yapışkan filmlerle tamamen kapatıldıktan sonra plakalar spektrofotometre tarafından 5 saniye boyunca orbital olarak sallanıp iyice karıştırılmıştır. Hemen sonrasında plakalar, ATF6 ve XBP1 için yarım saat; CHOP için 45 dakika süresince 37 °C'de inkübe edilmiştir.
7. **Yıkama 2:** Plakaların üzerini kapatmak için kullanılan yapışkan filmler dikkatlice kaldırılarak atılmıştır. Kuyucuklardaki solüsyon aspire edilmiştir. Kitteki yıkama solüsyonuyla ATF6 ve XBP1 için 350  $\mu\text{L}$ , CHOP için 300  $\mu\text{L}$  olmak üzere plaka üzerindeki her kuyucuk toplamda 5 kez yıkanmıştır.
8. **Renklendirme:** Sonrasında, tüm kuyucuklara 90  $\mu\text{L}$  TMB substratı ilave edilmiştir. Plakaların üzeri yapışkan filmlerle tamamen kapatıldıktan sonra plakalar spektrofotometre tarafından 5 saniye boyunca orbital olarak sallanıp iyice karıştırılmıştır. Hemen sonrasında plakalar, ATF6 ve XBP1 için 15 dakika; CHOP için 20 dakika süresince 37 °C'de inkübe edilmiştir. Renklendirme sırasında ışıktan kaçınılmıştır. Substrat solüsyonunun eklenmesinden sonra kuyucuklar mavi renkli görülmüştür.
9. **Sonlandırma:** Reaksiyonu sonlandırmak için her kuyucuğa 50  $\mu\text{L}$  durdurma solüsyonu eklendikten hemen sonra kuyudaki rengin maviden sarıya değiştiği gözlenmiştir. Plakalar spektrofotometre tarafından 5 saniye boyunca orbital

olarak sallanıp iyice karıştırılmış ve 450 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Kör kontrol kuyularının 450 nm'deki optik yoğunluk değerlerinin ortalaması diğer kuyucuklardan çıkartılarak örneklerin net değerleri belirlenmiştir.

### **3.6. İstatistiksel Analizler**

Gruplar arası farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Post Hoc LCD testi (IBM SPSS Statistics Version 24) ile hesaplanmıştır ( $p < 0.05$ ).



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

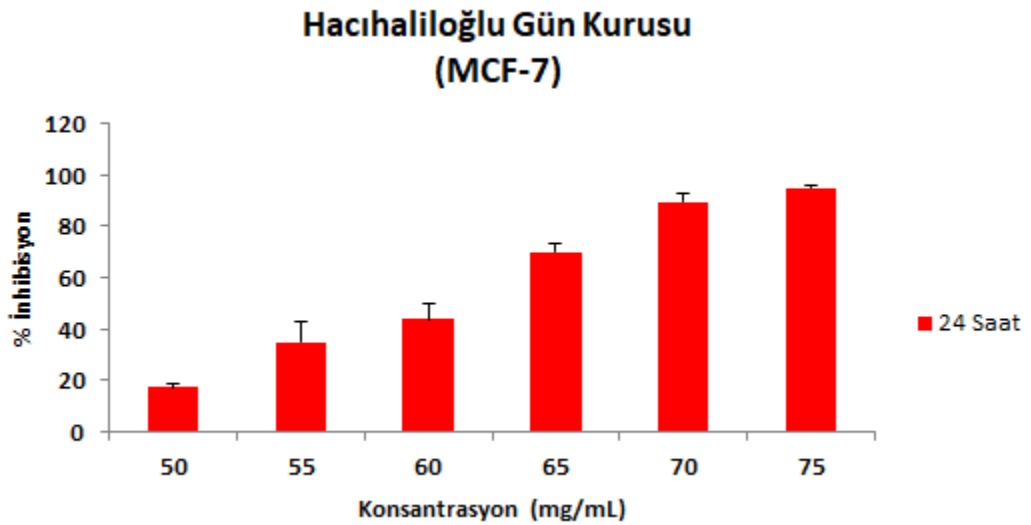
### 4.1. MCF-7 Hücrelerinin MTT Testi Sonuçları

Hacıhaliloğlu Gün Kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü olmak üzere dört farklı kayısı çeşidine ait metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyona sahip çözeltileri MCF-7 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiş ve spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbanslar ile MCF-7 hücrelerine ait % canlılık ve inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Hücre proliferasyonunda meydana gelen değişiklikler MTT testi ile belirlenmiştir.

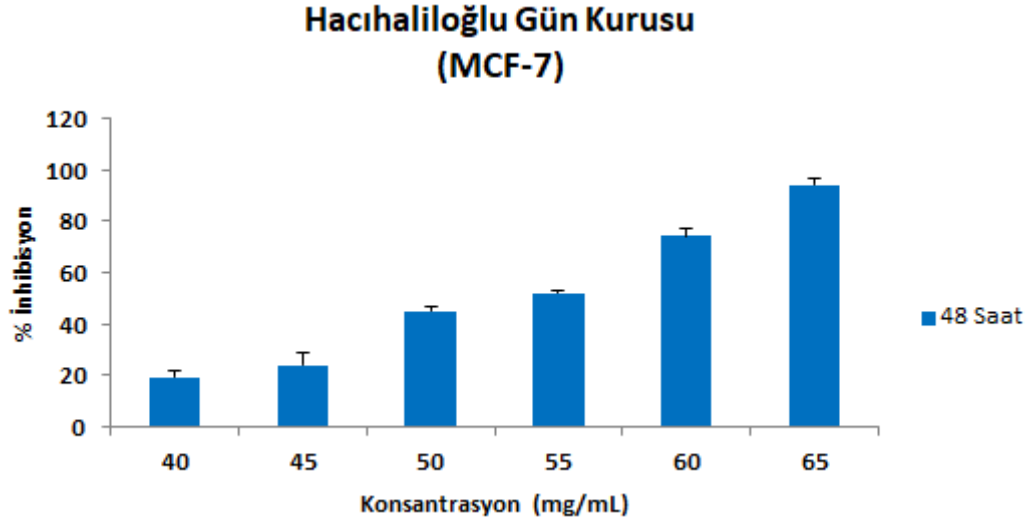
#### 4.1.1. Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktlar ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi sonuçları

##### 4.1.1.1. Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

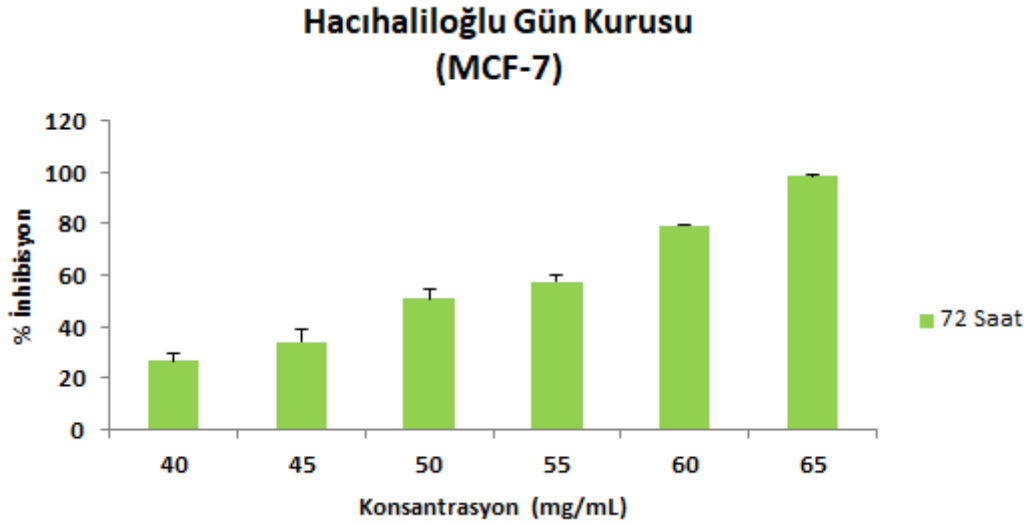
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’de verilmiştir.



**Şekil 4.1 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.2 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kuruşu kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.3 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kuruşu kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

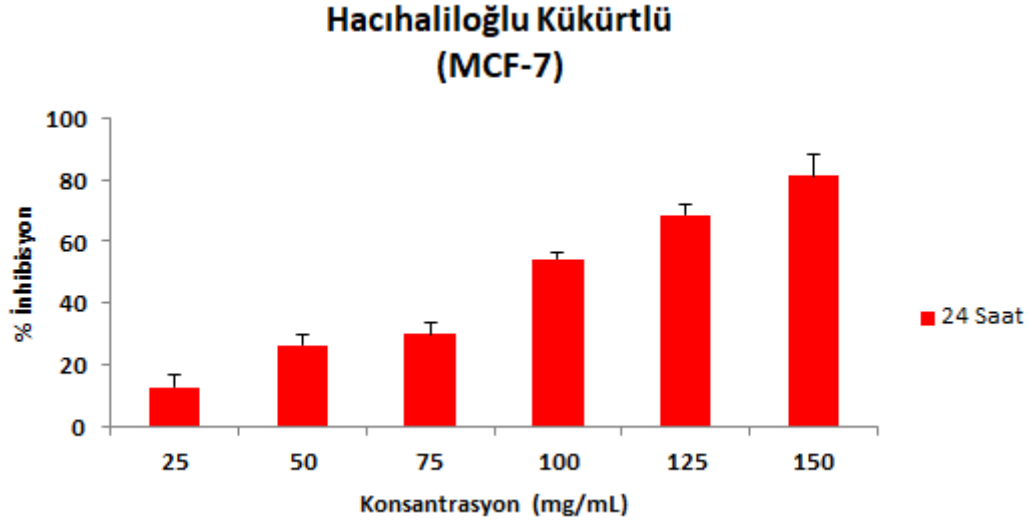
**Çizelge 4.1 :** Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

Metanol Ekstraktı	MCF-7 (10,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri					
		Kons.	50	55	60	65	70
Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu	<b>24 Saat</b>	82.73 $\pm$ 1.43	65.12 $\pm$ 7.59	56.33 $\pm$ 5.73	30.36 $\pm$ 3.64	10.75 $\pm$ 3.16	5.22 $\pm$ 1.12
	<b>48 Saat</b>	80.73 $\pm$ 2.36	76.30 $\pm$ 4.82	54.98 $\pm$ 1.69	48.20 $\pm$ 1.32	25.98 $\pm$ 3.00	6.14 $\pm$ 2.43
	<b>72 Saat</b>	73.28 $\pm$ 2.85	65.93 $\pm$ 4.89	49.41 $\pm$ 4.21	42.58 $\pm$ 2.83	20.79 $\pm$ 0.53	1.55 $\pm$ 0.46
	<b>Kons.</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>
	<b>24 Saat</b>	82.73 $\pm$ 1.43	65.12 $\pm$ 7.59	56.33 $\pm$ 5.73	30.36 $\pm$ 3.64	10.75 $\pm$ 3.16	5.22 $\pm$ 1.12
	<b>48 Saat</b>	80.73 $\pm$ 2.36	76.30 $\pm$ 4.82	54.98 $\pm$ 1.69	48.20 $\pm$ 1.32	25.98 $\pm$ 3.00	6.14 $\pm$ 2.43

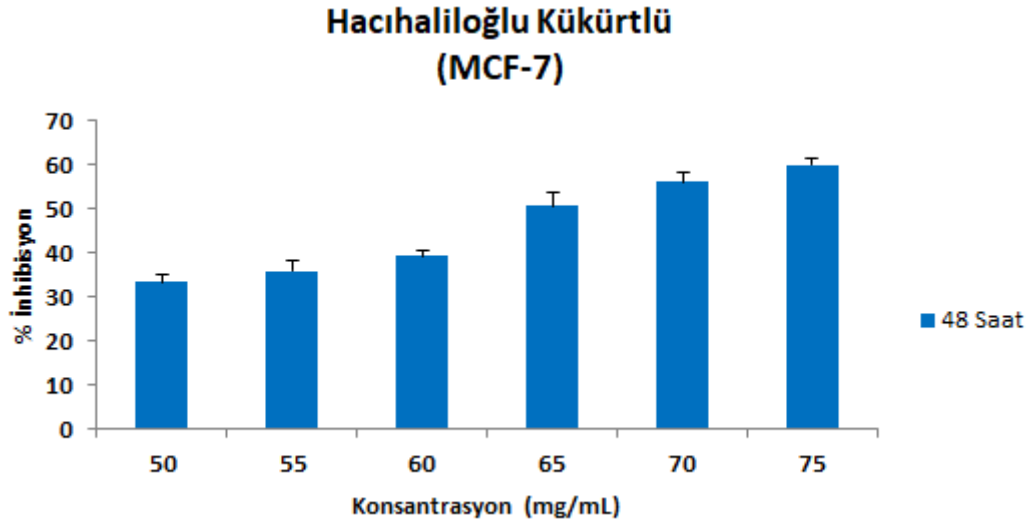
Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.1’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu kayısı ekstraktları arasında MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonunda %82.73 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 50 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 48 ve 72 saatler sonundaki en yüksek hücre canlılık değerleri ise sırasıyla %80.73 ve %73.28’lik oranlarla 40 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

#### 4.1.1.2. Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

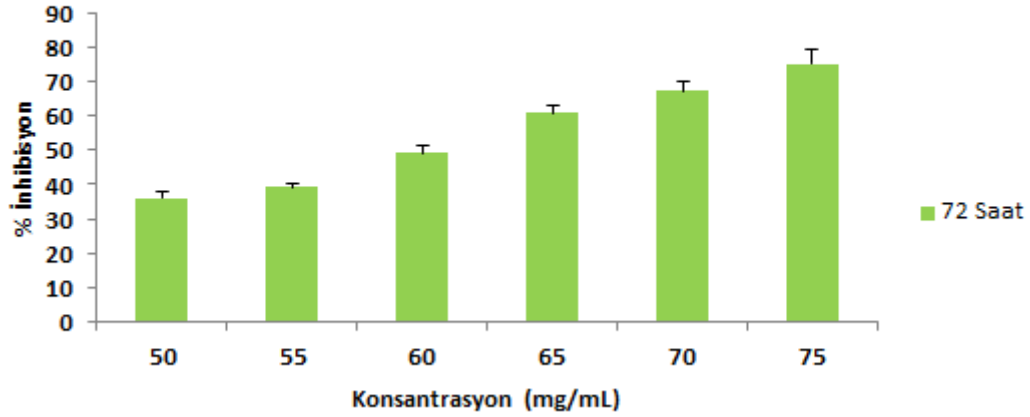


**Şekil 4.4 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.5 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

### Hacıhaliloğlu Kükürtlü (MCF-7)



**Şekil 4.6 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

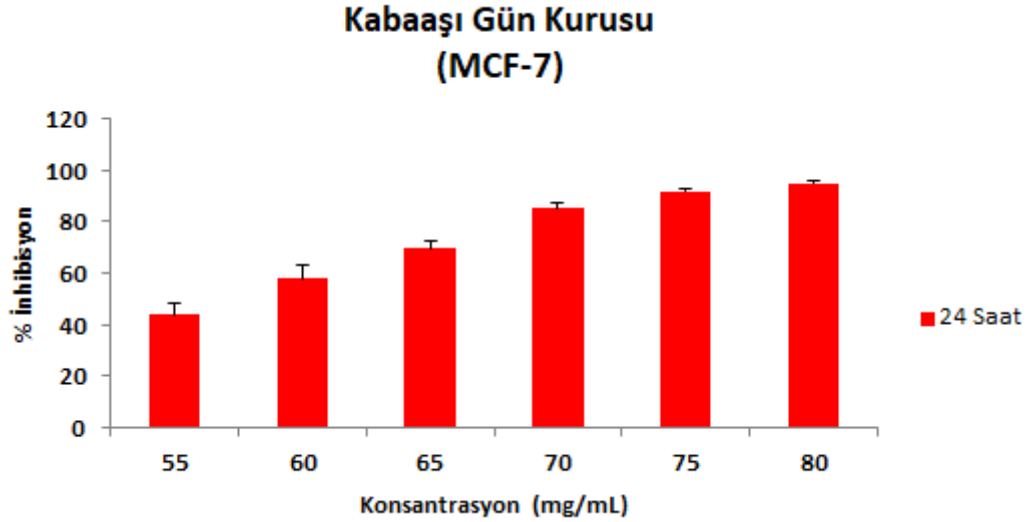
**Çizelge 4.2 :** Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

Metanol Ekstraktı	MCF-7 (10,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri					
		Kons.	25	50	75	100	125
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	<b>24 Saat</b>	87.38 $\pm$ 4.37	73.77 $\pm$ 3.33	70.23 $\pm$ 3.97	45.56 $\pm$ 1.91	31.41 $\pm$ 3.68	18.74 $\pm$ 7.13
	<b>48 Saat</b>	66.81 $\pm$ 1.76	64.32 $\pm$ 2.63	60.89 $\pm$ 1.30	49.54 $\pm$ 3.32	44.13 $\pm$ 2.45	40.18 $\pm$ 1.44
	<b>72 Saat</b>	63.89 $\pm$ 1.84	60.65 $\pm$ 0.70	50.96 $\pm$ 2.02	39.05 $\pm$ 2.15	32.58 $\pm$ 2.74	24.72 $\pm$ 4.13
	<b>Kons.</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>	<b>75</b>
	<b>72 Saat</b>	63.89 $\pm$ 1.84	60.65 $\pm$ 0.70	50.96 $\pm$ 2.02	39.05 $\pm$ 2.15	32.58 $\pm$ 2.74	24.72 $\pm$ 4.13

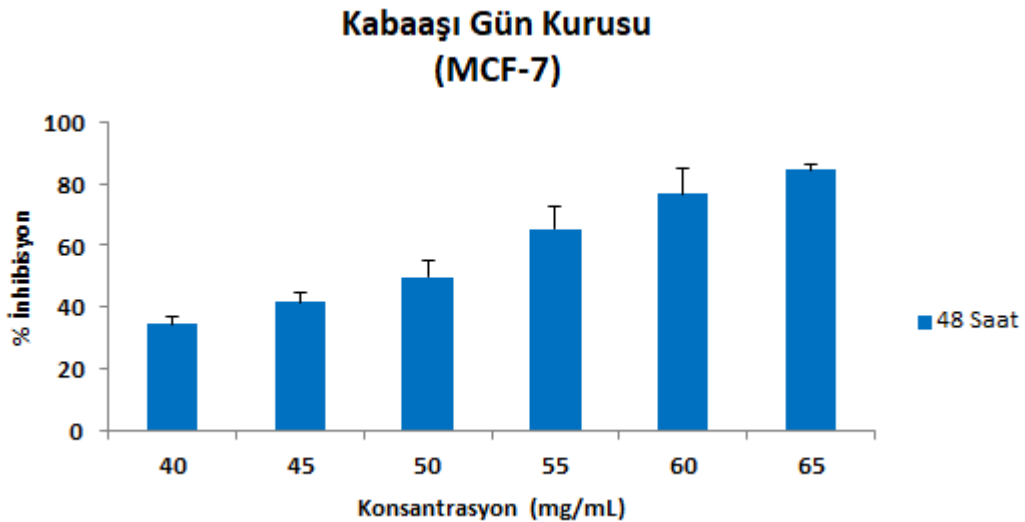
Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.2’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı ekstraktları arasında MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonunda %87.38 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 25 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 48 ve 72 saatler sonundaki en yüksek hücre canlılık değerleri ise sırasıyla %66.81 ve %63.89’luk oranlarla 50 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

#### 4.1.1.3. Kabaşı Gün Kuru kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

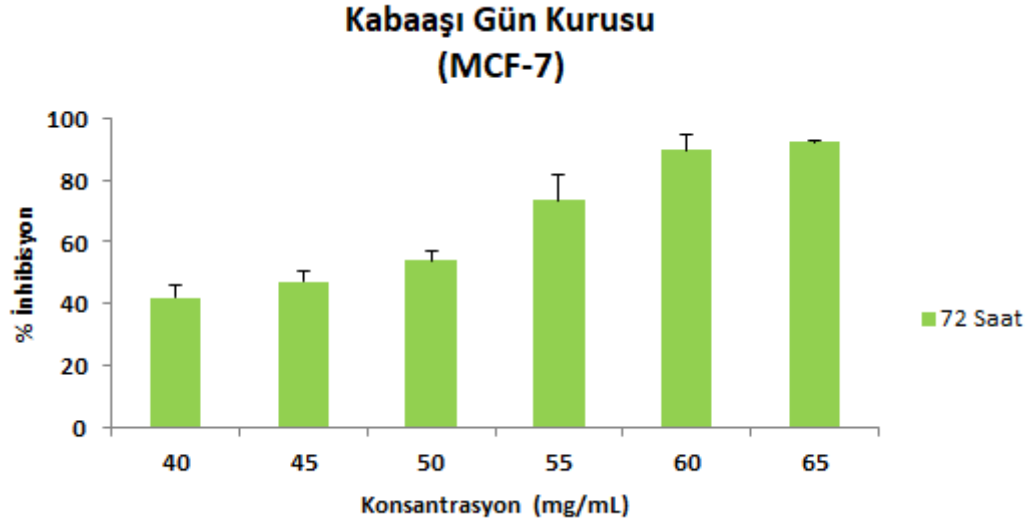
Kabaşı Gün Kuru kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’da verilmiştir.



**Şekil 4.7 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaşı Gün Kuru kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.8 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaşı Gün Kuru kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.9 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaaşı Gün Kuruğu kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

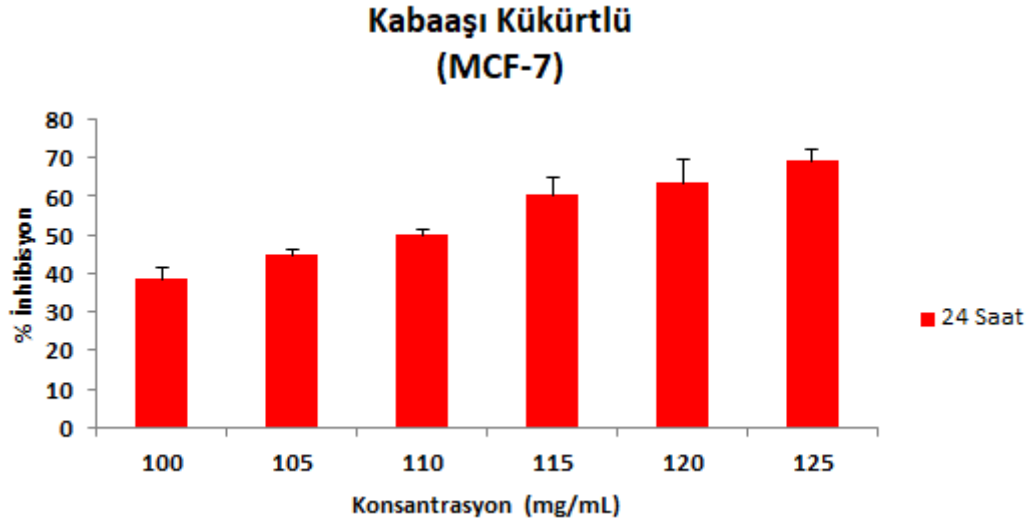
**Çizelge 4.3 :** Kabaaşı Gün Kuruğu kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

Metanol Ekstraktı	MCF-7 (10,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri					
		Kons.	55	60	65	70	75
Kabaaşı Gün Kuruğu	<b>24 Saat</b>	56.24 $\pm$ 4.72	42.19 $\pm$ 4.98	30.44 $\pm$ 2.56	15.09 $\pm$ 2.04	8.35 $\pm$ 0.72	5.35 $\pm$ 0.97
	<b>Kons.</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>
	<b>48 Saat</b>	65.42 $\pm$ 2.29	58.52 $\pm$ 3.46	50.37 $\pm$ 5.73	34.60 $\pm$ 7.41	23.19 $\pm$ 8.14	15.46 $\pm$ 1.68
	<b>72 Saat</b>	57.94 $\pm$ 4.09	52.79 $\pm$ 3.06	45.92 $\pm$ 2.83	26.55 $\pm$ 8.08	10.45 $\pm$ 4.89	7.78 $\pm$ 0.69

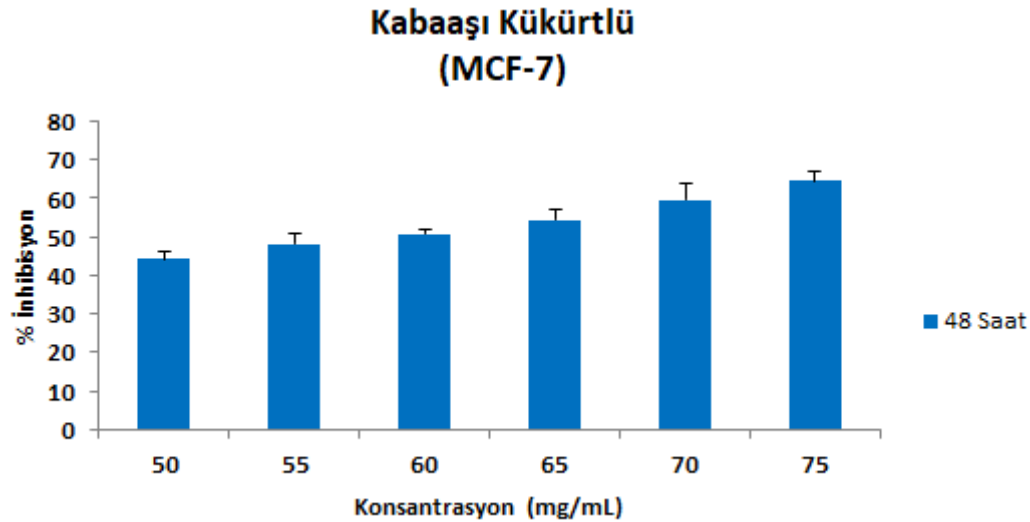
Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.3’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kabaaşı Gün Kuruğu kayısı ekstraktları arasında MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonunda %56.24 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 55 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 48 ve 72 saatler sonundaki en yüksek hücre canlılık değerleri ise sırasıyla %65.42 ve %57.94’lük oranlarla 40 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

#### 4.1.1.4. Kabaası Kükürtlü kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

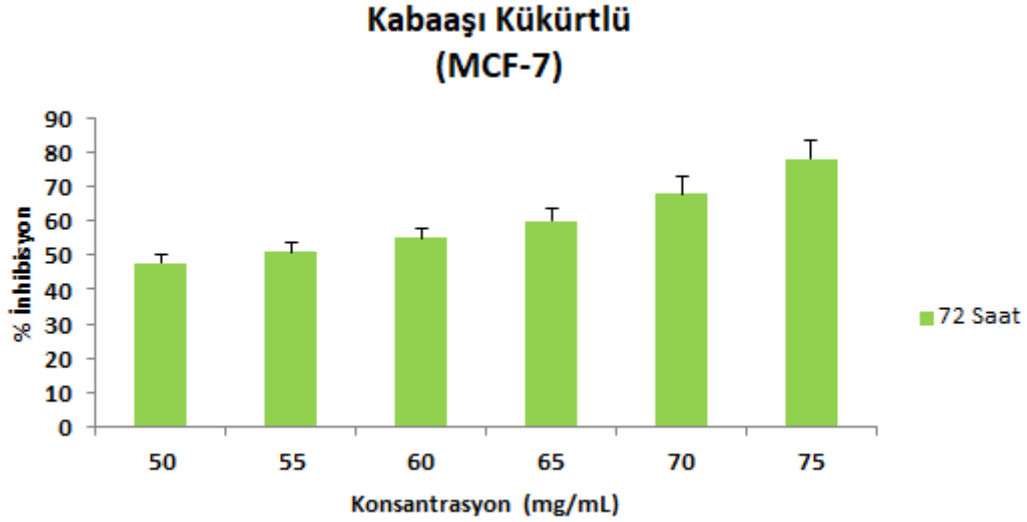
Kabaası Kükürtlü kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12’de verilmiştir.



**Şekil 4.10 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.11 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.12 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaaşı Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

**Çizelge 4.4 :** Kabaaşı Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

Metanol Ekstraktı	MCF-7 (10,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri						
		Kons.	100	105	110	115	120	125
Kabaaşı Kükürtlü	<b>24 Saat</b>		61.47 $\pm$ 3.07	55.21 $\pm$ 1.55	50.16 $\pm$ 1.31	39.67 $\pm$ 4.79	36.51 $\pm$ 6.09	30.86 $\pm$ 3.15
	<b>Kons.</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>	<b>75</b>	
	<b>48 Saat</b>	55.90 $\pm$ 2.24	51.82 $\pm$ 2.49	49.30 $\pm$ 1.28	45.74 $\pm$ 2.98	40.44 $\pm$ 4.20	35.54 $\pm$ 2.30	
	<b>72 Saat</b>	52.43 $\pm$ 2.69	48.97 $\pm$ 2.78	44.88 $\pm$ 2.63	39.94 $\pm$ 3.72	32.22 $\pm$ 5.04	21.96 $\pm$ 5.66	

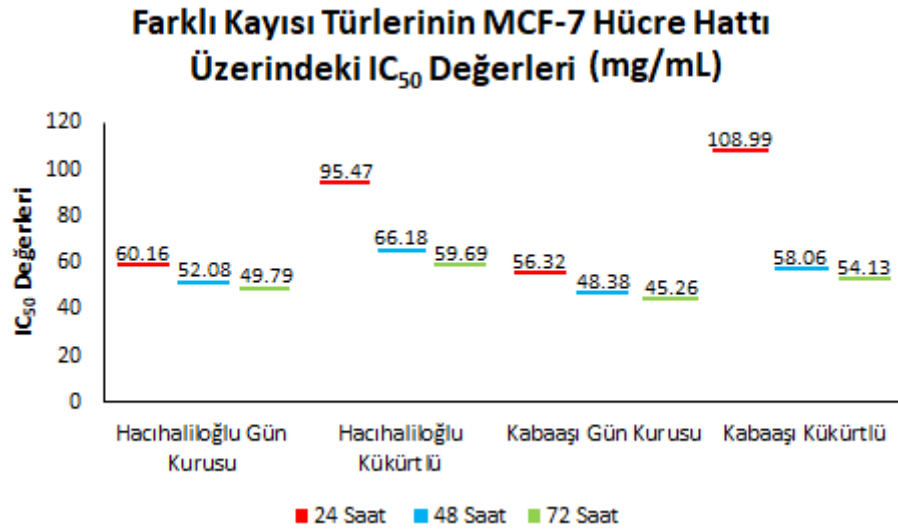
Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.4'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kabaaşı Kükürtlü kayısı ekstraktları arasında MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonunda %61.47 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 100 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 48 ve 72 saatler sonundaki en yüksek hücre canlılık değerleri ise sırasıyla %55.90 ve %52.43'lük oranlarla 50 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

#### 4.1.2 Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktların MCF-7 hücrelerindeki IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi

Hacıhaliloğlu Gün Kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin Çizelge 4.5'deki IC<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktı 24 saat sonunda 56.32 mg/mL, 48 saat sonunda 48.38 mg/mL ve 72 saat sonunda 45.26 mg/mL olmak üzere en iyi IC<sub>50</sub> değerlerine sahiptir.

**Çizelge 4.5 :** Kayısı çeşitlerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri.

MCF-7 (10,000 Hücre)	Metanol Ekstraktlı Uygulama Gruplarının IC <sub>50</sub> Değerleri (mg/mL)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu	60.16	52.08	49.79
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	95.47	66.18	59.69
Kabaası Gün Kurusu	56.32	48.38	45.26
Kabaası Kükürtlü	108.99	58.06	54.13

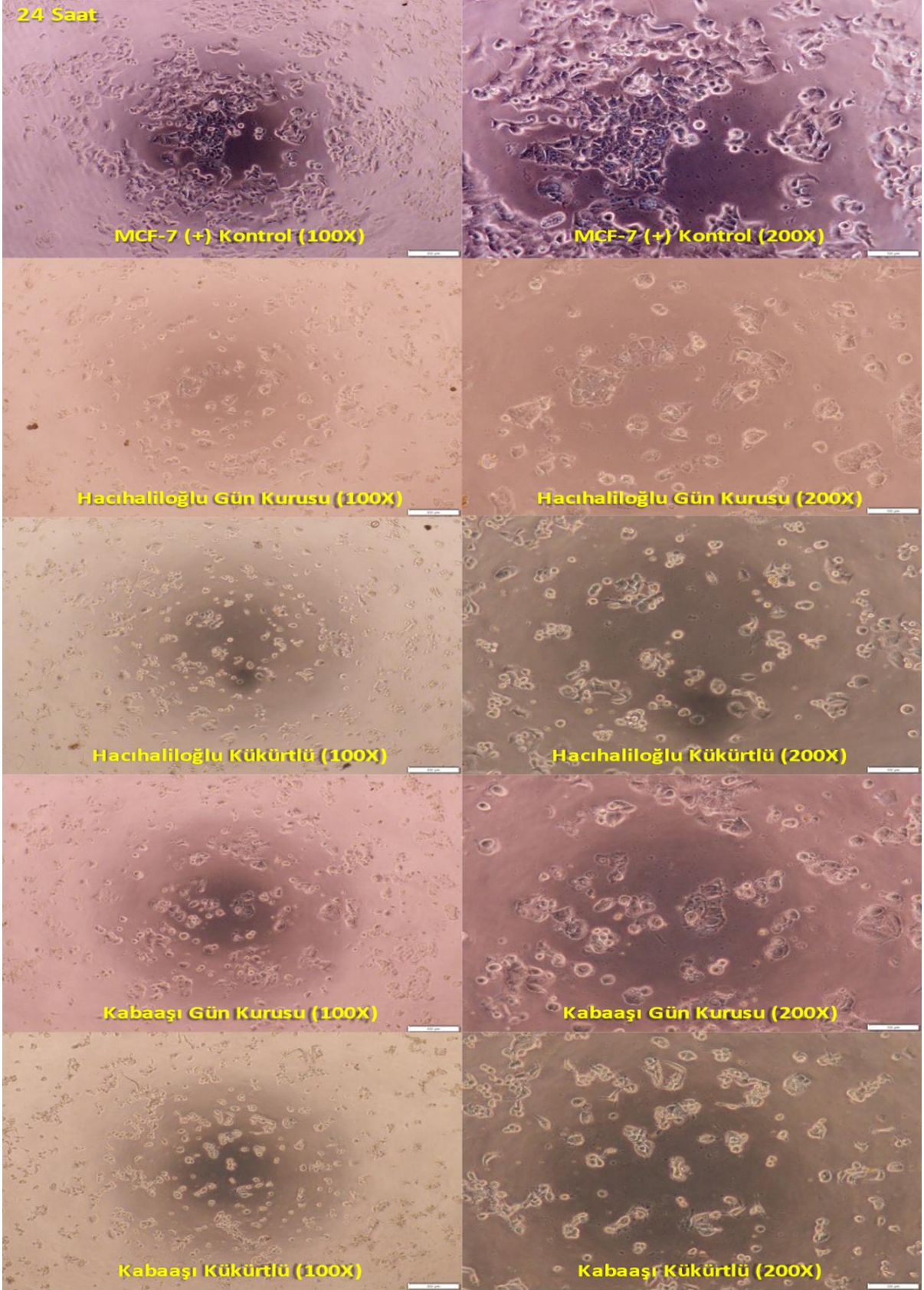


**Şekil 4.13 :** Farklı kayısı türlerinin MCF-7 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri grafiği.

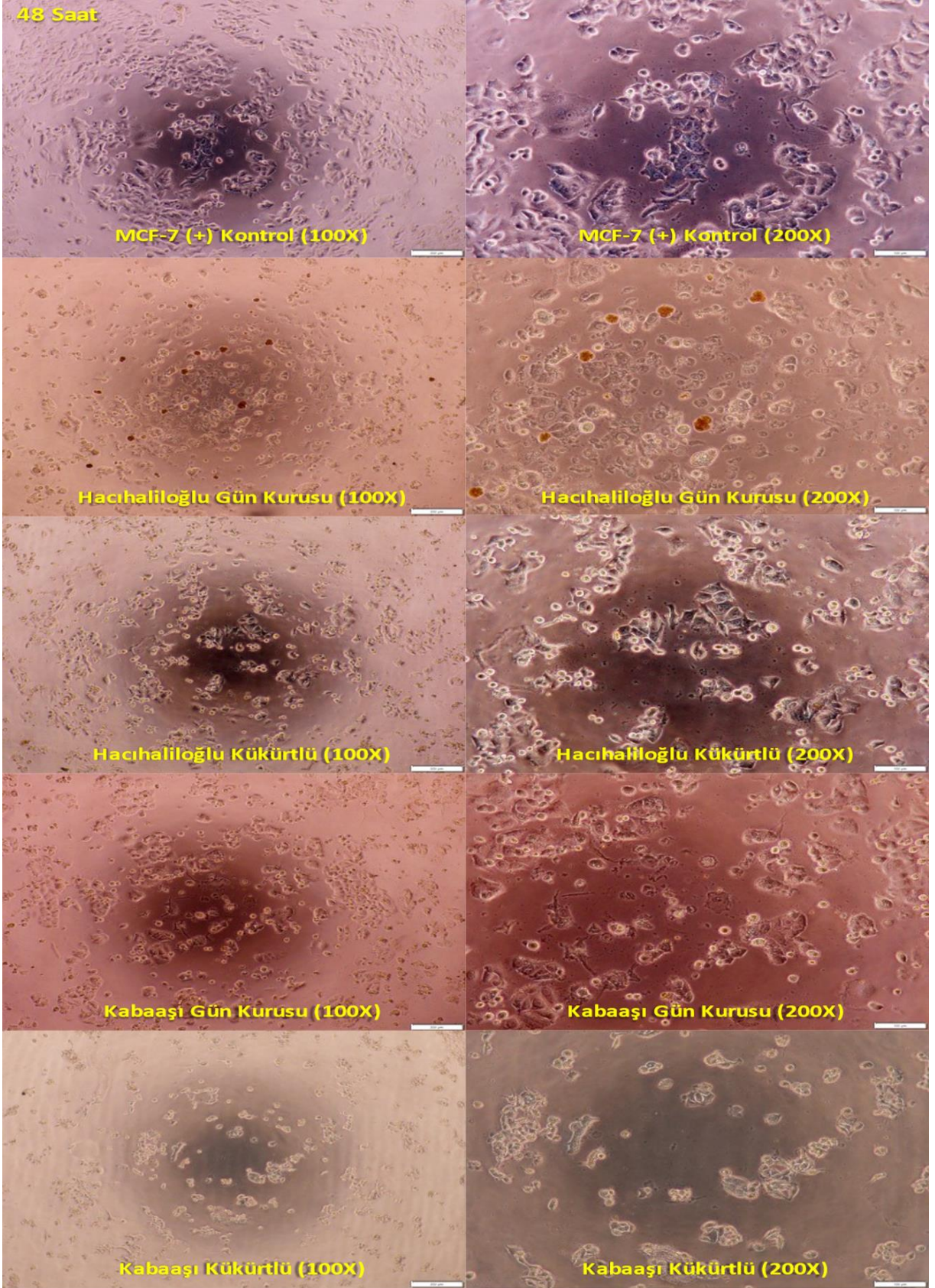
Farklı kayısı türlerinin MCF-7 (insan meme kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde elde edilen veriler ışığında IC<sub>50</sub> değerleri Şekil 4.13'ten de anlaşılacağı gibi, Hacıhaliloğlu Gün Kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraksiyonları sırasıyla 24 saat için 60.16, 95.47, 56.32 ve 108.99 mg/mL, 48 saat için 52.08, 66.18, 48.38 ve 58.06 mg/mL, 72 saat içinse 49.79, 59.69, 45.26 ve 54.13 mg/mL IC<sub>50</sub> değerlerine sahiptir. Her iki kayısı türü için de

kükürtlenmiş kayısların gün kurusu kayıslara göre 24 saatin sonunda  $IC_{50}$  değerleri daha yüksektir.  $IC_{50}$  değerleri açısından dalgalanma kükürtlenmiş kayıslarda gün kurusu kayıslara göre fazladır. Gün kurusu kayıslarda ise antikanser özellik bakımından kükürtlenmiş kayıslara kıyasla zamanla çok büyük bir değişim gözlemlenmemiştir. Ayrıca,  $IC_{50}$  değerleri açısından 24, 48 ve 72 saatlik MCF-7 hücre görüntülerine Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.

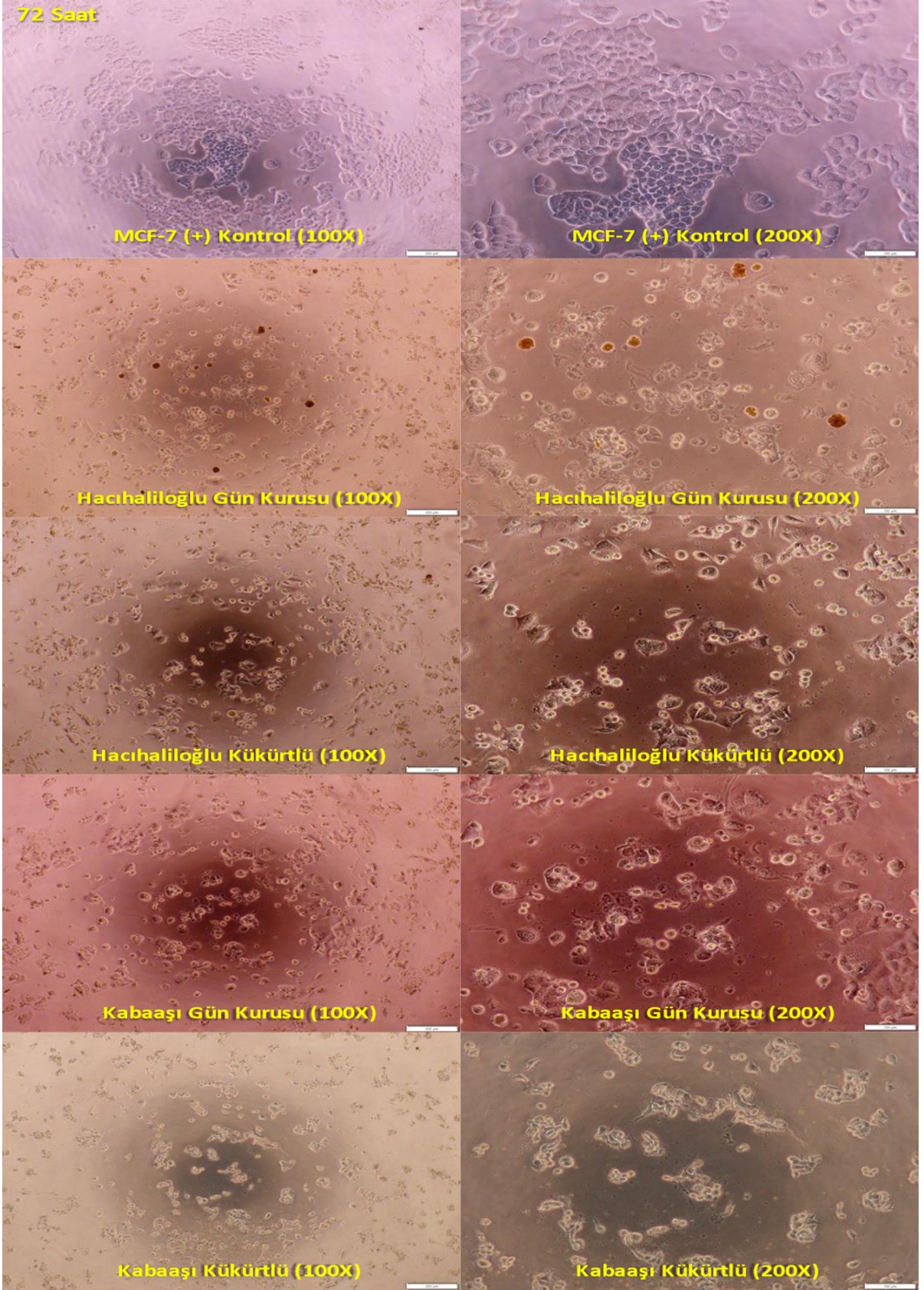




**Şekil 4.14 :** Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütmeye ait görüntülerdeki bar 200  $\mu\text{m}$ , 200X büyütmeye ait görüntülerdeki bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.)



**Şekil 4.15 :** Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütme için görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütme için görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)

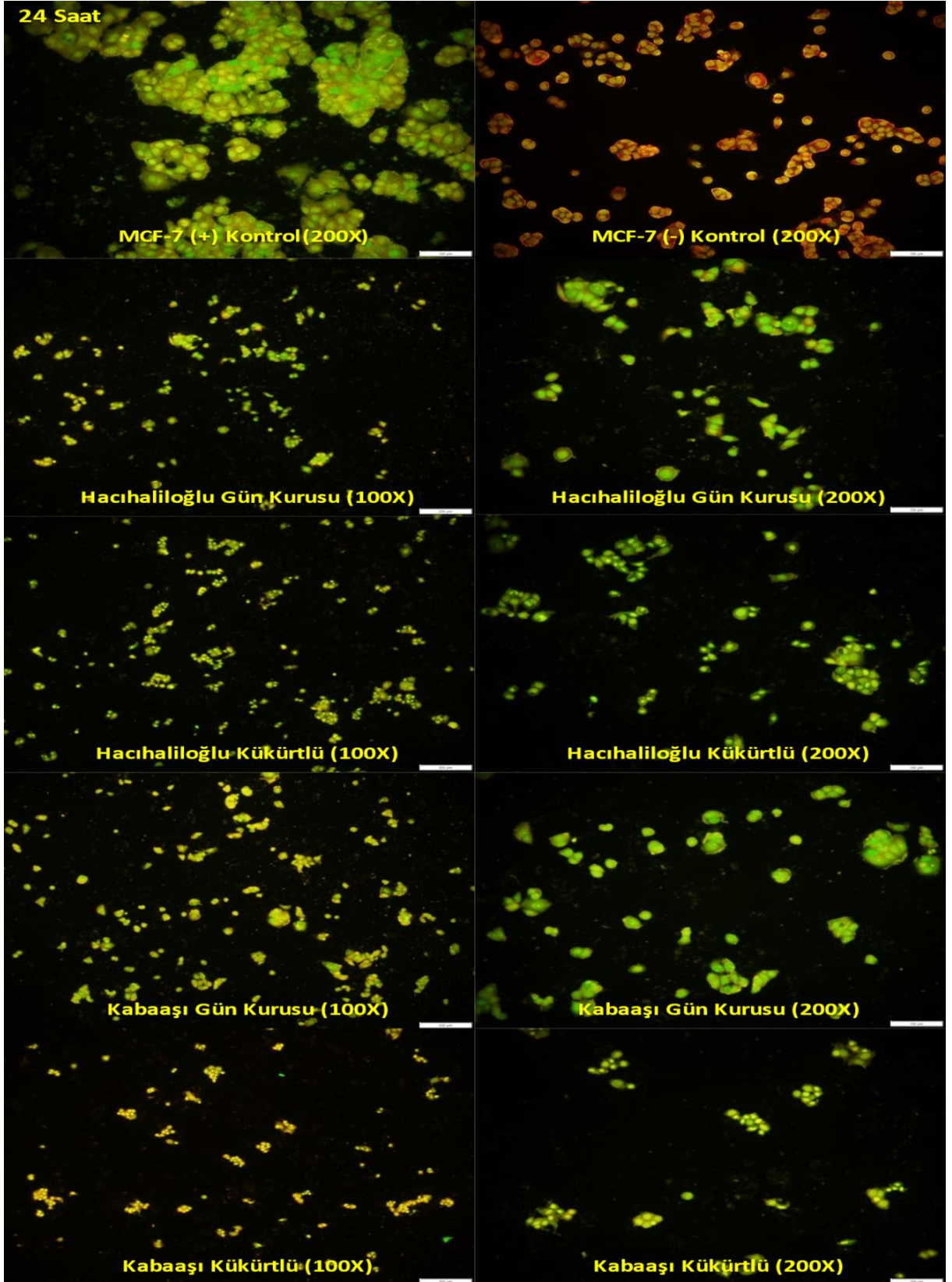


**Şekil 4.16 :** Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütmeye ait görüntülerdeki bar 200  $\mu\text{m}$ , 200X büyütmeye ait görüntülerdeki bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.)

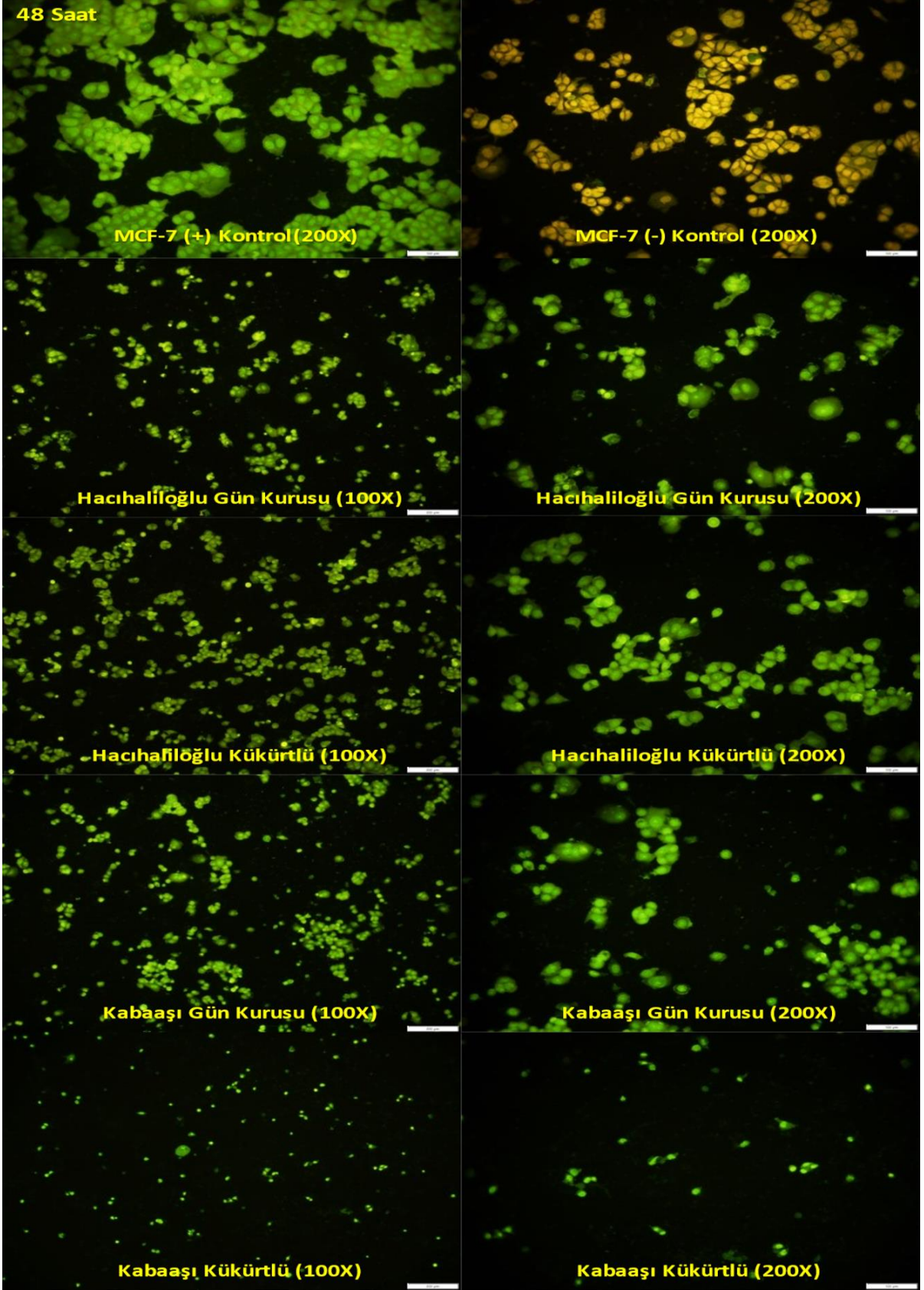
#### 4.2. MCF-7 Hücrelerinin AT/EB Boyama Sonuçları

Hacıhaliloğlu Gün Kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü çeşitlerinin metanol ekstraktlarına ait IC<sub>50</sub> değerleriyle belirlenen konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat boyunca MCF-7 hücrelerine uygulanıp akridin turuncusu ve etidyum bromür ile boyanarak floresans fotoğrafları çekilmiştir. Görüntülere Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19'dan ulaşılabilir. Floresans görüntüler incelendiğinde, hücre morfolojisi açısından sağlıklı hücreler açık yeşil ve koyu yeşil renklerde görülmelerine rağmen erken apoptotik hücreler sarı, açık kahverengi renklerde; geç apoptotik hücreler ise koyu kahverengi ve kırmızı renklerde görülmektedir.

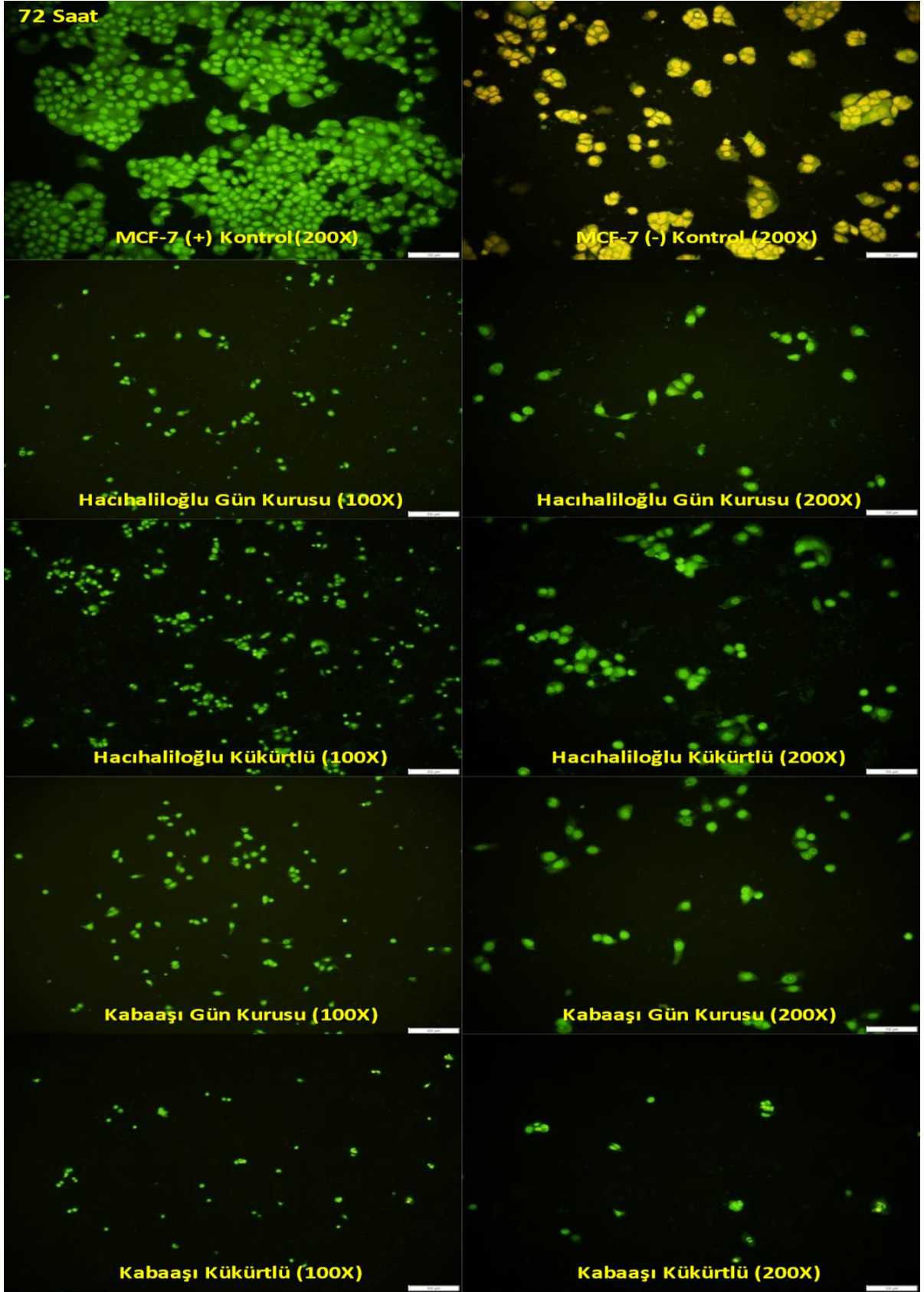




**Şekil 4.17 :** Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 200  $\mu\text{m}$ , 200X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.)



**Şekil 4.18** : Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 200  $\mu\text{m}$ , 200X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.)

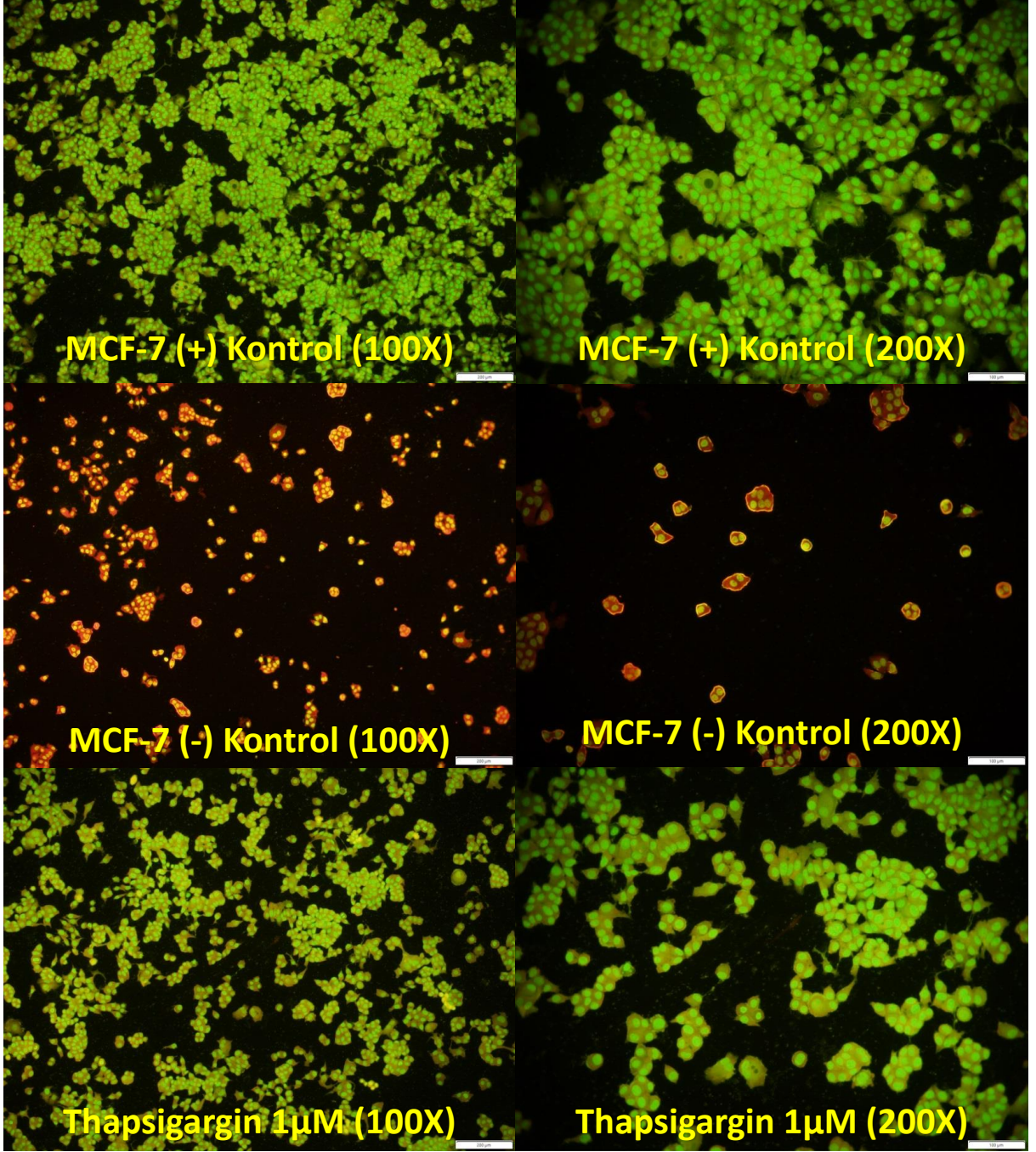


**Şekil 4.19** : Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütme ait görüntülerdeki bar 200  $\mu\text{m}$ , 200X büyütme ait görüntülerdeki bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.)

Çalışmamızın bundan sonraki aşamasında endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak hücre kültüründe kullanacağımız thapsigargin için 1  $\mu$ M olmak üzere MCF-7 hücreleri üzerinde uygulanarak, hücrelere ait morfolojik değişikliklerin gözlemlenmesi amacıyla hücrelerin invert mikroskop resimleri çekilmiştir (Şekil 4.20). Bunun yanında, Akridin turuncusu (AT)/Etidyum bromür (EB) boyaması yapılarak da hücrelerin morfolojik sağlıkları floresans mikroskop yardımıyla gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).



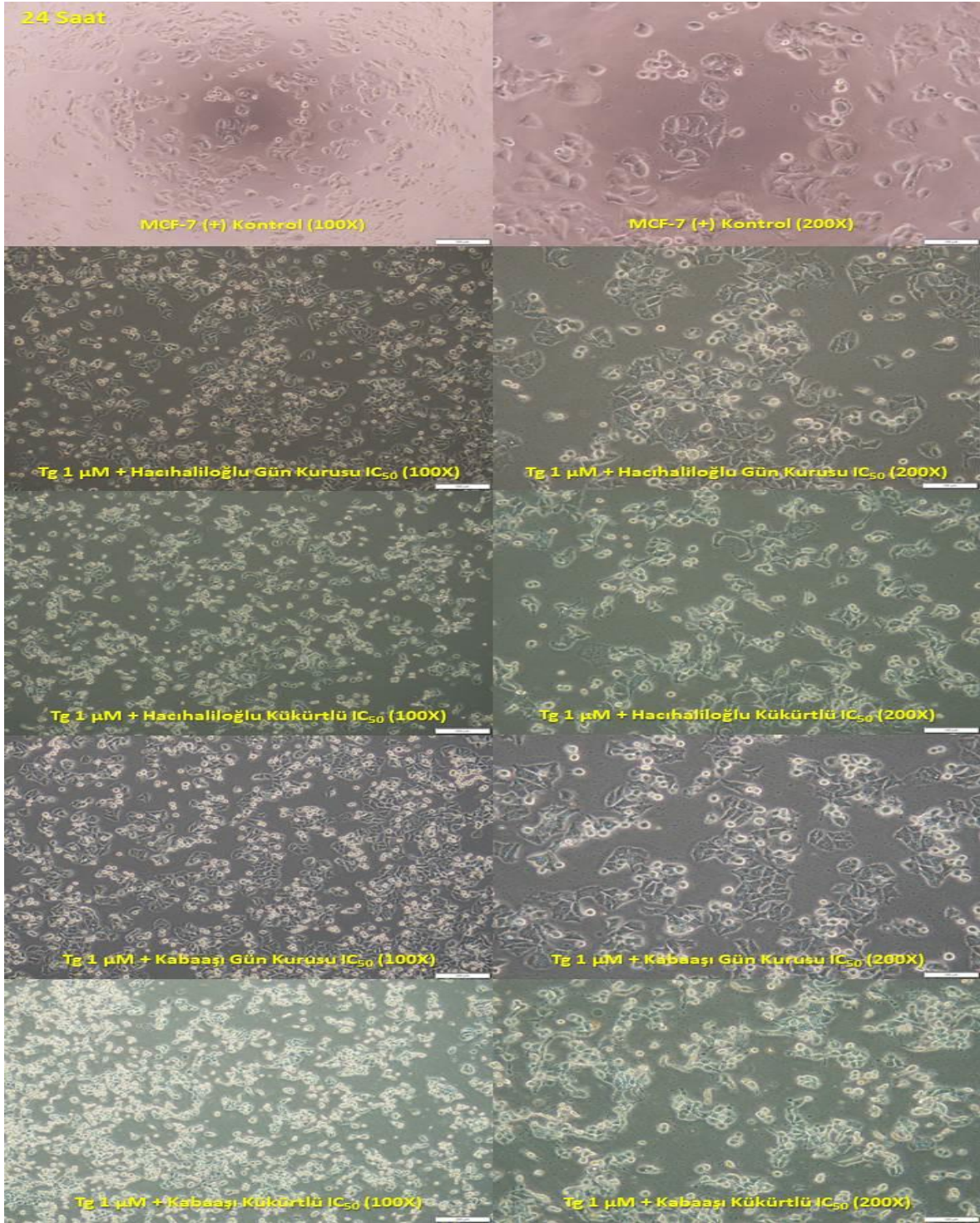
**Şekil 4.20 :** Thapsigargin ile 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütme için görüntülerdeki bar 200  $\mu$ m, 200X büyütme için görüntülerdeki bar 100  $\mu$ m'dir.)



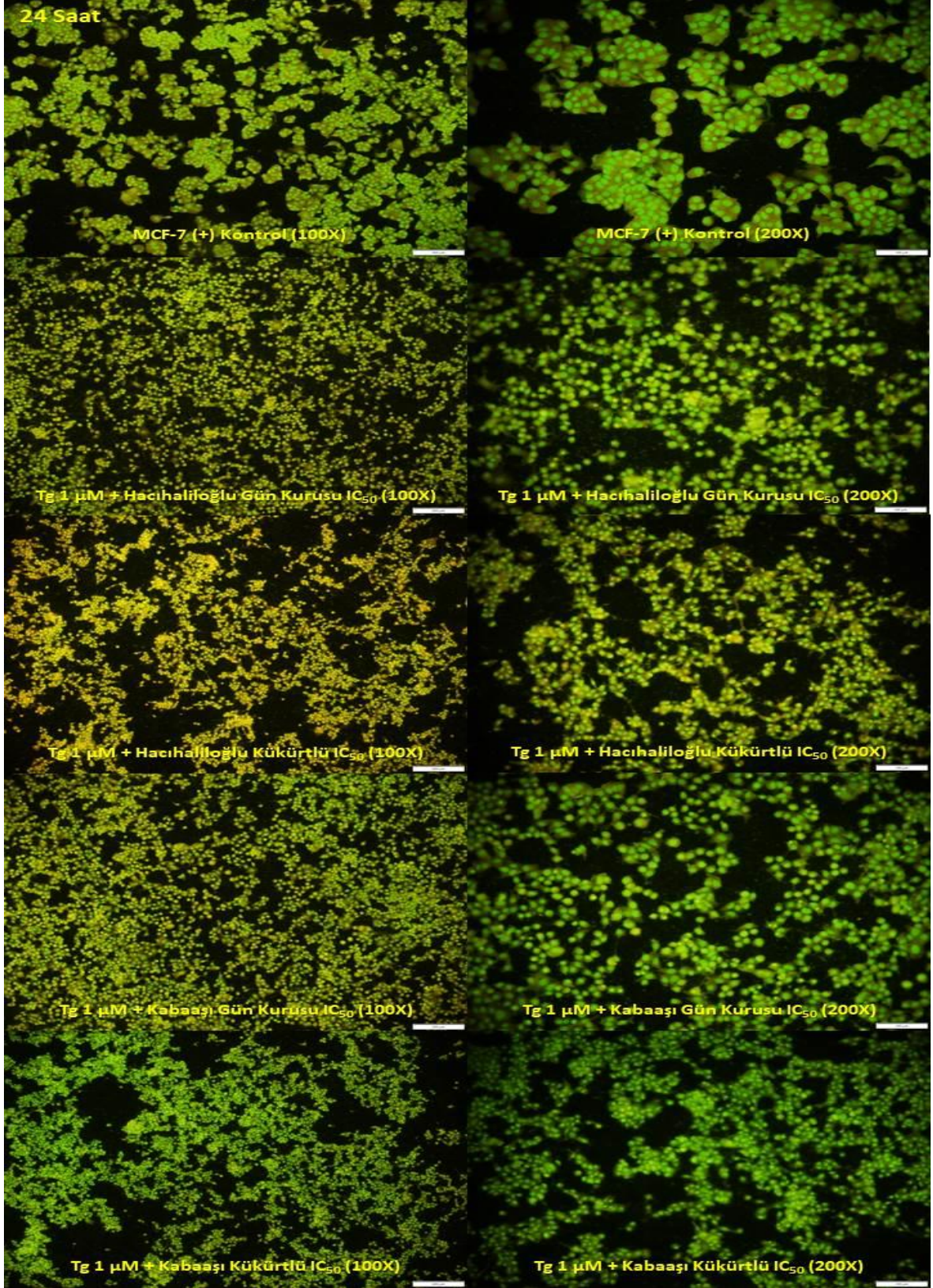
**Şekil 4.21 :** Thapsigargin ile 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütme için görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütme için görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)

Bir sonraki aşamada, endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak hücre kültüründe kullanacağımız 1 µM thapsigargin ile birlikte Hacihaliloğlu Gün Kuruğu, Hacihaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kuruğu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraktlarının IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri MCF-7 hücreleri üzerinde 24 saat deneyerek hücrelere ait morfolojik değişikliklerin gözlemlenmesi amacıyla hücrelerin invert mikroskop resimleri çekilmiştir (Şekil 4.22). Bunun yanında, Akridin turuncusu

(AT)/Etidyum bromür (EB) boyaması yapılarak da hücrelerin sağlıkları floresans mikroskop yardımıyla gözlenmiştir (Şekil 4.23).



**Şekil 4.22** : Thapsigargin ve farklı kayısların IC<sub>50</sub> değerlerinin birlikte 24 saat boyunca uygulanmasıyla MCF-7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyötmeye ait görüntülerdeki bar 200  $\mu$ m, 200X büyötmeye ait görüntülerdeki bar 100  $\mu$ m'dir.)



**Şekil 4.23 :** Thapsigarginin ve farklı kayısların IC<sub>50</sub> değerlerinin birlikte 24 saat boyunca uygulanmasıyla MCF-7 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütme ait görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütme ait görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)

### 4.3. Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları

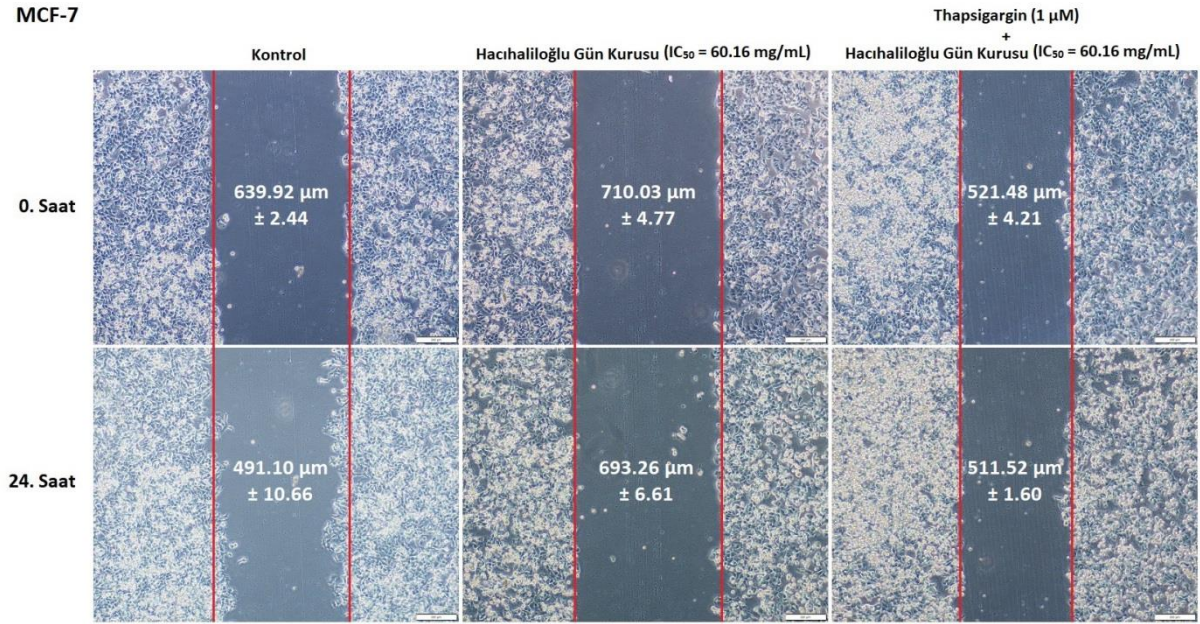
Tez çalışmamızın bu aşamasında, önceden belirlenen Hacihaliloğlu Gün Kuruğu, Hacihaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kuruğu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraktlarının IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerlerinin yanında endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak kullandığımız 1 µM Thapsigarginle muamele edilen MCF-7 hücrelerinin göç durumları yara iyileşme testi (Wound Healing Assay) yapılarak belirlenmiştir. MCF-7 deney grupları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 : MCF-7 Deney Grupları.

No	Gruplar	Kayısı IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Thapsigargin (1 µM)
1	MCF-7 Kontrol	-	-
2	MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu	+	-
3	MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü	+	-
4	MCF-7 + Kabaası Gün Kuruğu	+	-
5	MCF-7 + Kabaası Kükürtlü	+	-
6	MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu	+	+
7	MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü	+	+
8	MCF-7 + Kabaası Gün Kuruğu	+	+
9	MCF-7 + Kabaası Kükürtlü	+	+

Çalışmamızda hücre göçü testi, MTT test sonuçlarımızdan elde edilen farklı kayısı çeşitlerinin 24 saatlik IC<sub>50</sub> değerlerine ait konsantrasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerle 24 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin, başlangıçta açılan yarıklarının durumu (kapanıp - kapanmadıkları) 0. ve 24. saatlerde invert mikroskopla incelenerek fotoğrafları çekilmiş ve ImageJ programı kullanılarak analizleri yapılmıştır.

### 4.3.1. Hacihaliloğlu gün kurusu kayısı ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu

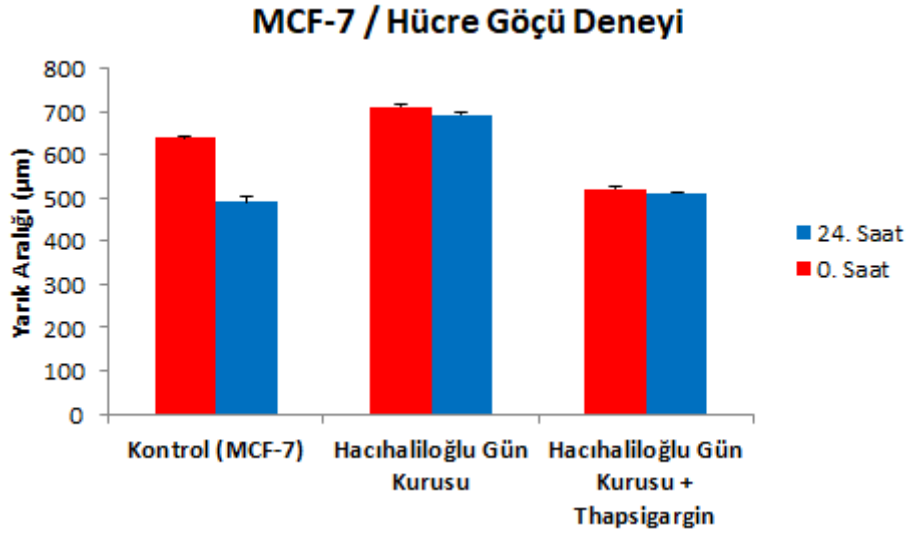


**Şekil 4.24 :** Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

Hacihaliloğlu Gün Kurusu metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri olan 60.16 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.24'te verilmiştir. MCF-7 hücreleri kayısı çeşitlerinden Hacihaliloğlu Gün Kurusu metanol ekstraktının 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri olan 60.16 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1 µM Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarı aralıklarına ait grafik Şekil 4.25'de verilmiştir.

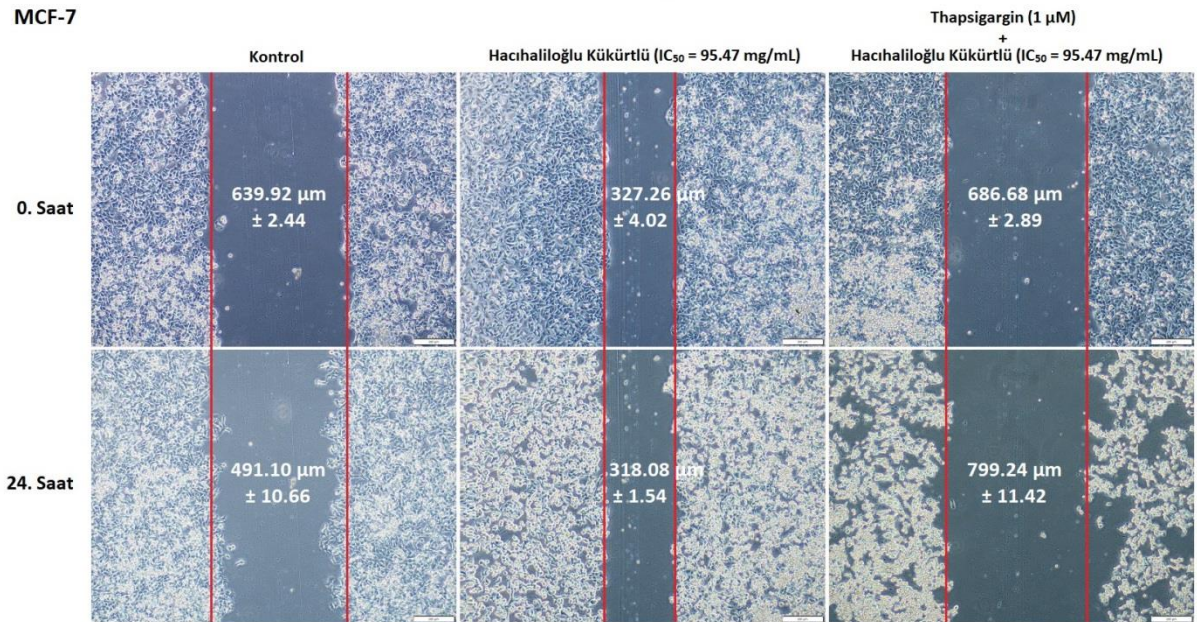
MCF-7 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarı aralığı 0. saatte 639.92 µm iken 24. saatte yarı aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 491.10 µm olarak ölçülmüştür. Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen hücrelerde ise yarı aralığı başlangıçta 710.03 µm iken 24. saat sonunda hücrelerin çoğalmasıyla yarı aralığı kapanarak 693.26 µm'ye ulaşmıştır. Ayrıca, 521.48 µm olan 0. saatteki yarı aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesiyle 511.52 µm'ye gerilemiştir. Kontrol grubunun yarı aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %23.26 azaldığı, 60.16 mg/mL konsantrasyona sahip Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7

hücrelerin yarık aralığının ise %2.36 kapandığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, 1  $\mu$ M Thapsigargin uygulanmış durumda ise hücre göçünde %1.91 azalma saptanmıştır.



**Şekil 4.25 :** Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.

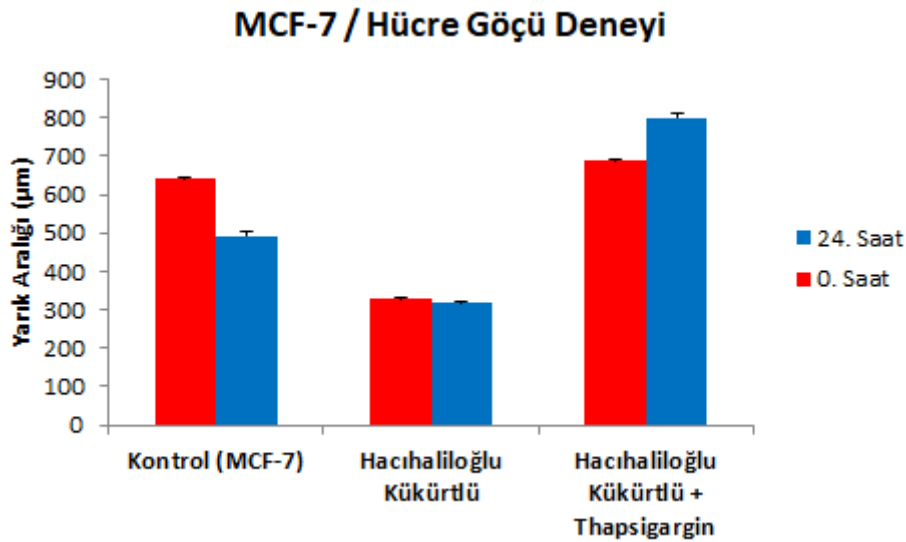
#### 4.3.2. Hacihaliloğlu kükürtlü kayısı ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu



**Şekil 4.26 :** Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

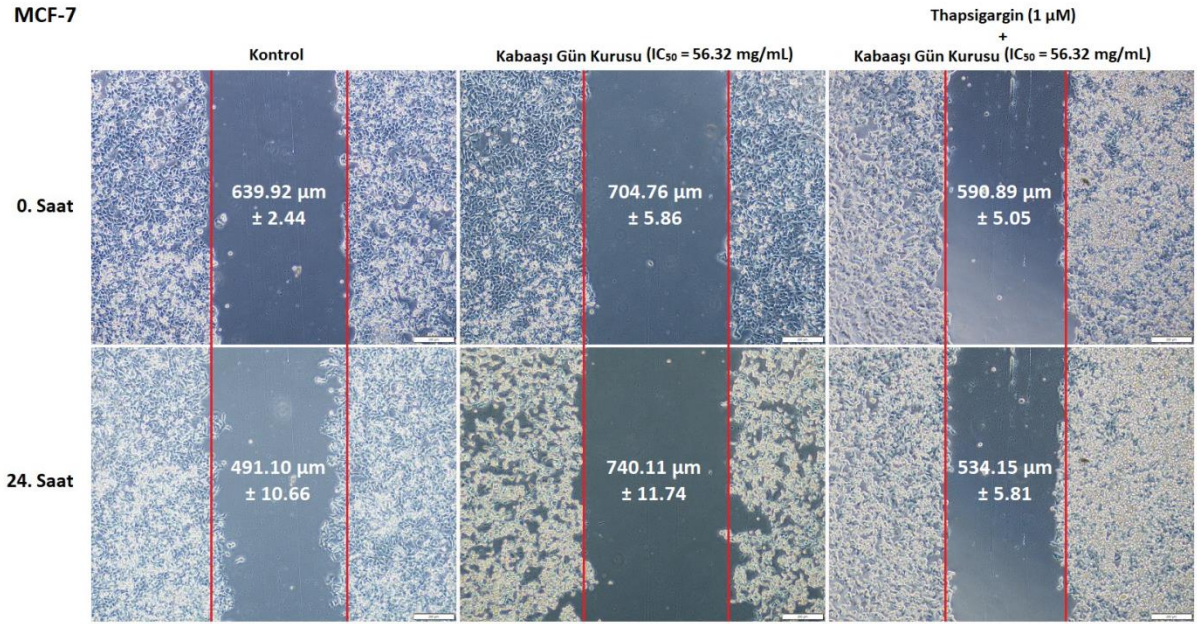
Hacıhaliloğlu Kükürtlü metanol ekstraktının  $IC_{50}$  değeri olan 95.47 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.26'da verilmiştir. MCF-7 hücreleri kayısı çeşitlerinden Hacıhaliloğlu Kükürtlü metanol ekstraktının 24 saatlik  $IC_{50}$  değeri olan 95.47 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1  $\mu$ M Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarı aralıklarına ait grafik Şekil 4.27'de verilmiştir.

MCF-7 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarı aralığı 0. saatte 639.92  $\mu$ m iken 24. saatte yarı aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 491.10  $\mu$ m olarak ölçülmüştür. Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen hücrelerde ise yarı aralığı başlangıçta 327.26  $\mu$ m iken 24. saat sonunda hücrelerin çoğalmasıyla yarı aralığı kapanarak 318.08  $\mu$ m'ye ulaşmıştır. Ayrıca, 686.68  $\mu$ m olan 0. saatteki yarı aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesiyle 799.24  $\mu$ m'ye tırmanmıştır. Kontrol grubunun yarı aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %23.26 azaldığı, 95.47 mg/mL konsantrasyona sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerin yarı aralığının ise %2.80 kapandığı tespit edilmiştir. Buna zıt olarak, 1  $\mu$ M Thapsigargin uygulanmış durumda ise yarı aralığında %16.39 artış saptanmıştır.



**Şekil 4.27 :** Kontrol grubu, sadece Hacıhaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarı aralığı grafiği.

### 4.3.3. Kabaşı gün kurusu kayısı ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu

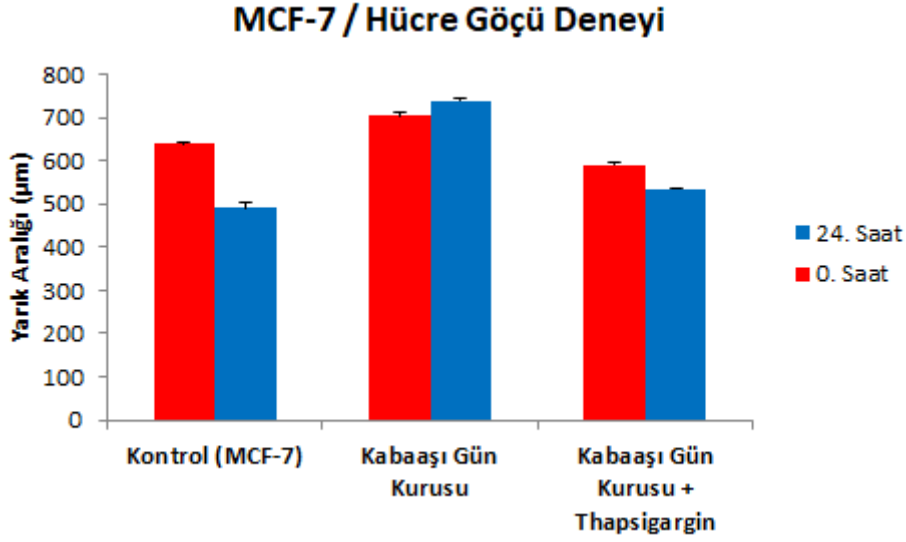


**Şekil 4.28 :** Kontrol grubu, sadece Kabaşı Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Kabaşı Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

Kabaşı Gün Kurusu metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri olan 56.32 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.28’de verilmiştir. MCF-7 hücreleri kayısı çeşitlerinden Kabaşı Gün Kurusu metanol ekstraktının 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri olan 56.32 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1 µM Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarı aralıklarına ait grafik Şekil 4.29’da verilmiştir.

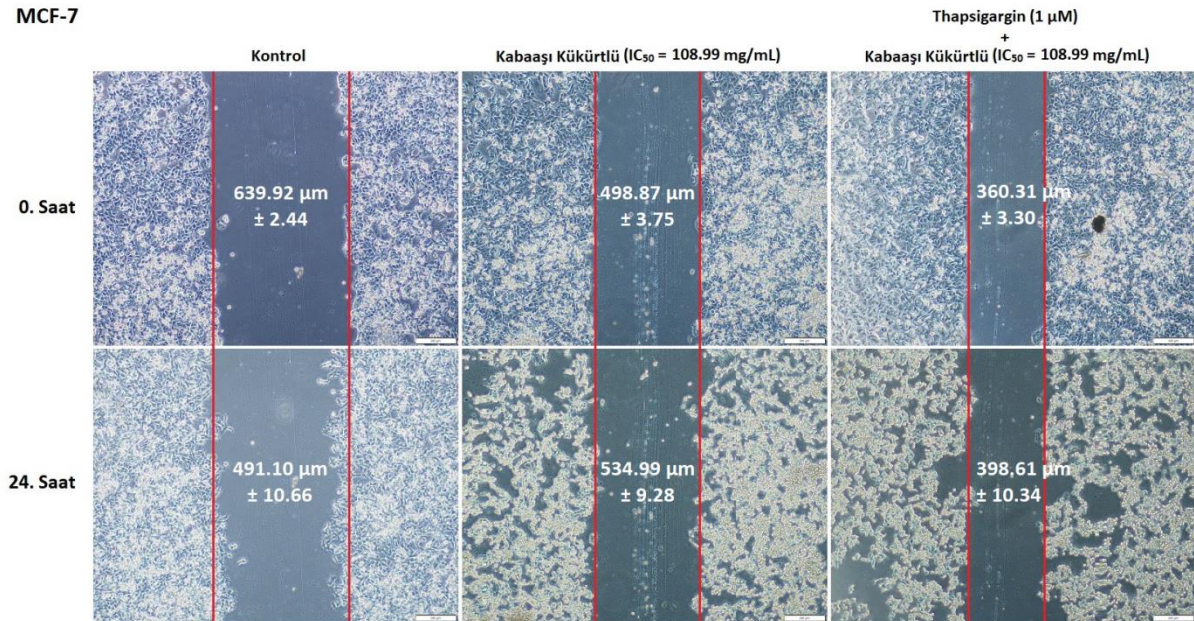
MCF-7 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarı aralığı 0. saatte 639.92 µm iken 24. saatte yarı aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 491.10 µm olarak ölçülmüştür. Kabaşı Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen hücrelerde ise yarı aralığı başlangıçta 704.76 µm iken 24. saat sonunda yarı aralığı açılarak 740.11 µm’ye ulaşmıştır. Ayrıca, 590.89 µm olan 0. saatteki yarı aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesiyle 534.15 µm’ye gerilemiştir. Kontrol grubunun yarı aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %23.26 azaldığı, 56.32 mg/mL konsantrasyona sahip Kabaşı Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerin yarı aralığının ise %5.02 açıldığı tespit edilmiştir.

Buna zıt olarak, 1  $\mu$ M Thapsigargin uygulanmış durumda ise yarık aralığında %9.60 kapanma saptanmıştır.



**Şekil 4.29 :** Kontrol grubu, sadece Kabaası Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.

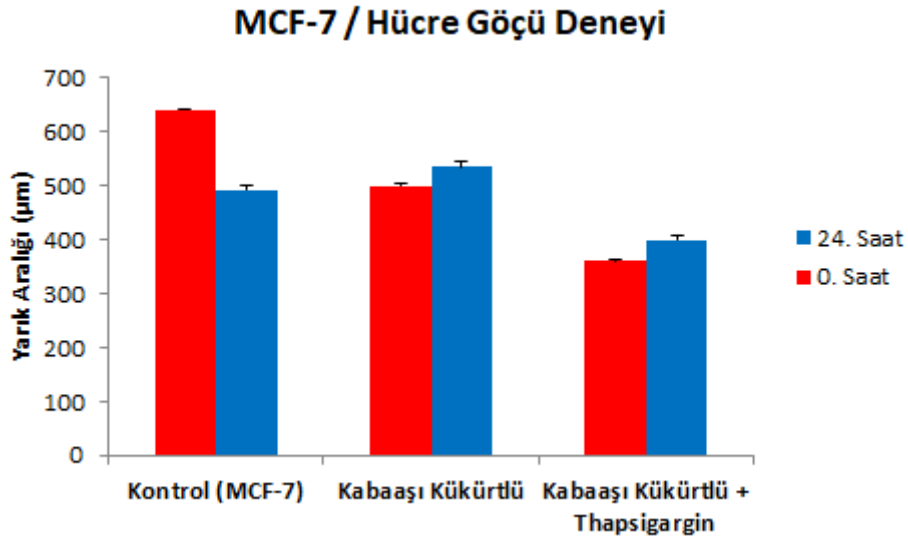
#### 4.3.4. Kabaası kükürtlü kayısı ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu



**Şekil 4.30 :** Kontrol grubu, sadece Kabaası Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

Kabaaşı Kükürtlü metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri olan 108.99 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.30'da verilmiştir. MCF-7 hücreleri kayısı çeşitlerinden Kabaaşı Kükürtlü metanol ekstraktının 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri olan 108.99 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1 µM Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarı aralıklarına ait grafik Şekil 4.31'de verilmiştir.

MCF-7 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarı aralığı 0. saatte 639.92 µm iken 24. saatte yarı aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 491.10 µm olarak ölçülmüştür. Kabaaşı Kükürtlü kayısı ile muamele edilen hücrelerde ise yarı aralığı başlangıçta 498.87 µm iken 24. saat sonunda yarı aralığı açılarak 534.99 µm'ye ulaşmıştır. Ayrıca, 360.31 µm olan 0. saatteki yarı aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesiyle 398.61 µm'ye çıkmıştır. Kontrol grubunun yarı aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %23.26 azaldığı, 108.99 mg/mL konsantrasyona sahip Kabaaşı Kükürtlü kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerin yarı aralığının ise %7.24 açıldığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, 1 µM Thapsigargin uygulanmış durumda ise yarı aralığında %10.63 genişleme saptanmıştır.

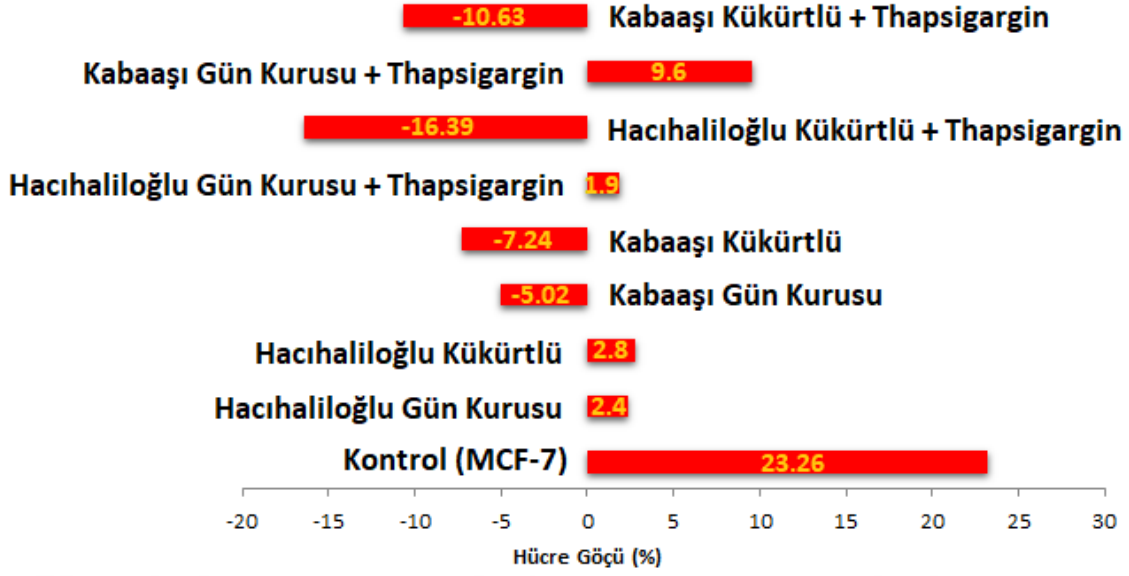


**Şekil 4.31 :** Kontrol grubu, sadece Kabaaşı Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaaşı Kükürtlü kayısı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarı aralığı grafiği.

Farklı kayısı metanol ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki yarık aralığı ve hücre göçü yüzdelerini gösteren hücre göçü deneyi sonuçlarına Çizelge 4.7’den ulaşılabilir. Ayrıca, kontrol grubu, farklı kayısı çeşitlerinin metanol ekstraktları ve Thapsigargin eklenmiş farklı kayısı çeşitleriyle muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre göçü yüzdesi grafiği Şekil 4.32’de görülmektedir.

**Çizelge 4.7 :** Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları.

Gruplar	Zaman (Saat)	Yarık Aralığı ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ Standart Sapma	Hücre Göçü (%)
Kontrol (MCF-7)	0	639.92 $\pm$ 2.44	0
Kontrol (MCF-7)	24	491.10 $\pm$ 10.66	23.26
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu	0	710.03 $\pm$ 4.77	0
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu	24	693.26 $\pm$ 6.61	2.36
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu + Thapsigargin	0	521.48 $\pm$ 4.21	0
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu + Thapsigargin	24	511.52 $\pm$ 1.60	1.91
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	0	327.26 $\pm$ 4.02	0
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	24	318.08 $\pm$ 1.54	2.80
Hacıhaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	0	686.68 $\pm$ 2.89	0
Hacıhaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	24	799.24 $\pm$ 11.42	-16.39
Kabaaşı Gün Kurusu	0	704.76 $\pm$ 5.86	0
Kabaaşı Gün Kurusu	24	740.11 $\pm$ 11.74	-5.02
Kabaaşı Gün Kurusu + Thapsigargin	0	590.89 $\pm$ 5.05	0
Kabaaşı Gün Kurusu + Thapsigargin	24	534.15 $\pm$ 5.81	9.60
Kabaaşı Kükürtlü	0	498.87 $\pm$ 3.75	0
Kabaaşı Kükürtlü	24	534.99 $\pm$ 9.28	-7.24
Kabaaşı Kükürtlü + Thapsigargin	0	360.31 $\pm$ 3.30	0
Kabaaşı Kükürtlü + Thapsigargin	24	398.61 $\pm$ 10.34	-10.63



Şekil 4.32 : Kontrol grubu, farklı kayısı çeşitleri ve Thapsigargin eklenmiş farklı kayısı çeşitleriyle muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre göçü yüzdesi grafiği.

#### 4.4. MCF-7 Hücrelerinin ELISA Sonuçları

MCF-7 hücrelerine ait ATF6, CHOP ve XBP1 proteinleri için One-Way ANOVA sonuçları Çizelge 4.8’de, ATF6 proteinine ait ELISA sonuçları Çizelge 4.9’da ve ELISA sonuçlarıyla ilgili grafik Şekil 4.33’te görülmektedir. Ayrıca, XBP1 proteinine ait ELISA sonuçları Çizelge 4.9’da ve ELISA sonuçlarıyla ilgili grafik Şekil 4.34’te görülmektedir.

Çizelge 4.8 : ATF6, CHOP ve XBP1 için One-Way ANOVA Sonuçları.

(MCF-7) ELISA	Serbestlik Derecesi	F	p (<0.05)	$\eta_p^2$
ATF6	8	359.089	0.000000	0.991
CHOP	8	-	-	-
XBP1	8	134.371	0.000000	0.975

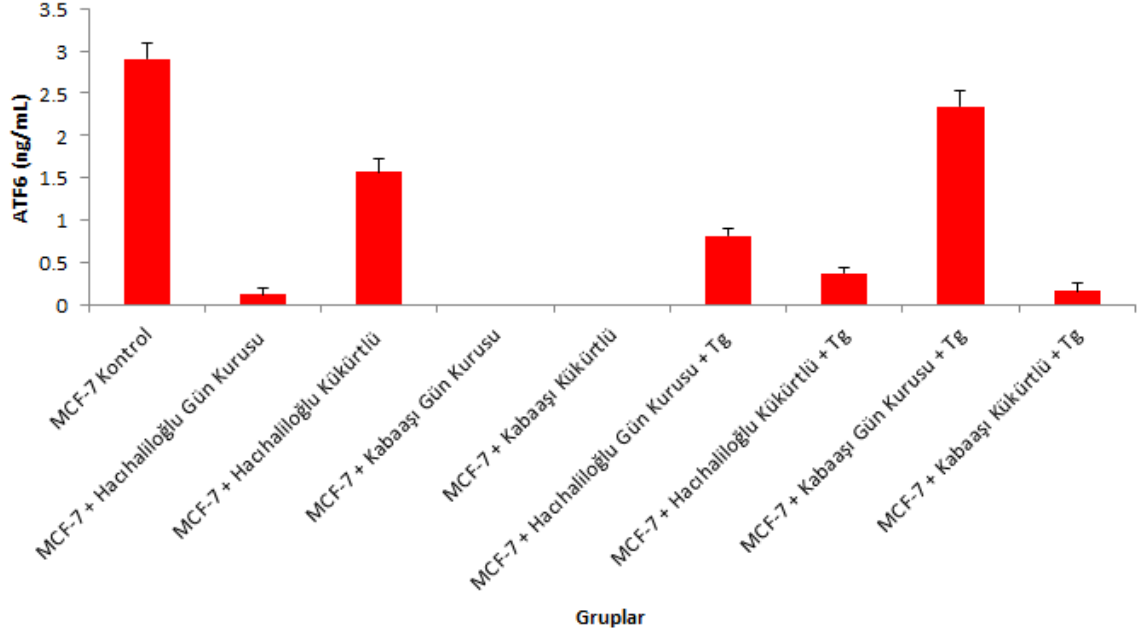
## **ATF6**

**Çizelge 4.9 : ATF6 ELISA Sonuçları.**

<b>Gruplar</b>	<b>Ortalama (ng/mL)</b>	<b>Standart Sapma</b>	<b>N</b>
MCF-7 Kontrol	2.902	0.192	4
MCF-7 + Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu	0.127	0.065	4
MCF-7 + Hacıhaliloğlu Kükürtlü	1.571	0.148	4
MCF-7 + Kabaası Gün Kuruğu	0.000	0.000	4
MCF-7 + Kabaası Kükürtlü	0.000	0.000	4
MCF-7 + Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu + Thapsigargin	0.823	0.090	4
MCF-7 + Hacıhaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	0.382	0.061	4
MCF-7 + Kabaası Gün Kuruğu + Thapsigargin	2.340	0.190	4
MCF-7 + Kabaası Kükürtlü + Thapsigargin	0.162	0.095	4

MCF-7 Kontrol grubunun ATF6 protein değeri diğer tüm grupların değerlerinden yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). MCF-7 + Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu grubu değerlerinin MCF-7 + Kabaası Gün Kuruğu, MCF-7 + Kabaası Kükürtlü ve MCF-7 + Kabaası Kükürtlü + Thapsigargin grupları haricindeki diğer gruplarla aralarında ATF6 miktarları bakımından anlamlı fark görülmüştür ( $p<0.05$ ). MCF-7 + Hacıhaliloğlu Kükürtlü grubu değerleri diğer gruplarla kıyaslandığında ATF6 miktarlarında anlamlı fark görülmüştür ( $p<0.05$ ). MCF-7 + Kabaası Kükürtlü + Thapsigargin grubu haricindeki diğer tüm grupların kendi aralarında ATF6 miktarları bakımından anlamlı fark görülmüştür ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.9, Şekil 4.33).

## MCF-7



Şekil 4.33 : MCF-7 hücrelerindeki ATF6 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği.

## CHOP

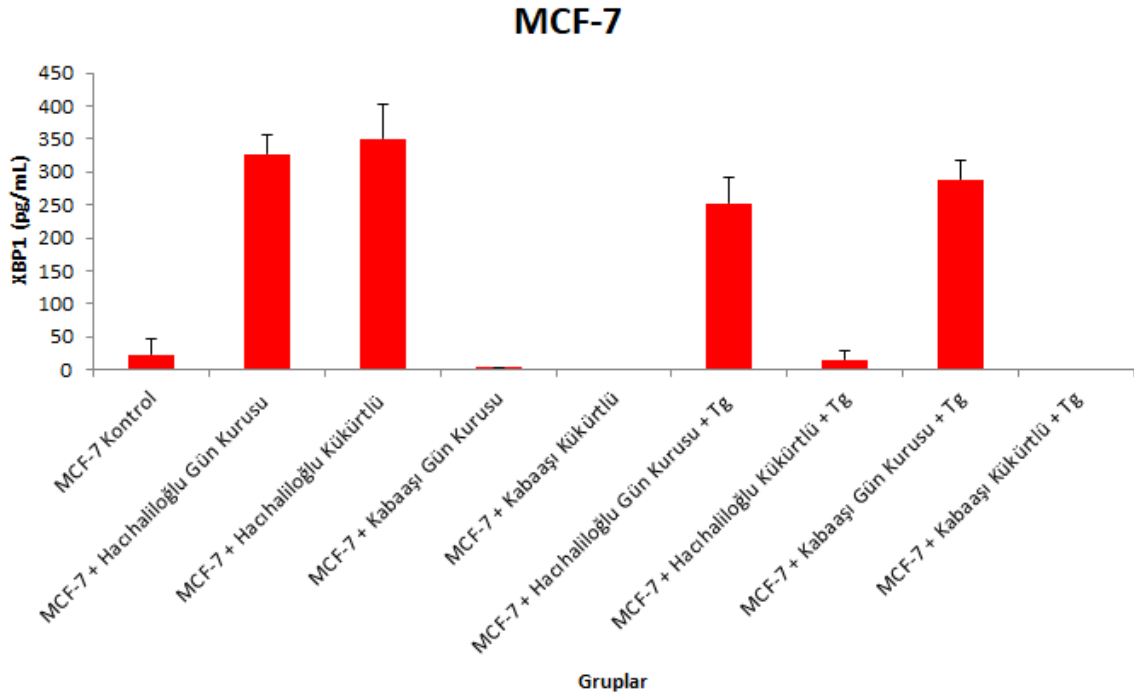
Hücre kültüründen elde edilen MCF-7 hücrelerinde CHOP proteinine rastlanmadığı için tabloda belirtilmemiştir.

## XBP1

Çizelge 4.10 : XBP1 ELISA Sonuçları.

Gruplar	Ortalama (pg/mL)	Standart Sapma	N
MCF-7 Kontrol	22.555	23.355	4
MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kurusu	326.740	30.388	4
MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü	350.073	52.806	4
MCF-7 + Kabaası Gün Kurusu	3.406	0.000	4
MCF-7 + Kabaası Kükürtlü	0.000	0.000	4
MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kurusu + Thapsigargin	252.296	39.042	4
MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	14.518	13.818	4
MCF-7 + Kabaası Gün Kurusu + Thapsigargin	288.962	27.666	4
MCF-7 + Kabaası Kükürtlü + Thapsigargin	0.000	0.000	4

MCF-7 + Kontrol grubu; MCF-7 + Kabaası Gün Kuruşu, MCF-7 + Kabaası Kükürtlü, MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin ve MCF-7 + Kabaası Kükürtlü + Thapsigargin grupları haricindeki diğer gruplarla XBP1 protein değerini aşıından anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0.05$ ). MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kuruşu grubunun, MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü ve MCF-7 + Kabaası Gün Kuruşu + Thapsigargin grupları arasında anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ). MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü grubu, MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kuruşu haricindeki diğer tüm gruplardan yüksektir ( $p < 0.05$ ). MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kuruşu + Thapsigargin grubuyla, MCF-7 + Kabaası Gün Kuruşu + Thapsigargin grubu haricindeki diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında XBP1 aşıından anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4.10, Şekil 4.34).



Şekil 4.34 : MCF-7 hücrelerindeki XBP1 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği.

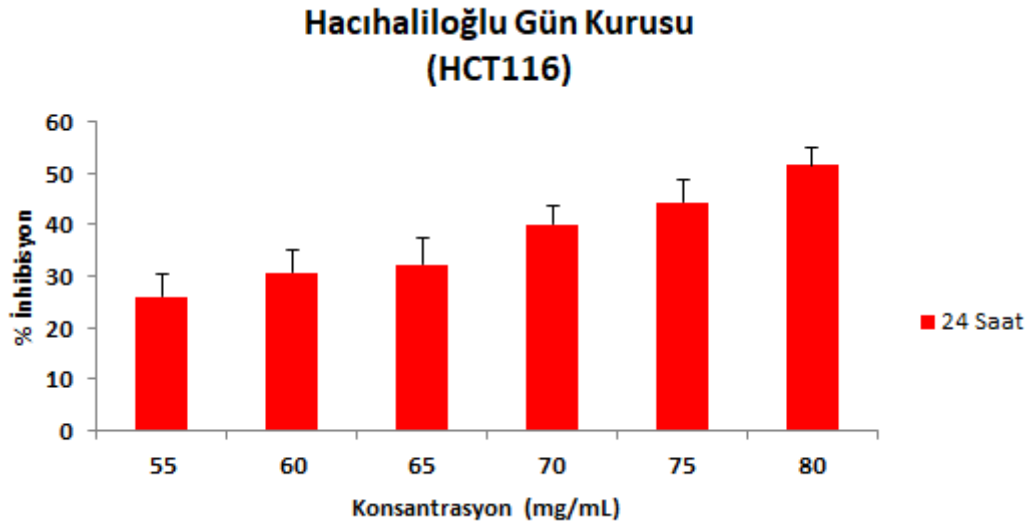
#### 4.5. HCT116 Hücrelerinin MTT Testi Sonuçları

Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kuruğu ve Kabaası Kükürtlü olmak üzere dört farklı kayısı çeşidine ait metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyona sahip çözeltileri HCT116 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiş ve spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbanslar ile HCT116 hücrelerine ait % canlılık ve inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Hücre proliferasyonunda meydana gelen değişiklikler MTT testi ile belirlenmiştir.

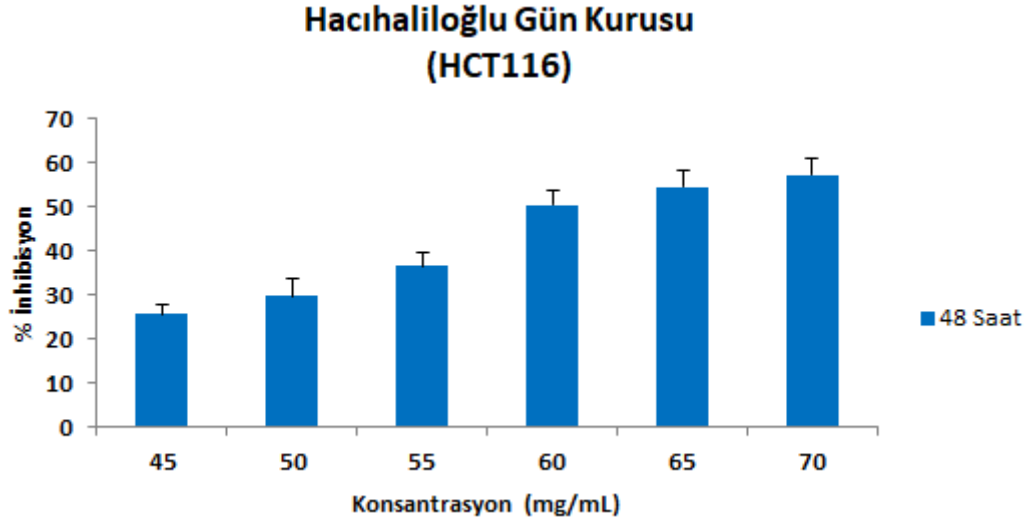
#### 4.5.1. Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktlar ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin MTT testi sonuçları

##### 4.5.1.1. Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

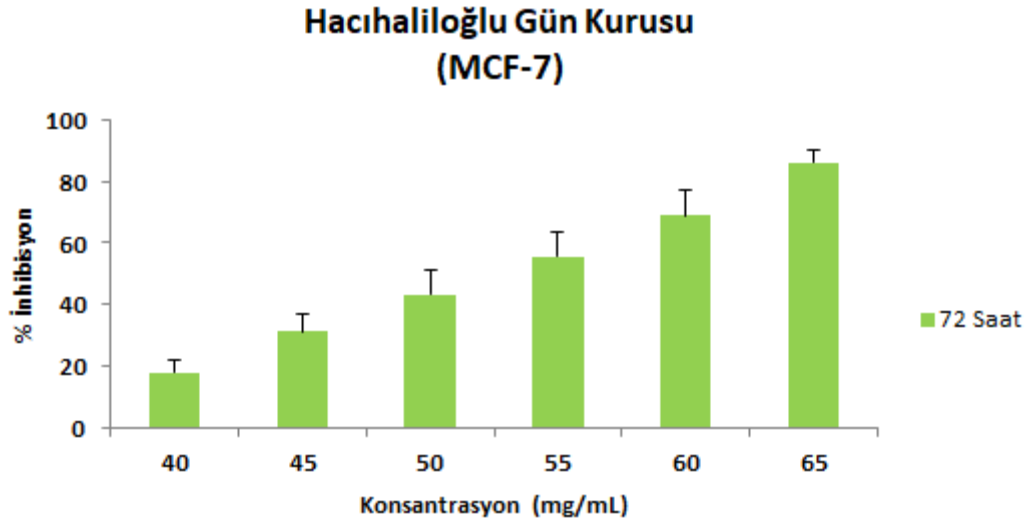
Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.35, 4.36 ve 4.37’de verilmiştir.



**Şekil 4.35 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.36 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.37 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

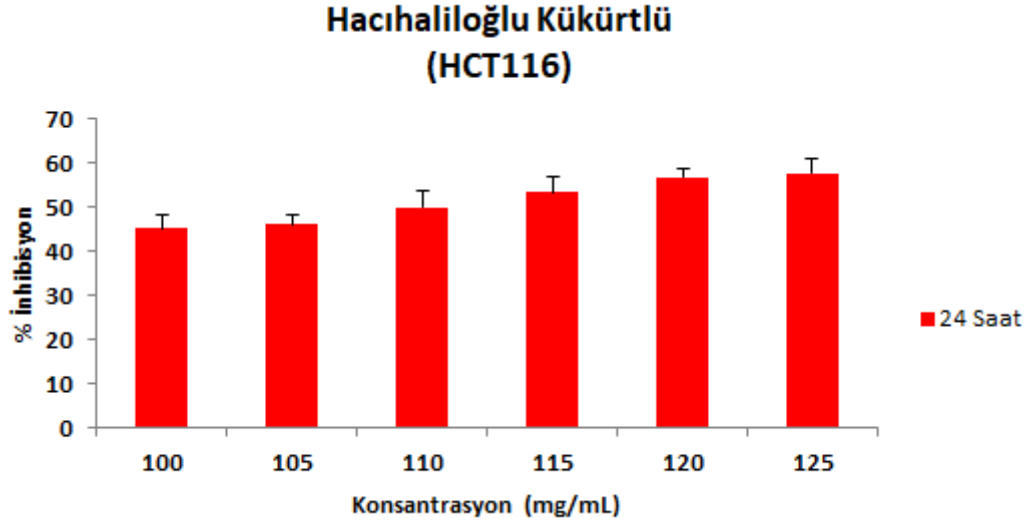
**Çizelge 4.11 :** Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

Metanol Ekstraktı	HCT116 (15,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri					
		Kons.	55	60	65	70	75
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu	<b>24 Saat</b>	73.96 $\pm$ 4.34	69.46 $\pm$ 4.31	67.79 $\pm$ 5.15	60.05 $\pm$ 3.64	55.70 $\pm$ 4.53	48.48 $\pm$ 3.29
	<b>48 Saat</b>	74.45 $\pm$ 2.10	70.52 $\pm$ 3.94	63.59 $\pm$ 3.06	49.70 $\pm$ 3.37	45.62 $\pm$ 3.64	42.97 $\pm$ 3.63
	<b>72 Saat</b>	82.19 $\pm$ 4.15	68.82 $\pm$ 5.87	56.67 $\pm$ 7.55	44.29 $\pm$ 8.08	31.03 $\pm$ 8.39	13.95 $\pm$ 4.39
	<b>Kons.</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>
	<b>Kons.</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>
	<b>Kons.</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>

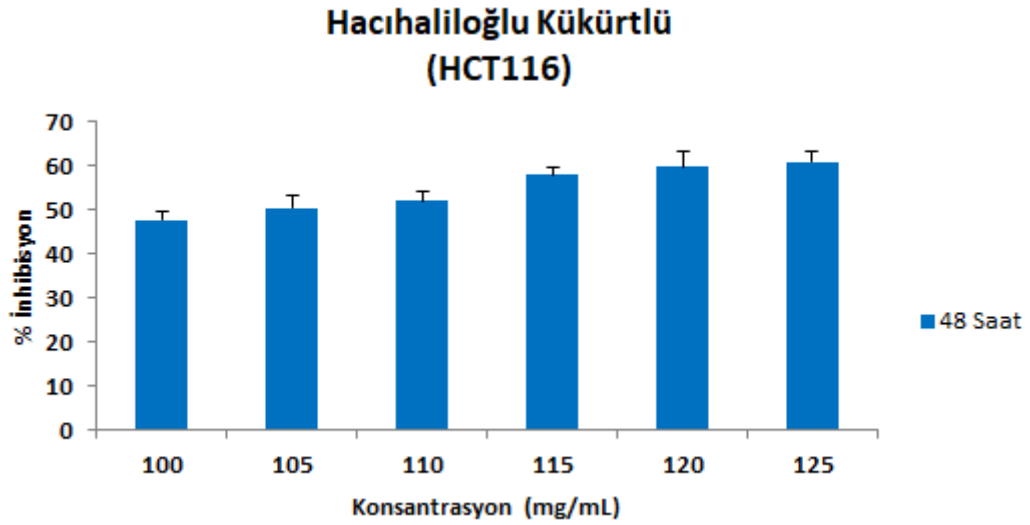
Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca HCT116 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.11’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısı ekstraktları arasında HCT116 hücrelerinde 24 saat sonunda %73.96 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 55 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 48 saat sonundaki en yüksek hücre canlılığı %74.45’lik oranla 45 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. Son olarak, 72 saat sonundaki en yüksek hücre canlılık değeri ise %82.19’luk oranla 40 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

#### 4.5.1.2. Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.38, 4.39 ve 4.40’ta verilmiştir.

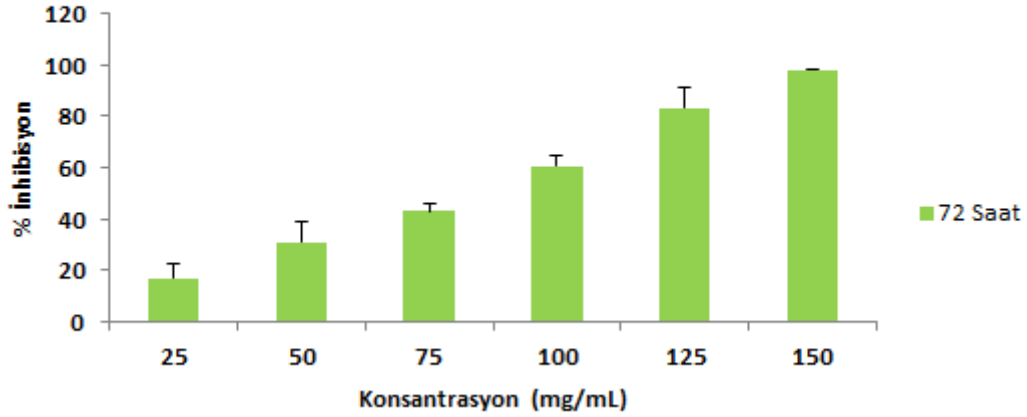


**Şekil 4.38** : Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



**Şekil 4.39** : Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

### Hacıhaliloğlu Kükürtlü (HCT116)



**Şekil 4.40 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

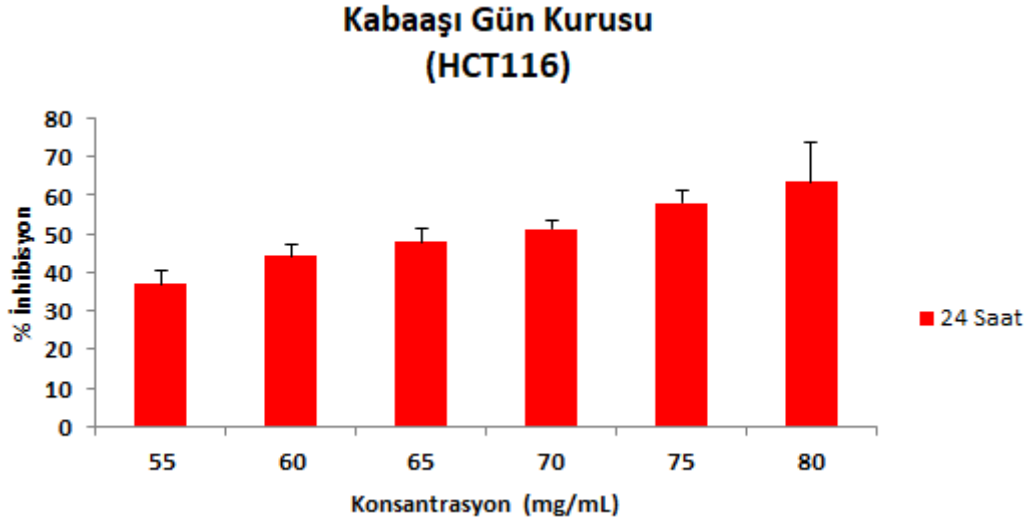
**Çizelge 4.12 :** Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

Metanol Ekstraktı	HCT116 (15,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri					
		Kons.	100	105	110	115	120
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	<b>24 Saat</b>	54.98 $\pm$ 2.93	54.15 $\pm$ 2.08	50.23 $\pm$ 3.59	46.68 $\pm$ 3.49	43.36 $\pm$ 2.07	42.50 $\pm$ 3.26
	<b>48 Saat</b>	52.55 $\pm$ 1.98	49.65 $\pm$ 2.87	48.06 $\pm$ 1.95	42.32 $\pm$ 1.75	40.37 $\pm$ 3.30	39.37 $\pm$ 2.34
	<b>Kons.</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>
	<b>72 Saat</b>	83.28 $\pm$ 5.78	69.17 $\pm$ 8.21	57.14 $\pm$ 3.34	39.68 $\pm$ 4.11	16.95 $\pm$ 7.69	2.22 $\pm$ 0.50

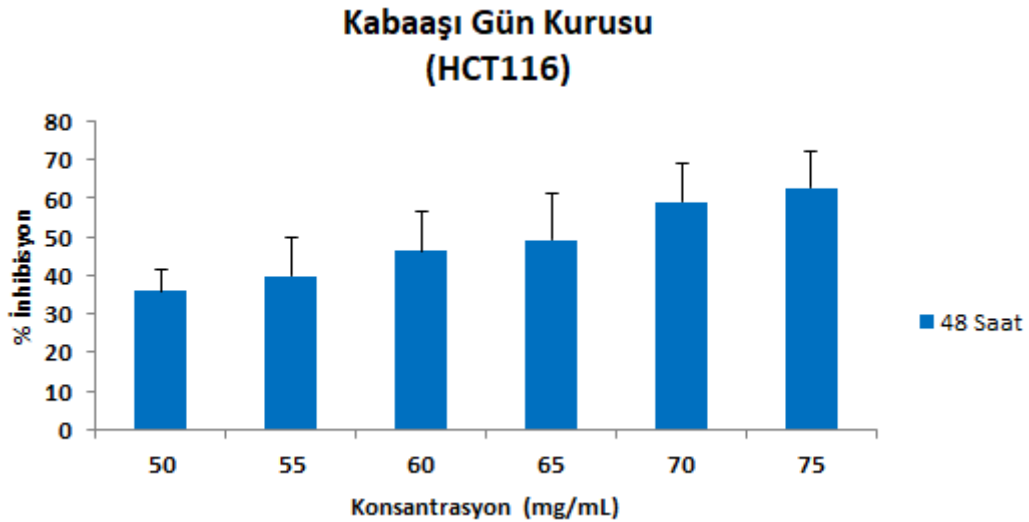
Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca HCT116 hücre hattı üzerine uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.12’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı ekstraktları arasında HCT116 hücrelerinde 24 ve 48 saatler sonundaki en yüksek hücre canlılık değerleri sırasıyla %54.98 ve %52.55’lik oranlarla 100 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 72 saat sonunda %83.28 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 25 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

#### 4.5.1.3. Kabaşı Gün Kuru kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

Kabaşı Gün Kuru kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.41, 4.42 ve 4.43'te verilmiştir.

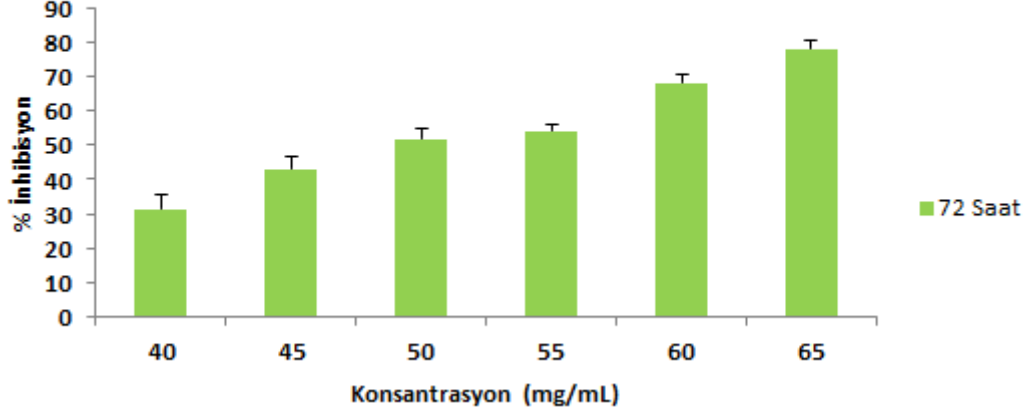


Şekil 4.41 : Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaşı Gün Kuru kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



Şekil 4.42 : Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaşı Gün Kuru kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

### Kabaşı Gün Kuru (HCT116)



**Şekil 4.43 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaşı Gün Kuru kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

**Çizelge 4.13 :** Kabaşı Gün Kuru kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

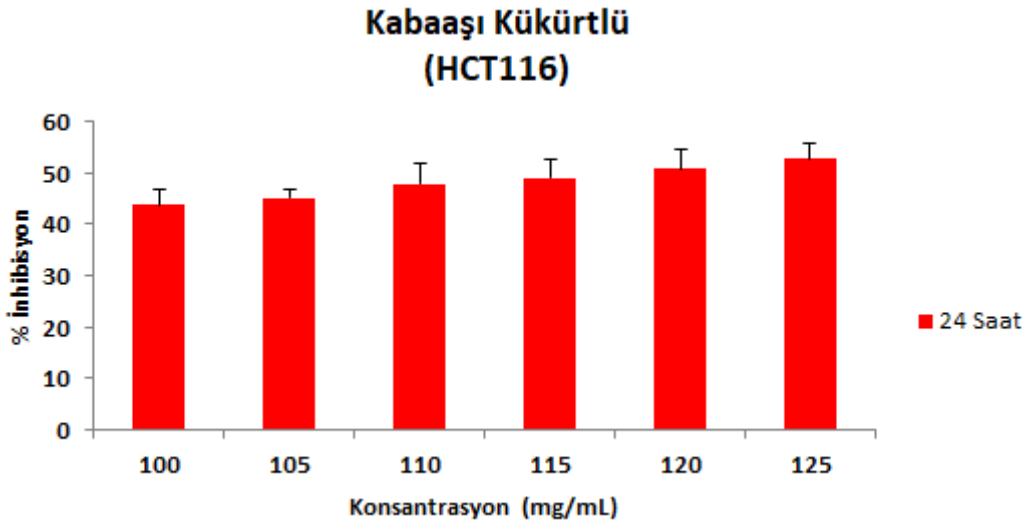
Metanol Ekstraktı	HCT116 (15,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri					
		Kons.	55	60	65	70	75
Kabaşı Gün Kuru	<b>24 Saat</b>	63.07 $\pm$ 3.60	55.87 $\pm$ 2.96	52.10 $\pm$ 3.69	48.77 $\pm$ 1.97	42.13 $\pm$ 3.16	36.47 $\pm$ 9.95
	<b>48 Saat</b>	64.09 $\pm$ 5.51	60.17 $\pm$ 9.87	53.73 $\pm$ 10.27	50.97 $\pm$ 12.07	40.88 $\pm$ 9.94	37.25 $\pm$ 9.51
	<b>72 Saat</b>	68.78 $\pm$ 4.48	57.13 $\pm$ 3.54	48.13 $\pm$ 3.17	45.91 $\pm$ 2.09	31.73 $\pm$ 2.54	21.81 $\pm$ 2.28
	<b>24 Saat</b>	63.07 $\pm$ 3.60	55.87 $\pm$ 2.96	52.10 $\pm$ 3.69	48.77 $\pm$ 1.97	42.13 $\pm$ 3.16	36.47 $\pm$ 9.95
	<b>48 Saat</b>	64.09 $\pm$ 5.51	60.17 $\pm$ 9.87	53.73 $\pm$ 10.27	50.97 $\pm$ 12.07	40.88 $\pm$ 9.94	37.25 $\pm$ 9.51
	<b>72 Saat</b>	68.78 $\pm$ 4.48	57.13 $\pm$ 3.54	48.13 $\pm$ 3.17	45.91 $\pm$ 2.09	31.73 $\pm$ 2.54	21.81 $\pm$ 2.28

Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca HCT116 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.13'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kabaşı Gün Kuru kayısı ekstraktları arasında HCT116 hücrelerinde 24 saat sonunda %63.07 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 55 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 48 saat sonundaki en yüksek hücre canlılığı %64.09'luk oranla 50 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. Son

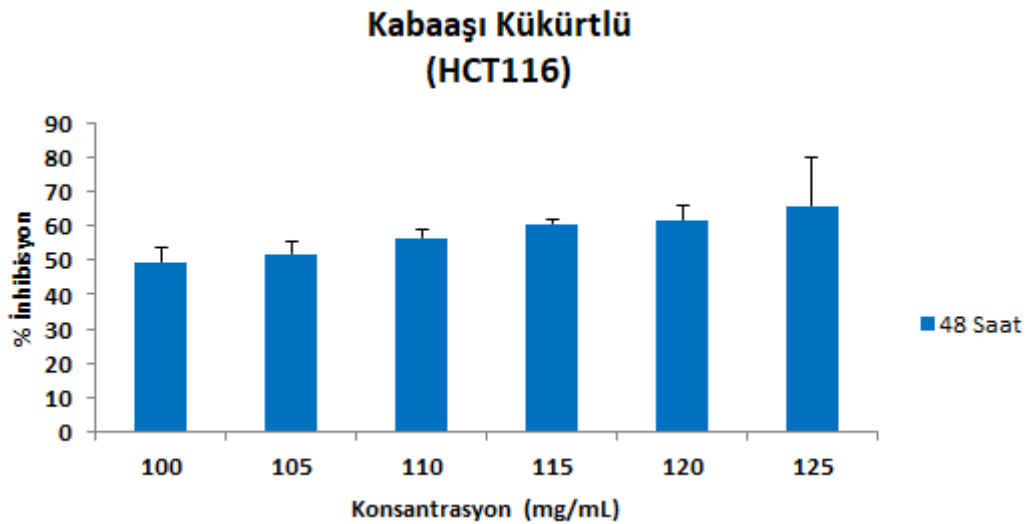
olarak, 72 saat sonundaki en yüksek hücre canlılık değeri ise %68.78'lik oranla 40 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

#### 4.5.1.4. Kabaası Kükürtlü kayısı ekstraktlarının MTT testi sonuçları

Kabaası Kükürtlü kayısının metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerine ait % inhibisyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.44, 4.45 ve 4.46'da verilmiştir.

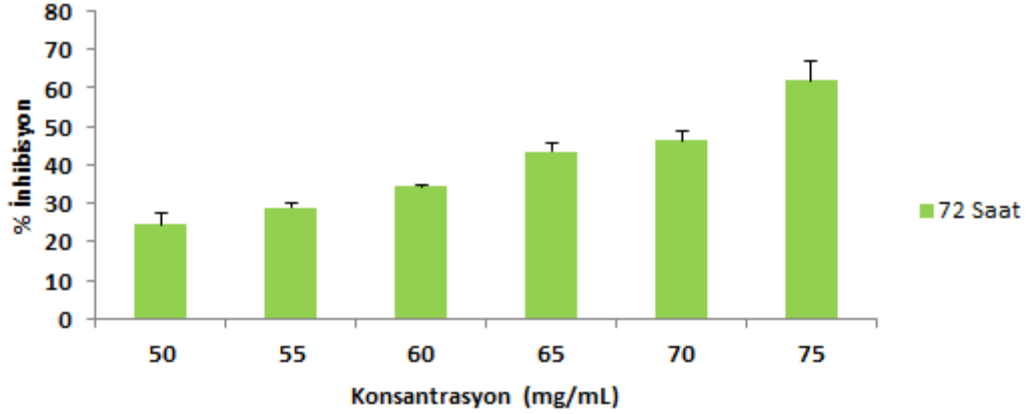


Şekil 4.44 : Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 24 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.



Şekil 4.45 : Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 48 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

### Kabaası Kükürtlü (HCT116)



**Şekil 4.46 :** Farklı konsantrasyonlara sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 72 saat sonunda HCT116 hücrelerinin proliferasyonunda meydana getirdiği % inhibisyon değerleri grafiği.

**Çizelge 4.14 :** Kabaası Kükürtlü kayısının metanol ekstraktının HCT116 hücreleri üzerindeki % Canlılık  $\pm$  Standart Sapma değerleri.

Metanol Ekstraktı	HCT116 (15,000 Hücre)	Uygulama Grupları (mg/mL) ve % Canlılık $\pm$ Standart Sapma Değerleri					
		Kons.	100	105	110	115	120
Kabaası Kükürtlü	<b>24 Saat</b>	56.29 $\pm$ 2.86	55.03 $\pm$ 1.80	52.29 $\pm$ 3.89	51.15 $\pm$ 3.79	49.24 $\pm$ 3.60	47.40 $\pm$ 3.08
	<b>48 Saat</b>	50.48 $\pm$ 4.31	48.18 $\pm$ 3.47	43.68 $\pm$ 2.55	39.52 $\pm$ 1.65	38.37 $\pm$ 4.13	34.27 $\pm$ 14.24
	<b>Kons.</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>	<b>75</b>
	<b>72 Saat</b>	75.64 $\pm$ 3.32	71.21 $\pm$ 1.47	65.54 $\pm$ 0.26	56.53 $\pm$ 1.98	53.63 $\pm$ 2.40	38.03 $\pm$ 5.10

Metanol ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saat süre boyunca HCT116 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.14'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kabaası Kükürtlü kayısı ekstraktları arasında HCT116 hücrelerinde 24 ve 48 saatler sonundaki en yüksek hücre canlılık değerleri sırasıyla %56.29 ve %50.48'lik oranlarla 100 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir. 72 saat sonunda %75.64 değeri ile en yüksek hücre canlılığı 50 mg/mL konsantrasyona sahip olan metanol ekstraktına aittir.

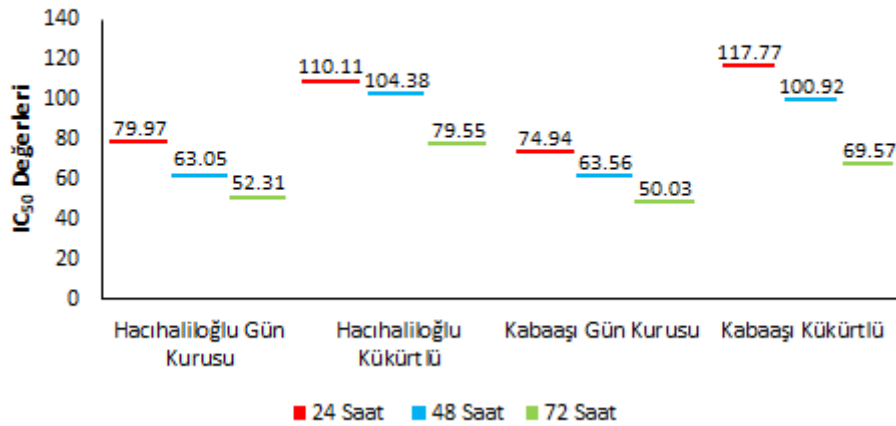
#### 4.5.2 Farklı kayısı çeşitlerine ait ekstraktların HCT116 hücrelerindeki IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi

Hacıhaliloğlu Gün Kuruşu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kuruşu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin Çizelge 4.15'teki IC<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında Kabaası Gün Kuruşu kayısı metanol ekstraktı 24 saat sonunda 74.94 mg/mL ve 72 saat sonunda 50.03 mg/mL olmak üzere en iyi IC<sub>50</sub> değerlerine sahip olmuştur. Ayrıca, 48 saat sonunda 63.05 mg/mL değeriyle Hacıhaliloğlu Gün Kuruşu en iyi IC<sub>50</sub> değerine sahiptir.

Çizelge 4.15 : Kayısı çeşitlerinin HCT116 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri.

HCT116 (15,000 Hücre)	Metanol Ekstraktlı Uygulama Gruplarının IC <sub>50</sub> Değerleri (mg/mL)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Hacıhaliloğlu Gün Kuruşu	79.97	63.05	52.31
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	110.11	104.38	79.55
Kabaası Gün Kuruşu	74.94	63.56	50.03
Kabaası Kükürtlü	117.77	100.92	69.57

Farklı Kayısı Türlerinin HCT116 Hücre Hattı Üzerindeki IC<sub>50</sub> Değerleri (mg/mL)

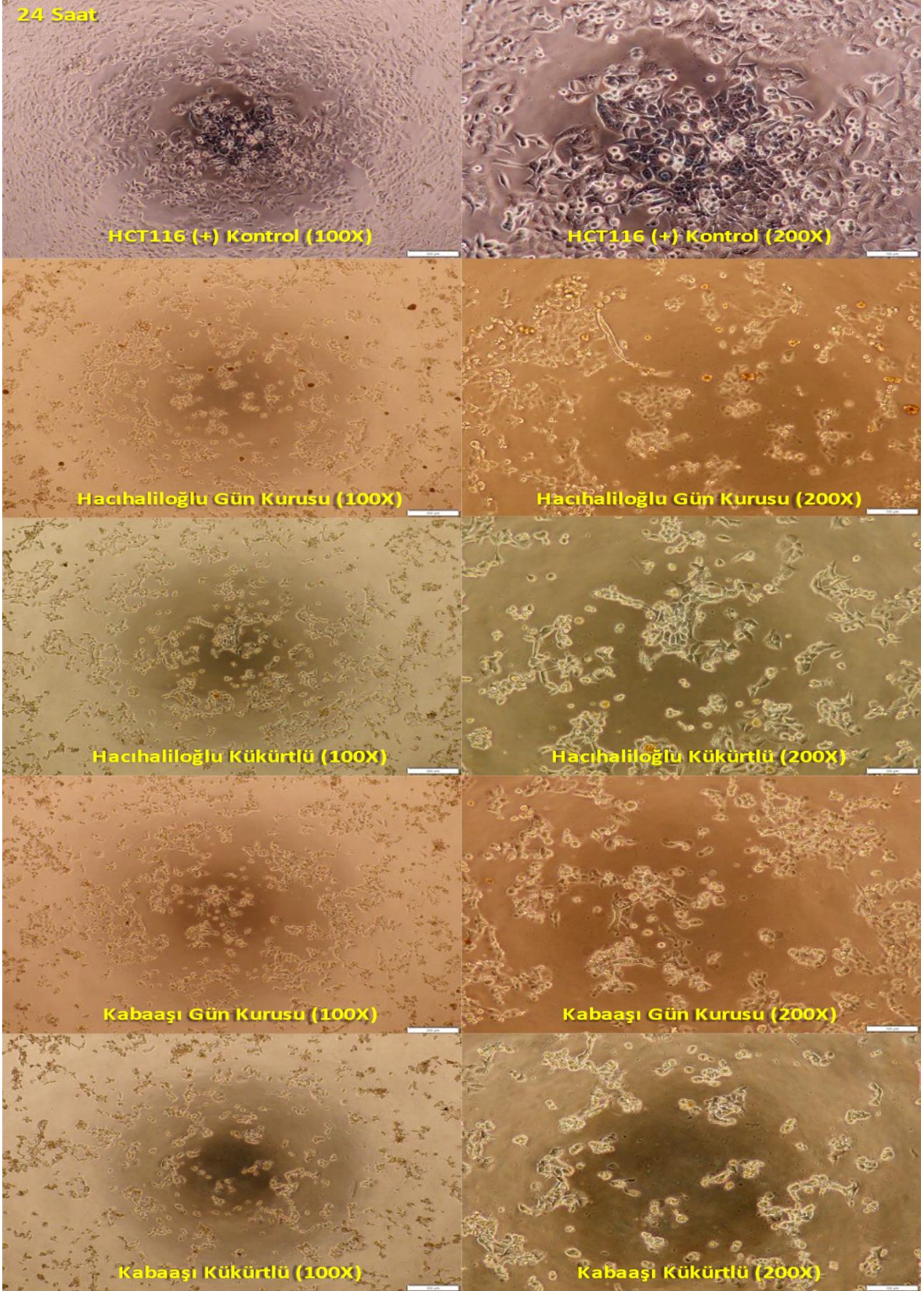


Şekil 4.47 : Farklı kayısı türlerinin HCT116 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri grafiği.

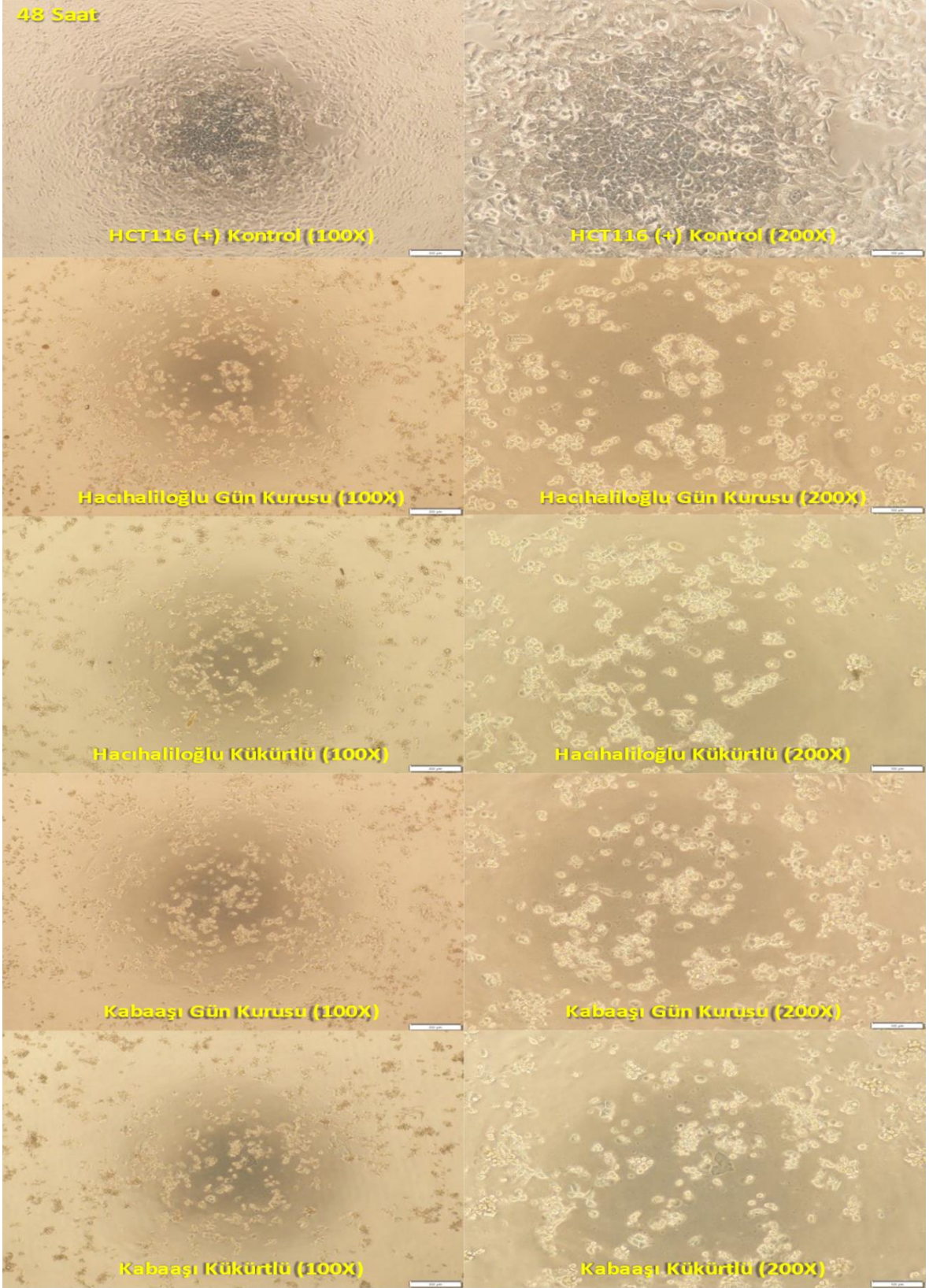
Farklı kayısı türlerinin HCT116 (insan kolon kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde elde edilen veriler ışığında IC<sub>50</sub> değerleri Şekil 4.47'den de anlaşılabilceği gibi, Hacıhaliloğlu Gün Kuruşu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kuruşu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraksiyonları sırasıyla 24 saat için 79.97, 110.11, 74.94 ve 117.77 mg/mL, 48 saat için 63.05, 104.38, 63.56 ve 100.92 mg/mL, 72 saat içinse

52.31, 79.55, 50.03 ve 69.57 mg/mL  $IC_{50}$  değerlerine sahiptir. Her iki kayısı türü için de kükürtlenmiş kayısıların gün kurusu kayıslara göre 24 saatin sonunda  $IC_{50}$  değerleri daha yüksektir.  $IC_{50}$  değerleri açısından dalgalanma kükürtlenmiş kayıslarda gün kurusu kayıslara göre fazladır. Gün kurusu kayıslarda ise antikanser özellik bakımından kükürtlenmiş kayıslara kıyasla zamanla çok büyük bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca,  $IC_{50}$  değerleri açısından 24, 48 ve 72 saatlik HCT116 hücre görüntülerine Şekil 4.48, Şekil 4.49 ve Şekil 4.50'den ulaşılabilir.

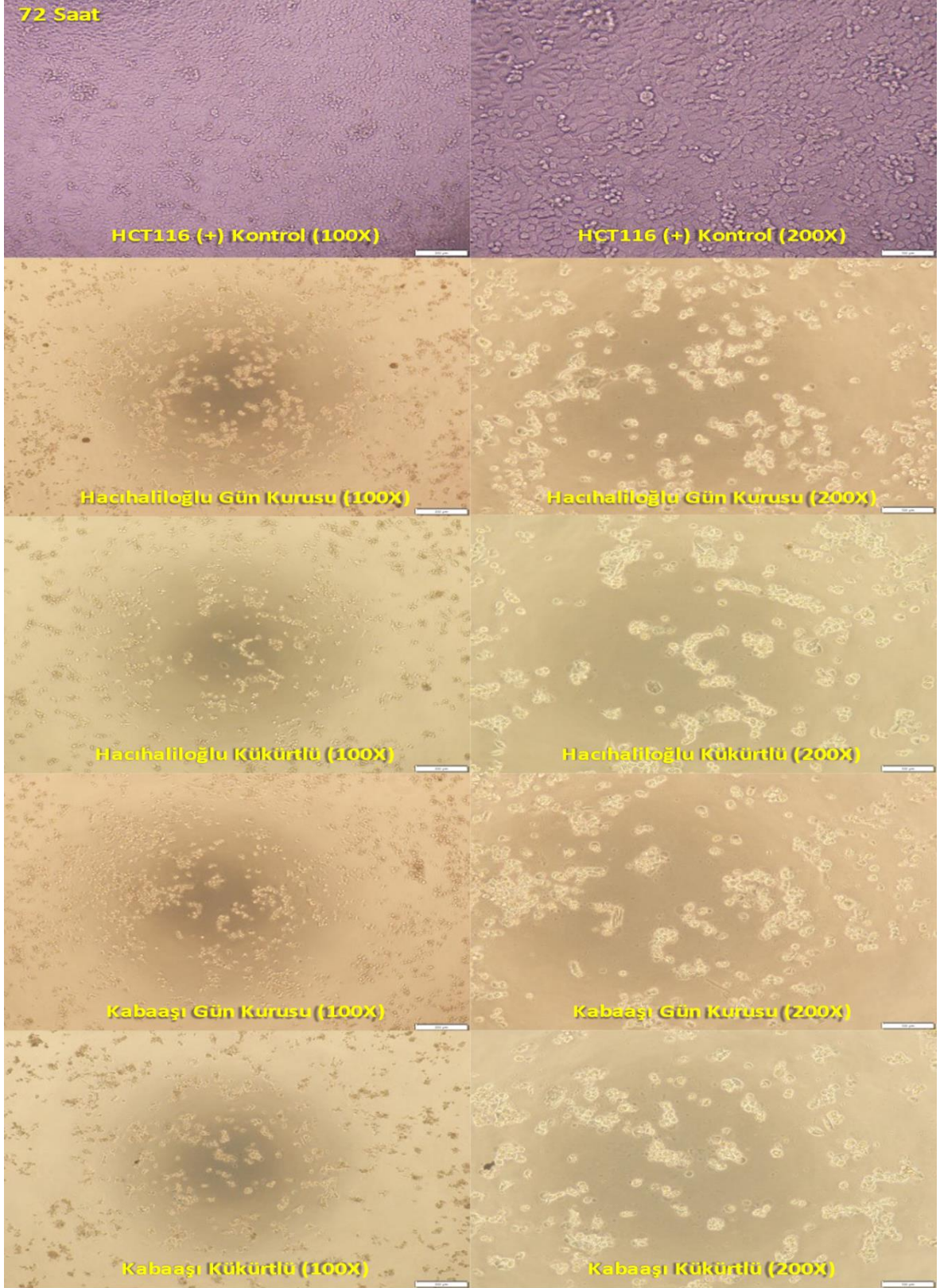




**Şekil 4.48 :** Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)



**Şekil 4.49** : Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütme ait görüntülerdeki bar 200  $\mu$ m, 200X büyütme ait görüntülerdeki bar 100  $\mu$ m'dir.)

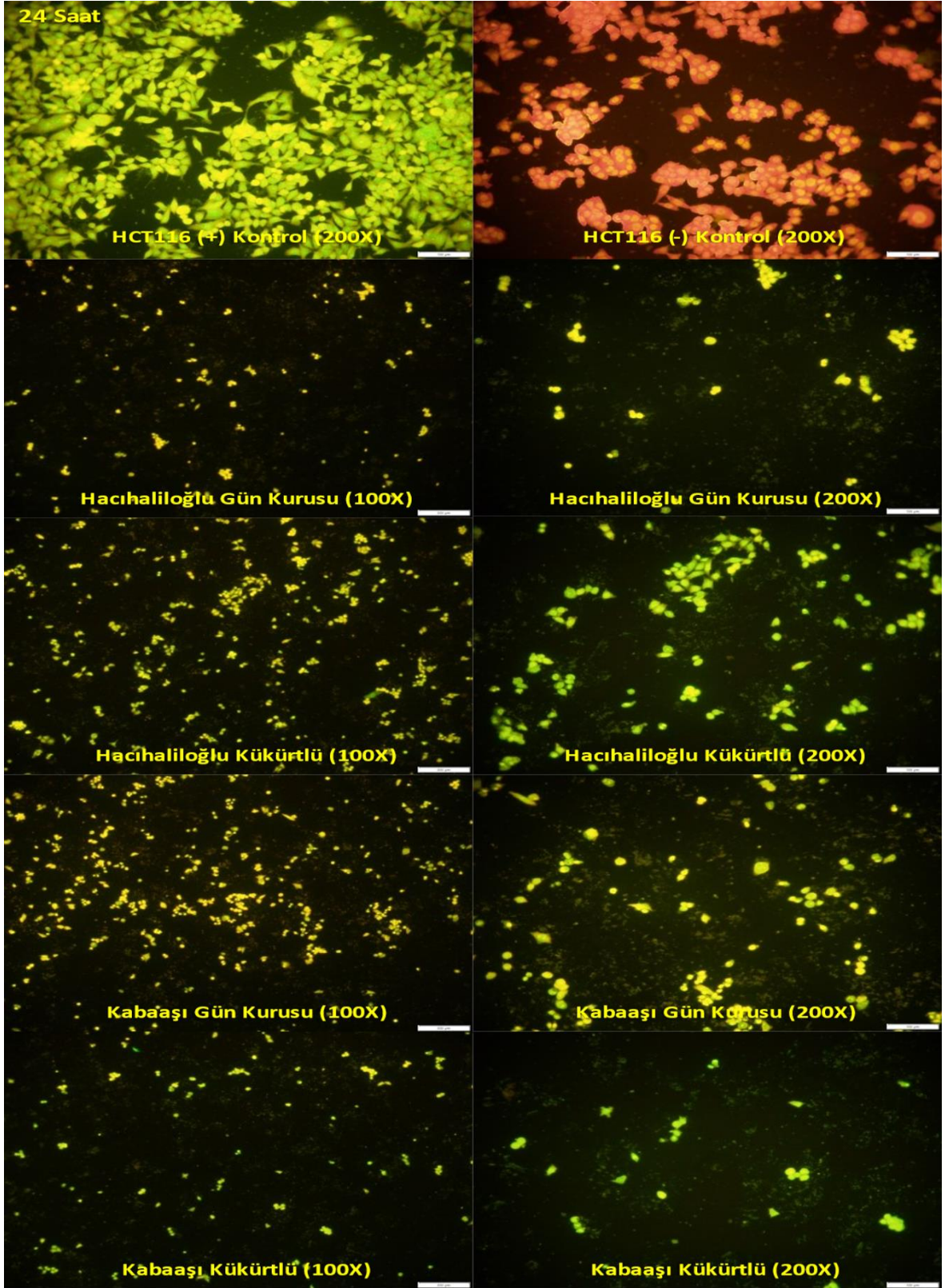


**Şekil 4.50 :** Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)

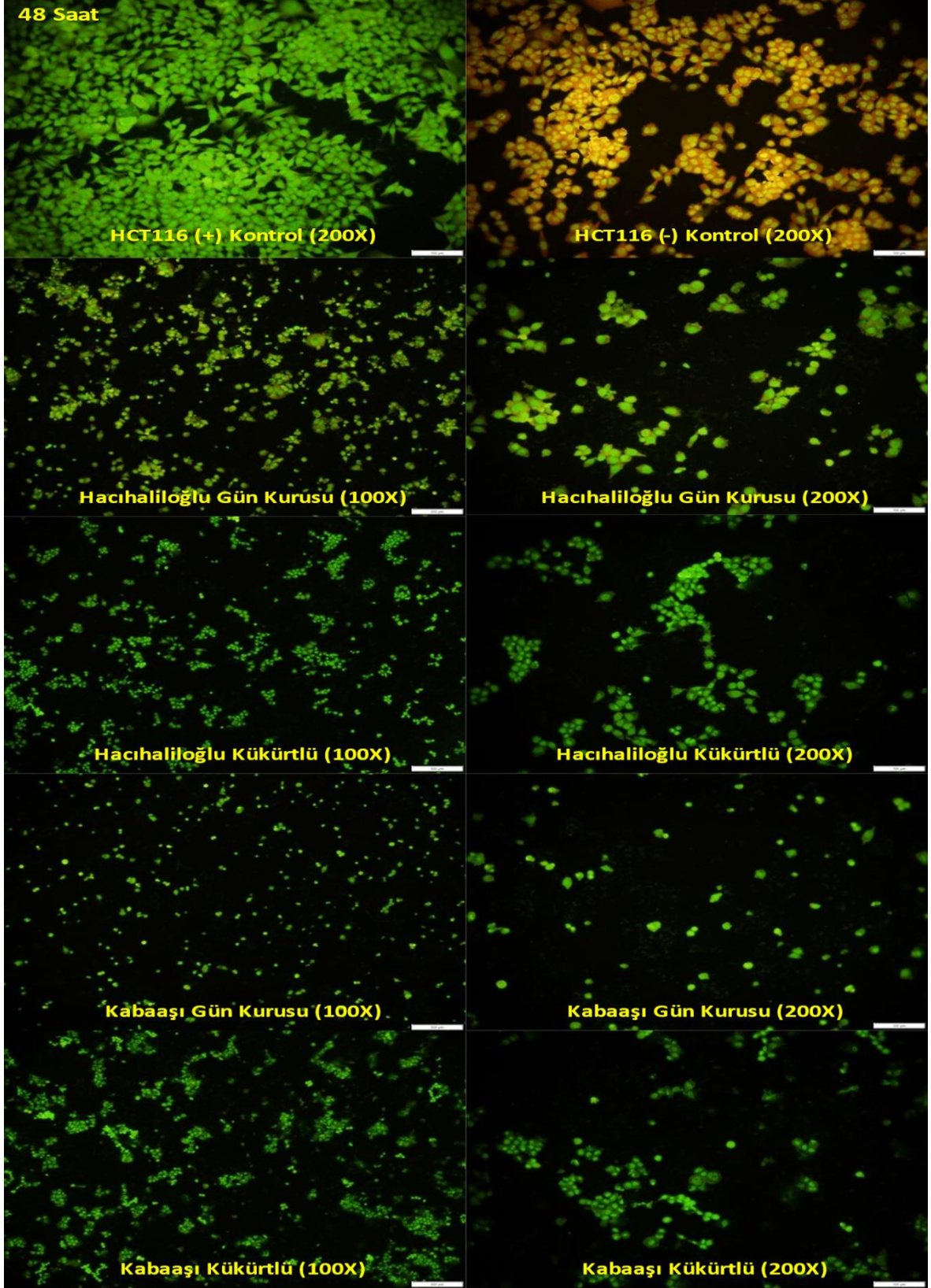
#### 4.6. HCT116 Hücrelerinin AT/EB Boyama Sonuçları

Hacıhaliloğlu Gün Kuruşu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kuruşu ve Kabaası Kükürtlü çeşitlerinin metanol ekstraktlarına ait IC<sub>50</sub> değeriyle belirlenen konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat boyunca HCT116 hücrelerine uygulanıp akridin turuncusu ve etidyum bromür ile boyanarak floresans fotoğrafları çekilmiştir. Görüntüleri Şekil 4.51, 4.52 ve 4.53'ten ulaşılabilir. Floresans görüntüleri incelendiğinde, hücre morfolojisi açısından sağlıklı hücreler açık yeşil ve koyu yeşil renklerde görülmelerine rağmen erken apoptotik hücreler sarı, açık kahverengi renklerde, geç apoptotik hücreler ise koyu kahverengi ve kırmızı renklerde görülmektedir.

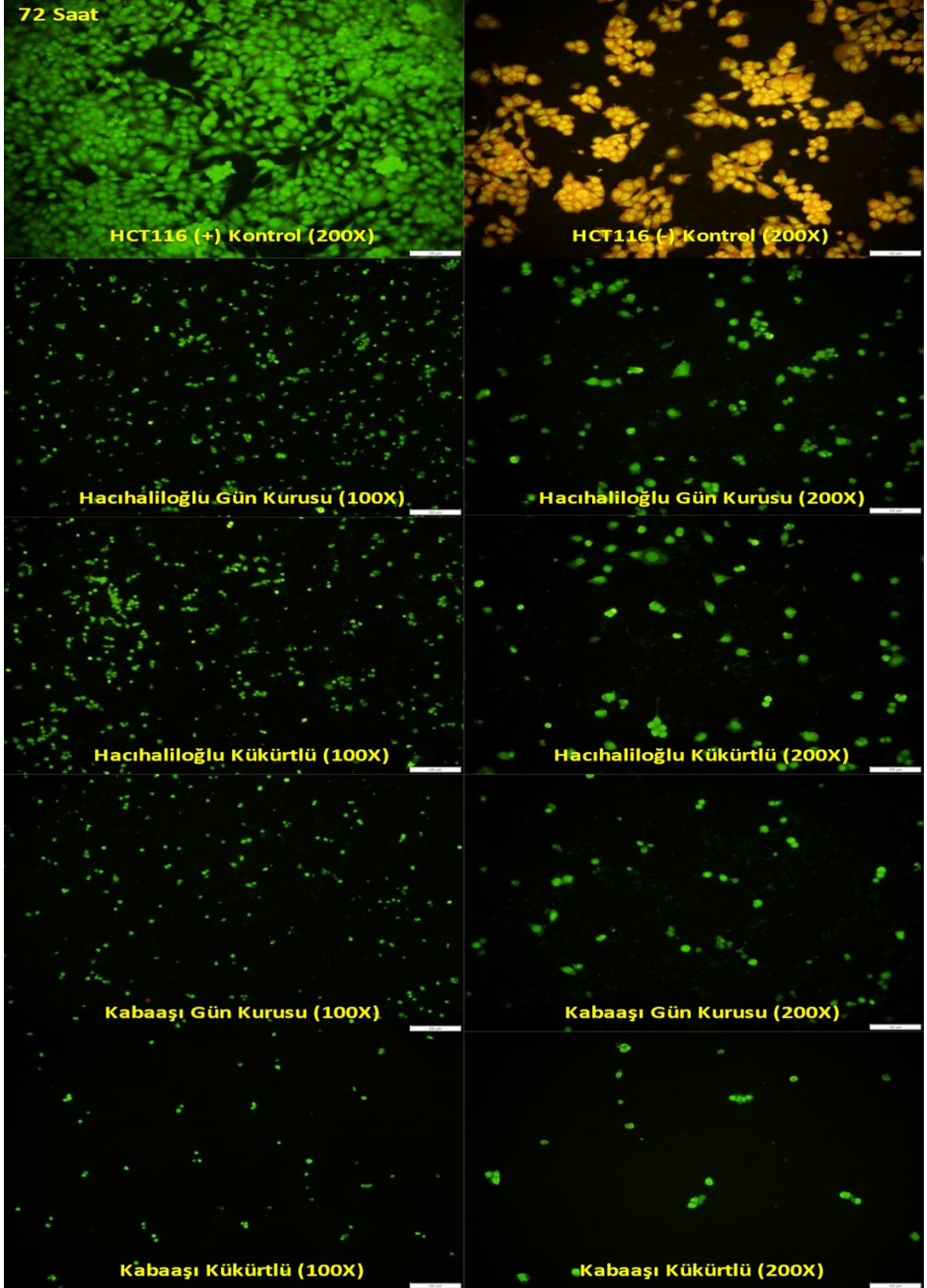




**Şekil 4.51** : Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütme ait görüntülerdeki bar 200  $\mu\text{m}$ , 200X büyütme ait görüntülerdeki bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.)

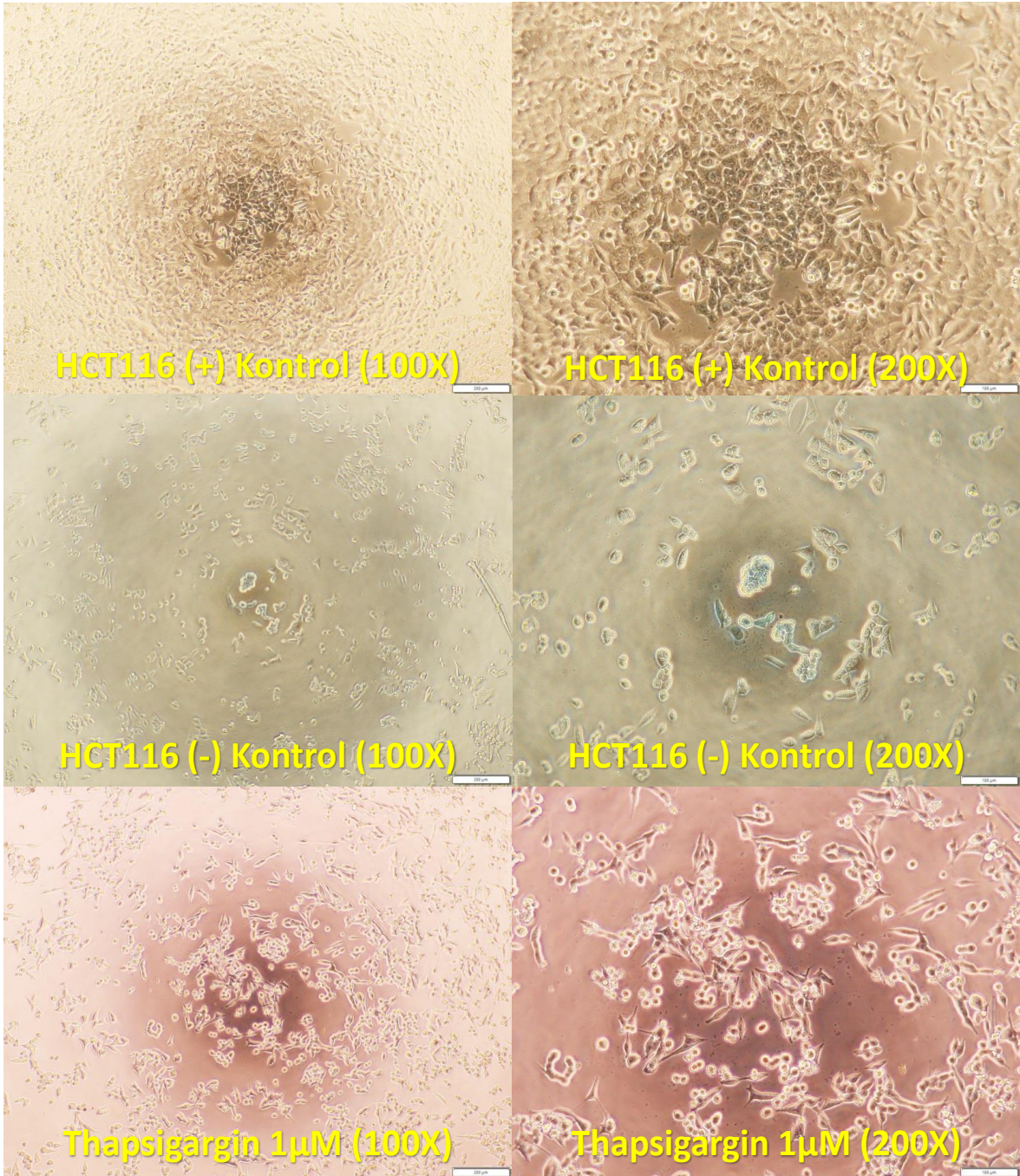


**Şekil 4.52** : Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 48 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)

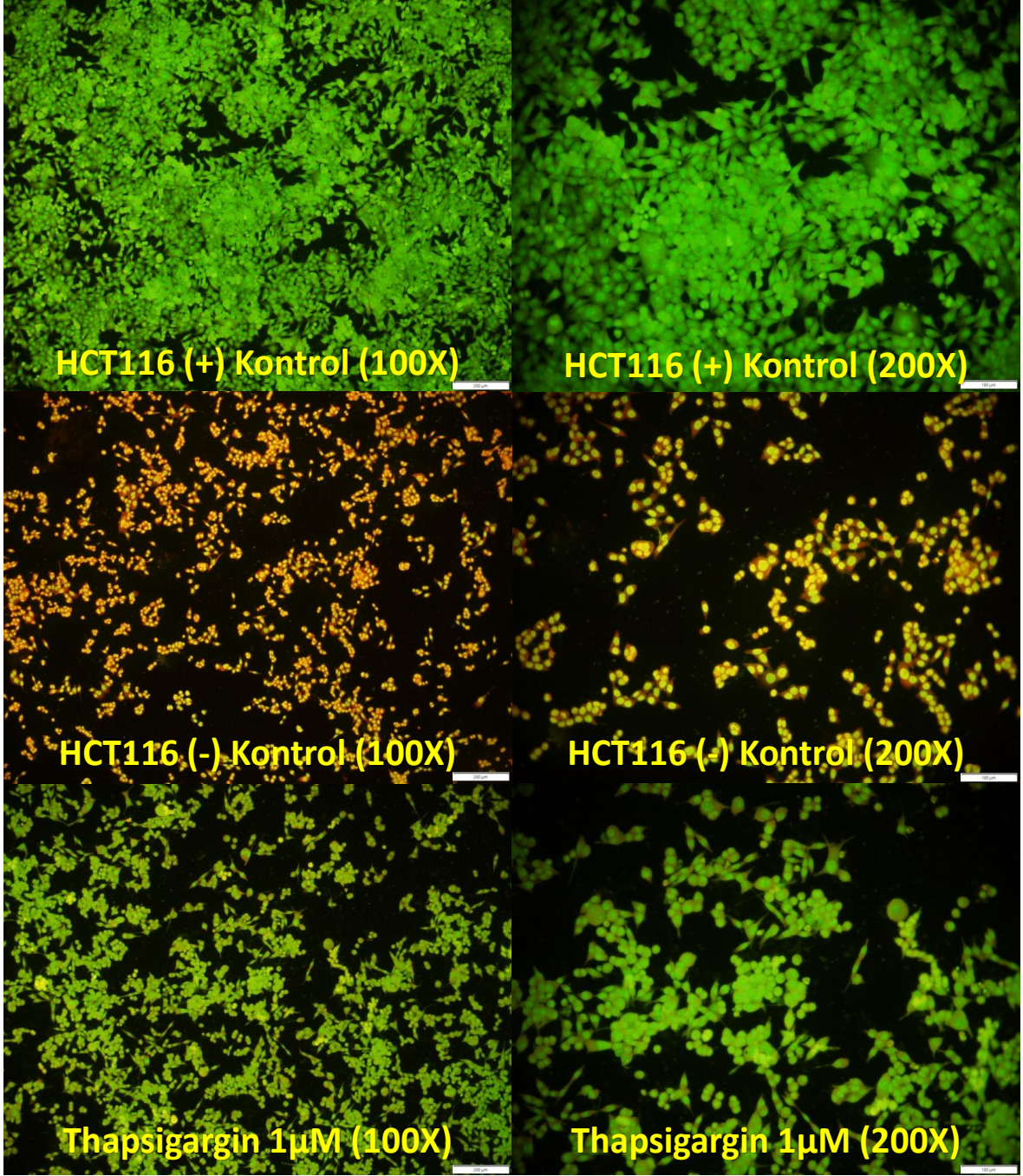


**Şekil 4.53** : Kontrol grupları ve farklı kayısı metanol ekstraktları ile 72 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 200  $\mu\text{m}$ , 200X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.)

Çalışmamızın bundan sonraki aşamasında endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak hücre kültüründe kullanacağımız thapsigargin için 1  $\mu$ M olmak üzere HCT116 hücreleri üzerinde uygulanarak, hücrelere ait morfolojik değişikliklerin gözlemlenmesi amacıyla hücrelerin invert mikroskop resimleri çekilmiştir (Şekil 4.54). Bunun yanında, Akridin turuncusu (AT)/Etidyum bromür (EB) boyaması yapılarak da hücrelerin morfolojik açıdan sağlıkları floresans mikroskop yardımıyla gözlemlenmiştir (Şekil 4.55).



**Şekil 4.54 :** Thapsigargin ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütme için görüntülerdeki bar 200  $\mu$ m, 200X büyütme için görüntülerdeki bar 100  $\mu$ m'dir.)

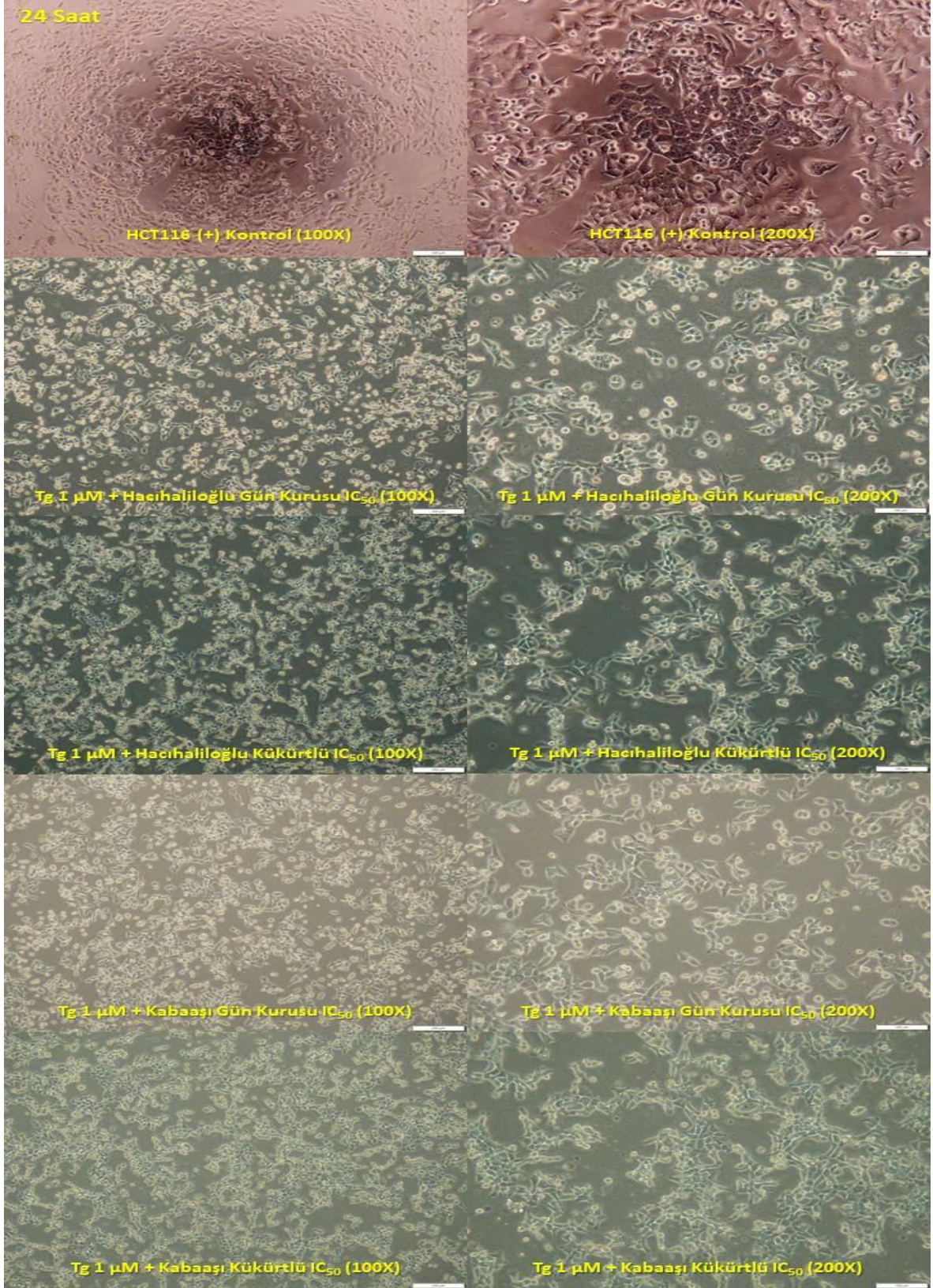


**Şekil 4.55 :** Thapsigargin ile 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütme için görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütme için görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)

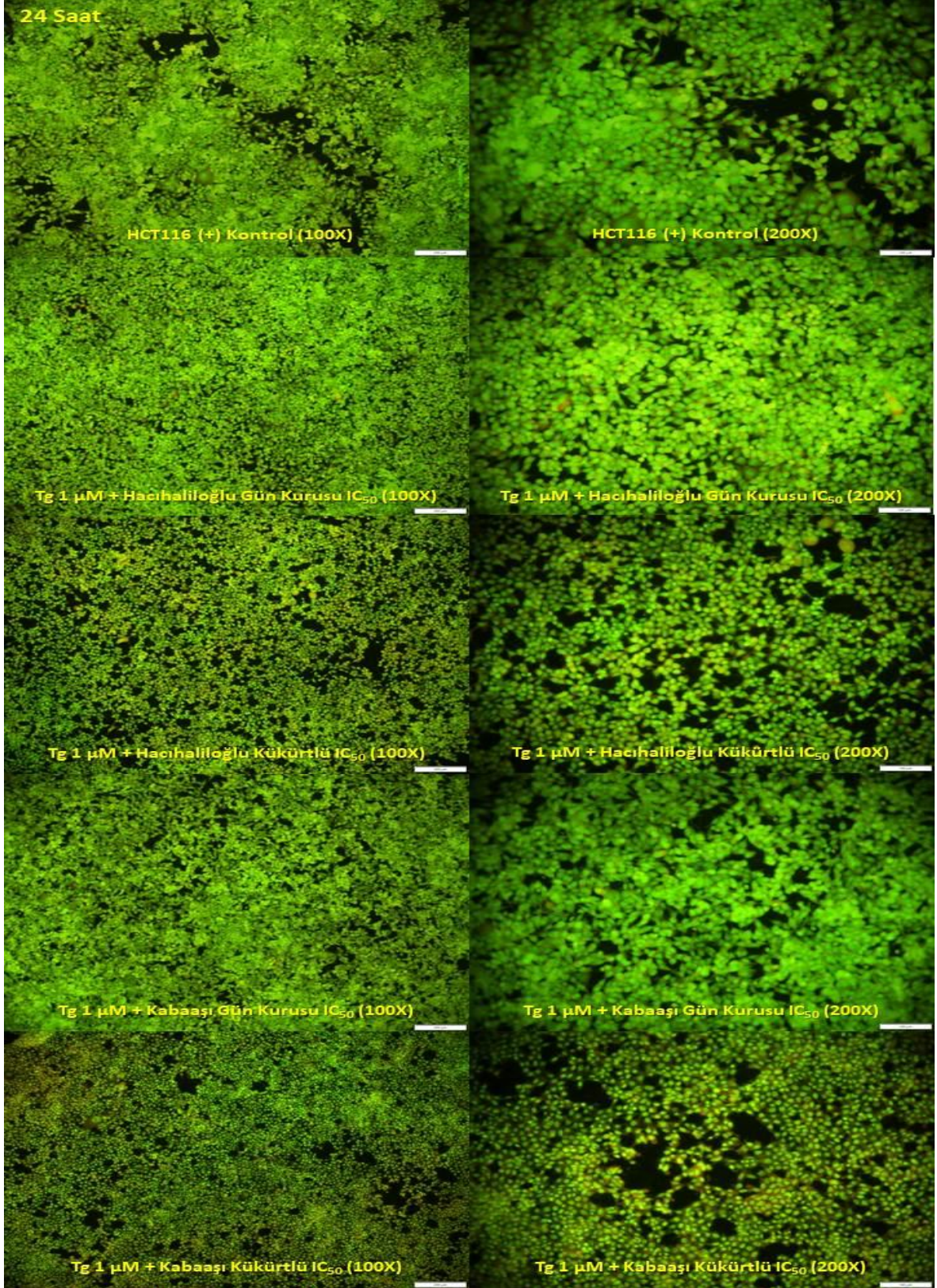
Bir sonraki aşamada, endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak hücre kültüründe kullanacağımız 1 µM thapsigargin ile birlikte Hacihaliloğlu Gün Kurusu, Hacihaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraktlarının 24 saatlik IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri HCT116 hücreleri üzerinde 24 saat denenerek hücrelere ait morfolojik değişikliklerin gözlemlenmesi amacıyla

hücrelerin invert mikroskop resimleri çekilmiştir (Şekil 4.56). Bunun yanında, Akridin turuncusu (AT)/Etidyum bromür (EB) boyaması yapılarak da hücrelerin morfolojik açıdan sağlıkları floresans mikroskop yardımıyla gözlemlenmiştir (Şekil 4.57).





**Şekil 4.56 :** Thapsigargin ve farklı kayısların IC<sub>50</sub> değerlerinin birlikte 24 saat boyunca uygulanmasıyla HCT116 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. (100X büyütme ait görüntülerdeki bar 200 µm, 200X büyütme ait görüntülerdeki bar 100 µm'dir.)



**Şekil 4.57 :** Thapsigarginin ve farklı kayısıların IC<sub>50</sub> değerlerinin birlikte 24 saat boyunca uygulanmasıyla HCT116 hücrelerinin floresans boyama görüntüleri. (100X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 200  $\mu$ m, 200X büyütmeyle ait görüntülerdeki bar 100  $\mu$ m'dir.)

#### 4.7. Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının HCT116 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları

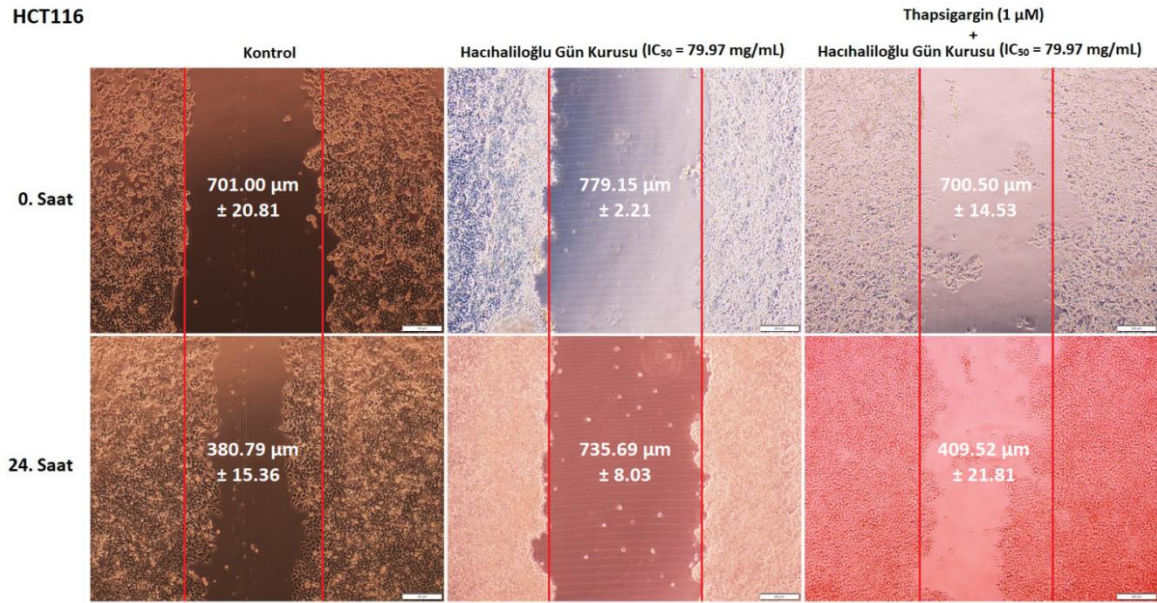
Tez çalışmamızın bu aşamasında, önceden belirlenen Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kuruğu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitlerinin metanol ekstraktlarının IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerlerinin yanında endoplazmik retikulum stresi indükleyici ajan olarak kullandığımız 1 µM Thapsigarginle muamele edilen HCT116 hücrelerinin göç durumları yara iyileşme testi (Wound Healing Assay) yapılarak belirlenmiştir. HCT116 deney gruplarına Çizelge 4.16'dan ulaşılabilir.

Çizelge 4.16 : HCT116 Deney Grupları.

No	Gruplar	Kayısı IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Thapsigargin (1 µM)
1	HCT116 Kontrol	-	-
2	HCT116 + Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu	+	-
3	HCT116 + Hacıhaliloğlu Kükürtlü	+	-
4	HCT116 + Kabaası Gün Kuruğu	+	-
5	HCT116 + Kabaası Kükürtlü	+	-
6	HCT116 + Hacıhaliloğlu Gün Kuruğu	+	+
7	HCT116 + Hacıhaliloğlu Kükürtlü	+	+
8	HCT116 + Kabaası Gün Kuruğu	+	+
9	HCT116 + Kabaası Kükürtlü	+	+

Çalışmamızda hücre göçü testi, MTT test sonuçlarımızdan elde edilen farklı kayısı çeşitlerinin 24 saatlik IC<sub>50</sub> değerlerine ait konsantrasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerle 24 saat boyunca muamele edilen HCT116 hücrelerinin, başlangıçta açılan yarıklarının durumu (kapanıp - kapanmadıkları) 0. ve 24. saatlerde invert mikroskopla incelenerek fotoğrafları çekilmiş ve ImageJ programı kullanılarak analizleri yapılmıştır.

#### 4.7.1. Hacihaliloğlu gün kurusu kayısı ekstraktlarının HCT116 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu

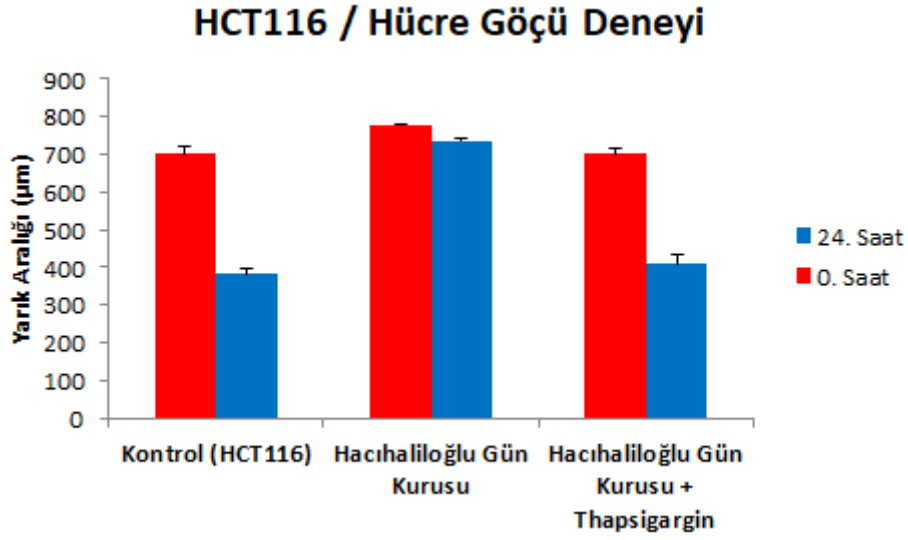


**Şekil 4.58 :** Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kuruğu ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kuruğu kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

Hacihaliloğlu Gün Kuruğu metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri olan 79.97 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.58’de verilmiştir. HCT116 hücreleri kayısı çeşitlerinden Hacihaliloğlu Gün Kuruğu metanol ekstraktının 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri olan 79.97 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1 µM Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarı aralıklarına ait grafik Şekil 4.59’da verilmiştir.

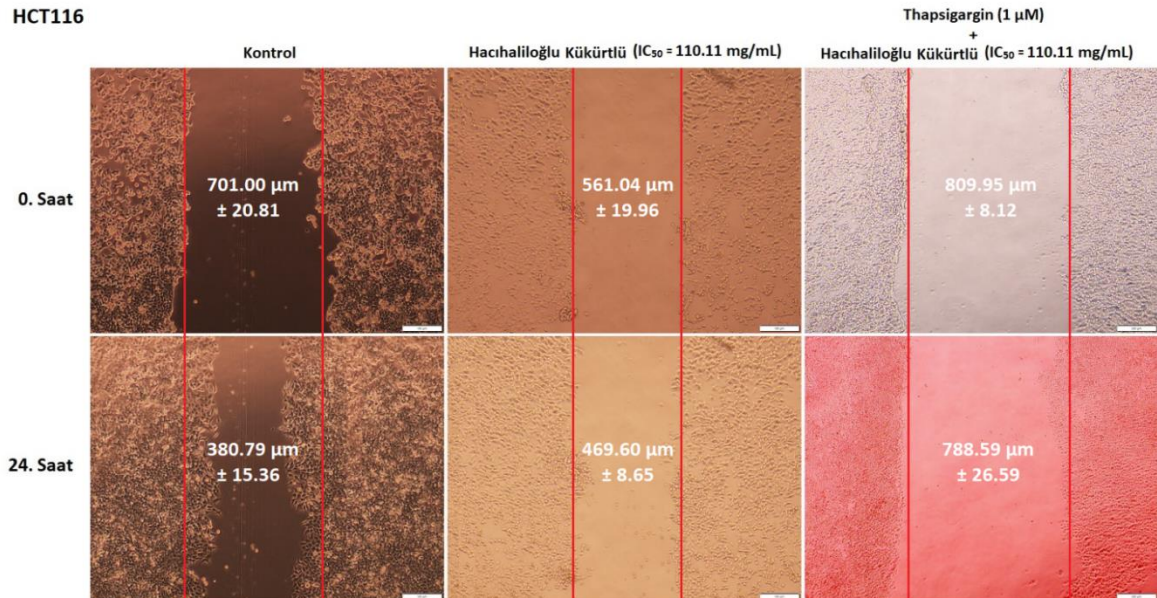
HCT116 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarı aralığı 0. saatte 701 µm iken 24. saatte yarı aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 380.79 µm olarak ölçülmüştür. Hacihaliloğlu Gün Kuruğu ile muamele edilen hücrelerde ise yarı aralığı başlangıçta 779.15 µm iken 24. saat sonunda yarı aralığı kapanarak 735.69 µm’ye gerilemiştir. Ayrıca, 700.50 µm olan 0. saatteki yarı aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesiyle 409.52 µm’ye düşmüştür. Kontrol grubunun yarı aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %45.68 azaldığı, 79.97 mg/mL konsantrasyona sahip Hacihaliloğlu Gün Kuruğu kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen HCT116 hücrelerin yarı aralığının ise %5.58

gerilediği tespit edilmiştir. Bunun yanında, 1 µM Thapsigargin uygulanmış durumda ise yarık aralığında %41.54 kapanma saptanmıştır.



**Şekil 4.59 :** Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.

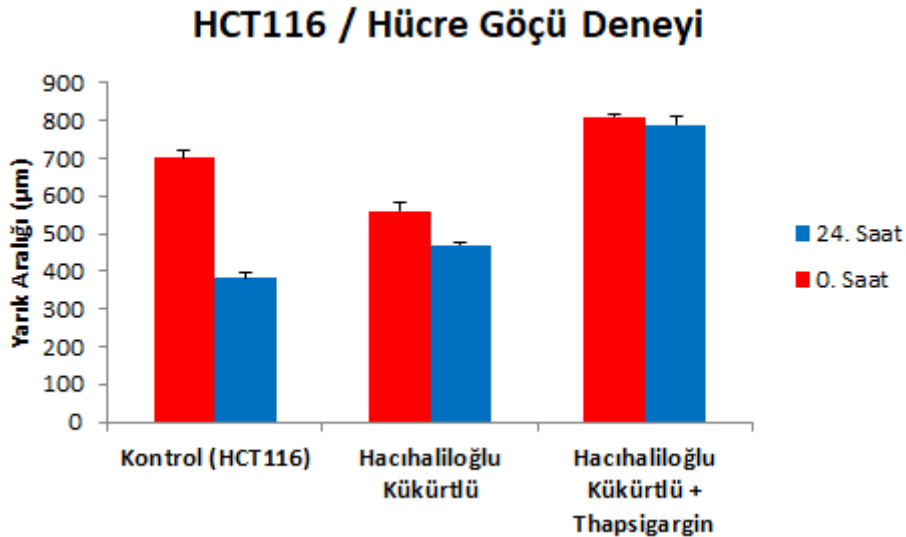
#### 4.7.2. Hacihaliloğlu kükürtlü kayısı ekstraktlarının HCT116 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu



**Şekil 4.60 :** Kontrol grubu, sadece Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

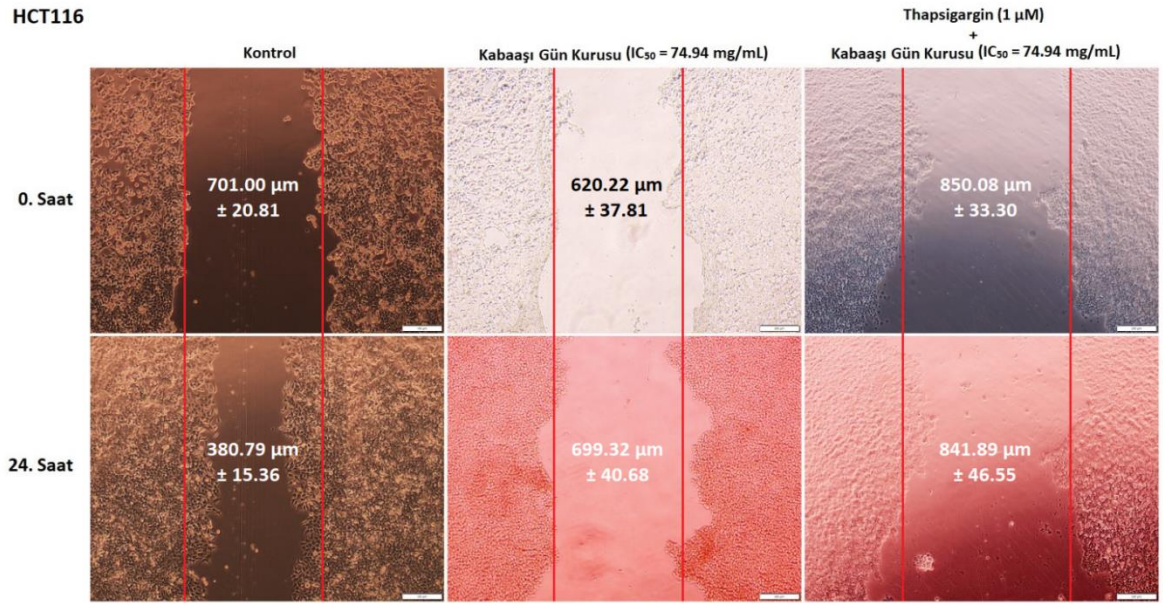
Hacıhaliloğlu Kükürtlü metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri olan 110.11 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.60'da verilmiştir. HCT116 hücreleri kayısı çeşitlerinden Hacıhaliloğlu Kükürtlü metanol ekstraktının 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri olan 110.11 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1 µM Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarık aralıklarına ait grafik Şekil 4.61'de verilmiştir.

HCT116 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 701 µm iken 24. saatte yarık aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 380.79 µm olarak ölçülmüştür. Hacıhaliloğlu Kükürtlü ile muamele edilen hücrelerde ise yarık aralığı başlangıçta 561.04 µm iken 24. saat sonunda yarık aralığı kapanarak 469.60 µm'ye gerilemiştir. Ayrıca, 809.95 µm olan 0. saatteki yarık aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesiyle 788.59 µm'ye düşmüştür. Kontrol grubunun yarık aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %45.68 azaldığı, 110.11 mg/mL konsantrasyona sahip Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen HCT116 hücrelerin yarık aralığının ise %16.30 gerilediği tespit edilmiştir. Bunun yanında, 1 µM Thapsigargin uygulanmış durumda ise yarık aralığında %2.64 kapanma saptanmıştır.



**Şekil 4.61** : Kontrol grubu, sadece Hacıhaliloğlu Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.

### 4.7.3. Kabaası gün kurusu kayısı ekstraktlarının HCT116 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu

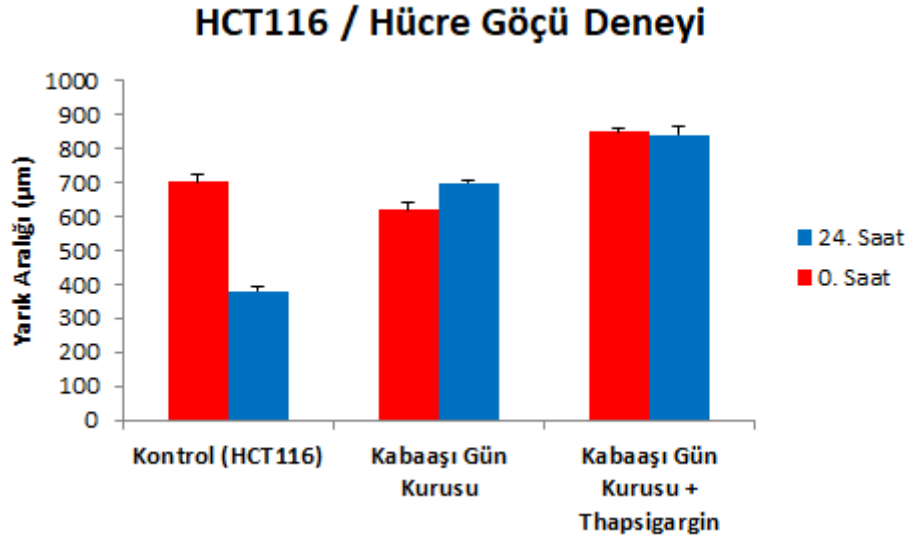


Şekil 4.62 : Kontrol grubu, sadece Kabaası Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

Kabaası Gün Kurusu metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri olan 74.94 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.62’de verilmiştir. HCT116 hücreleri kayısı çeşitlerinden Kabaası Gün Kurusu metanol ekstraktının 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri olan 74.94 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1 µM Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarı aralıklarına ait grafik Şekil 4.63’te verilmiştir.

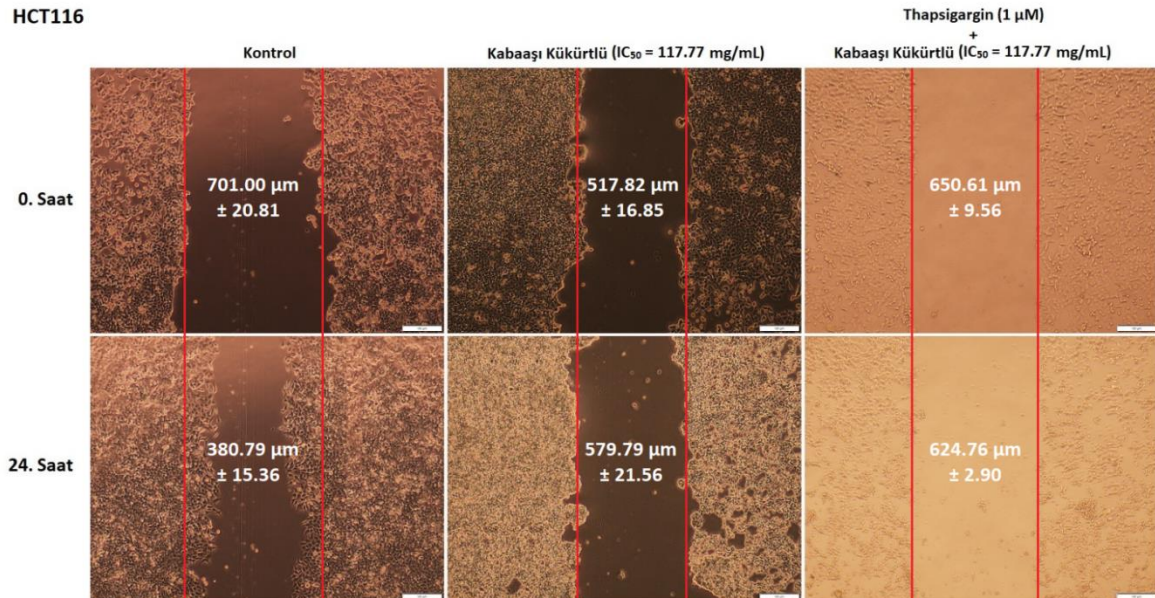
HCT116 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarı aralığı 0. saatte 701 µm iken 24. saatte yarı aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 380.79 µm olarak ölçülmüştür. Kabaası Gün Kurusu ile muamele edilen hücrelerde ise yarı aralığı başlangıçta 620.22 µm iken 24. saat sonunda yarı aralığı açılarak 699.32 µm’ye ulaşmıştır. Ayrıca, 850.08 µm olan 0. saatteki yarı aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesi sonucunda çok az düşüşle 841.89 µm olmuştur. Kontrol grubunun yarı aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %45.68 azaldığı, 74.94 mg/mL konsantrasyona sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen HCT116 hücrelerin yarı aralığının ise %12.75 açıldığı tespit

edilmiştir. Bunun yanında, 1  $\mu$ M Thapsigargin uygulanmış durumda ise yarık aralığında %0.96'lık kapanma saptanmıştır.



**Şekil 4.63 :** Kontrol grubu, sadece Kabaası Gün Kurusu ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Gün Kurusu kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.

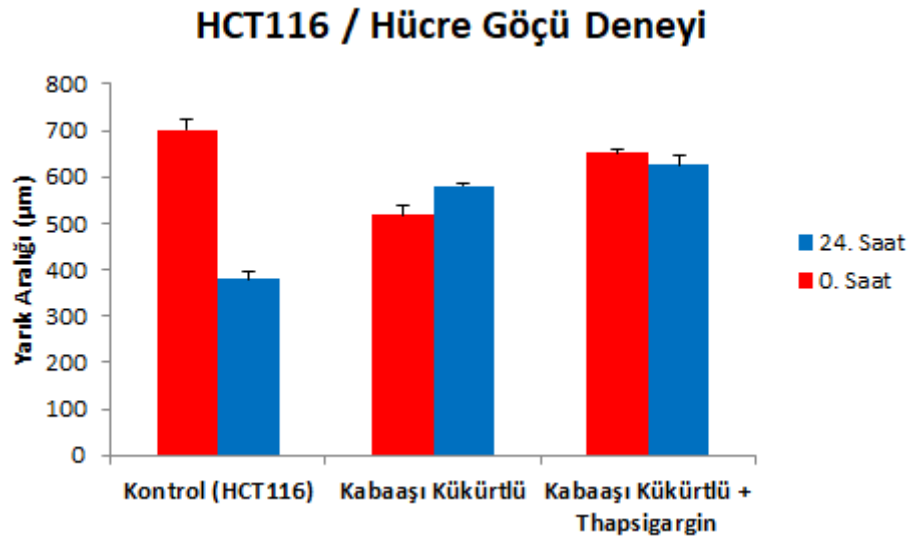
#### 4.7.4. Kabaası kükürtlü kayısı ekstraktlarının HCT116 hücreleri üzerindeki hücre göçü deneyi sonucu



**Şekil 4.64 :** Kontrol grubu, sadece Kabaası Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaası Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyi görüntüleri.

Kabaaşı Kükürtlü metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri olan 117.77 mg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki invert mikroskop fotoğrafları Şekil 4.64'te verilmiştir. HCT116 hücreleri kayısı çeşitlerinden Kabaaşı Kükürtlü metanol ekstraktının 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri olan 117.77 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisinin yanında ayrıca 1 µM Thapsigargin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak, 0. ve 24. saatlerdeki yarık aralıklarına ait grafik Şekil 4.65'te verilmiştir.

HCT116 hücrelerine ait Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 701 µm iken 24. saatte yarık aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 380.79 µm olarak ölçülmüştür. Kabaaşı Kükürtlü ile muamele edilen hücrelerde ise yarık aralığı başlangıçta 517.82 µm iken 24. saat sonunda yarık aralığı açılarak 579.79 µm'ye ulaşmıştır. Ayrıca, 650.61 µm olan 0. saatteki yarık aralığı Thapsigarginin ortama eklenmesi sonucunda 624.76 µm'ye gerilemiştir. Kontrol grubunun yarık aralığının hücre göçü sonucunda 24. saatte %45.68 azaldığı, 117.77 mg/mL konsantrasyona sahip Kabaaşı Kükürtlü kayısı metanol ekstraktı ile muamele edilen HCT116 hücrelerin yarık aralığının ise %11.97 açıldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, 1 µM Thapsigargin uygulanmış durumda ise yarık aralığında %3.97'lik kapanma saptanmıştır.

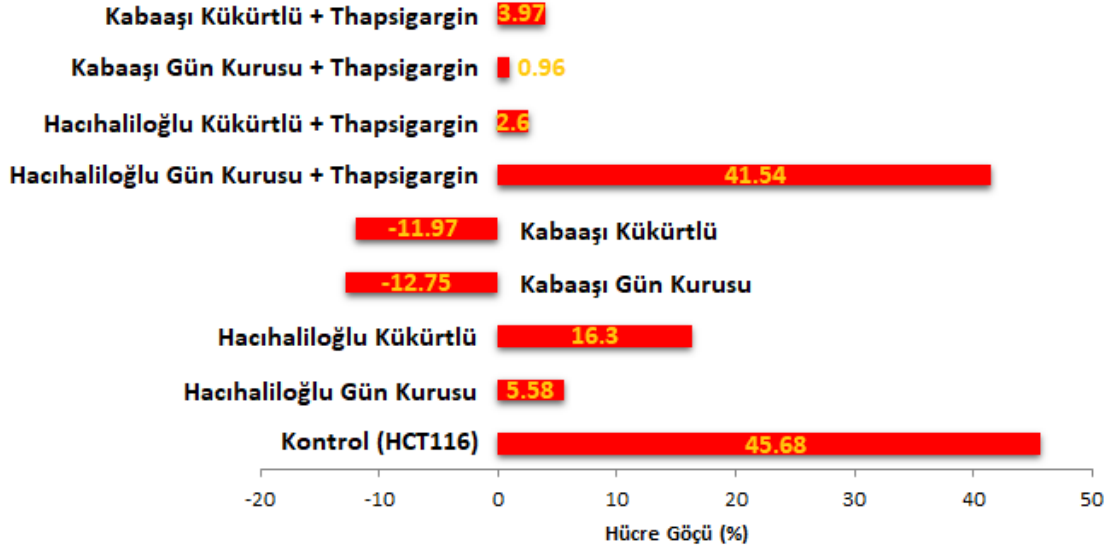


**Şekil 4.65 :** Kontrol grubu, sadece Kabaaşı Kükürtlü ve Thapsigargin eklenmiş Kabaaşı Kükürtlü kayısı ile muamele edilen HCT116 hücrelerinin 0. ve 24. saatlerdeki hücre göçü deneyinden elde edilen yarık aralığı grafiği.

Farklı kayısı metanol ekstraktlarının HCT116 hücreleri üzerindeki yarık aralığı ve hücre göçü yüzdelerini gösteren hücre göçü deneyi sonuçlarına Çizelge 4.17'den ulaşılabilir. Ayrıca, kontrol grubu, farklı kayısı çeşitlerinin metanol ekstraktları ve Thapsigargin eklenmiş farklı kayısı çeşitleriyle muamele edilen HCT116 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre göçü yüzdesi grafiği Şekil 4.66'da görülmektedir.

**Çizelge 4.17 :** Farklı Kayısı Metanol Ekstraktlarının HCT116 Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Deneyi Sonuçları.

Gruplar	Zaman (Saat)	Yarık Aralığı ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ Standart Sapma	Hücre Göçü (%)
Kontrol (HCT116)	0	701.00 $\pm$ 20.81	0
Kontrol (HCT116)	24	380.79 $\pm$ 15.36	45.68
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu	0	779.15 $\pm$ 2.21	0
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu	24	735.69 $\pm$ 8.03	5.58
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu + Thapsigargin	0	700.50 $\pm$ 14.53	0
Hacıhaliloğlu Gün Kurusu + Thapsigargin	24	409.52 $\pm$ 21.81	41.54
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	0	561.04 $\pm$ 19.96	0
Hacıhaliloğlu Kükürtlü	24	469.60 $\pm$ 8.65	16.30
Hacıhaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	0	809.95 $\pm$ 8.12	0
Hacıhaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	24	788.59 $\pm$ 26.59	2.64
Kabaaşı Gün Kurusu	0	620.22 $\pm$ 37.81	0
Kabaaşı Gün Kurusu	24	699.32 $\pm$ 40.68	-12.75
Kabaaşı Gün Kurusu + Thapsigargin	0	850.08 $\pm$ 33.30	0
Kabaaşı Gün Kurusu + Thapsigargin	24	841.89 $\pm$ 46.55	0.96
Kabaaşı Kükürtlü	0	517.82 $\pm$ 16.85	0
Kabaaşı Kükürtlü	24	579.79 $\pm$ 21.56	-11.97
Kabaaşı Kükürtlü + Thapsigargin	0	650.61 $\pm$ 9.56	0
Kabaaşı Kükürtlü + Thapsigargin	24	624.76 $\pm$ 2.90	3.97



Şekil 4.66 : Kontrol grubu, farklı kayısı çeşitleri ve Thapsigargin eklenmiş farklı kayısı çeşitleriyle muamele edilen HCT116 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre göçü yüzdesi grafiği.

#### 4.8. HCT116 Hücrelerinin ELISA Sonuçları

HCT116 hücrelerine ait ATF6, CHOP ve XBP1 proteinleri için One-Way ANOVA sonuçları Çizelge 4.18’de, ATF6 proteinine ait ELISA sonuçları Çizelge 4.19’da ve ELISA sonuçlarıyla ilgili grafik Şekil 4.67’de görülmektedir. Ayrıca, XBP1 proteinine ait ELISA sonuçları Çizelge 4.20’de ve ELISA sonuçlarıyla ilgili grafik Şekil 4.68’de görülmektedir.

Çizelge 4.18 : HCT116 Hücrelerinin ATF6, CHOP ve XBP1 için One-Way ANOVA Sonuçları.

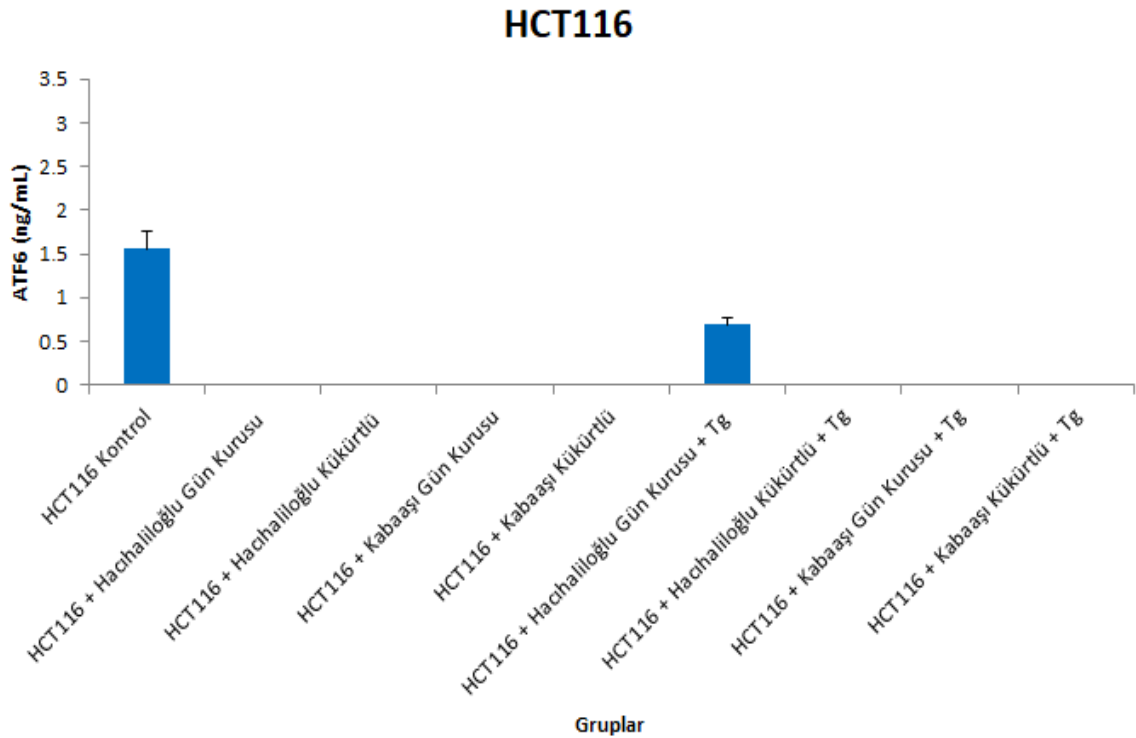
(HCT116) ELISA	Serbestlik Derecesi	F	p (<0.05)	$\eta_p^2$
ATF6	8	304.182	0.000000	0.989
CHOP	8	-	-	-
XBP1	8	880.660	0.000000	0.996

## ATF6

**Çizelge 4.19 : HCT116 Hücrelerinin ATF6 ELISA Sonuçları.**

Gruplar	Ortalama (ng/mL)	Standart Sapma	N
HCT116 Kontrol	1.562	0.103	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu	0.000	0.000	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Kükürtlü	0.000	0.000	4
HCT116 + Kabaşığı Gün Kuruğu	0.000	0.000	4
HCT116 + Kabaşığı Kükürtlü	0.000	0.000	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu + Thapsigargin	0.689	0.156	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	0.000	0.000	4
HCT116 + Kabaşığı Gün Kuruğu + Thapsigargin	0.000	0.000	4
HCT116 + Kabaşığı Kükürtlü + Thapsigargin	0.000	0.000	4

HCT116 Kontrol grubuna ait ATF6 protein değerleri diğer tüm grup değerlerinden yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Ayrıca HCT116 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu + Thapsigargin grubu, ATF6 açısından diğer tüm gruplarla kıyaslandığında aralarında anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4.19, Şekil 4.67).



**Şekil 4.67 : HCT116 hücrelerindeki ATF6 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği.**

## **CHOP**

Hücre kültüründen elde edilen HCT116 hücrelerinde CHOP proteinine rastlanmadığı için tabloda belirtilmemiştir.

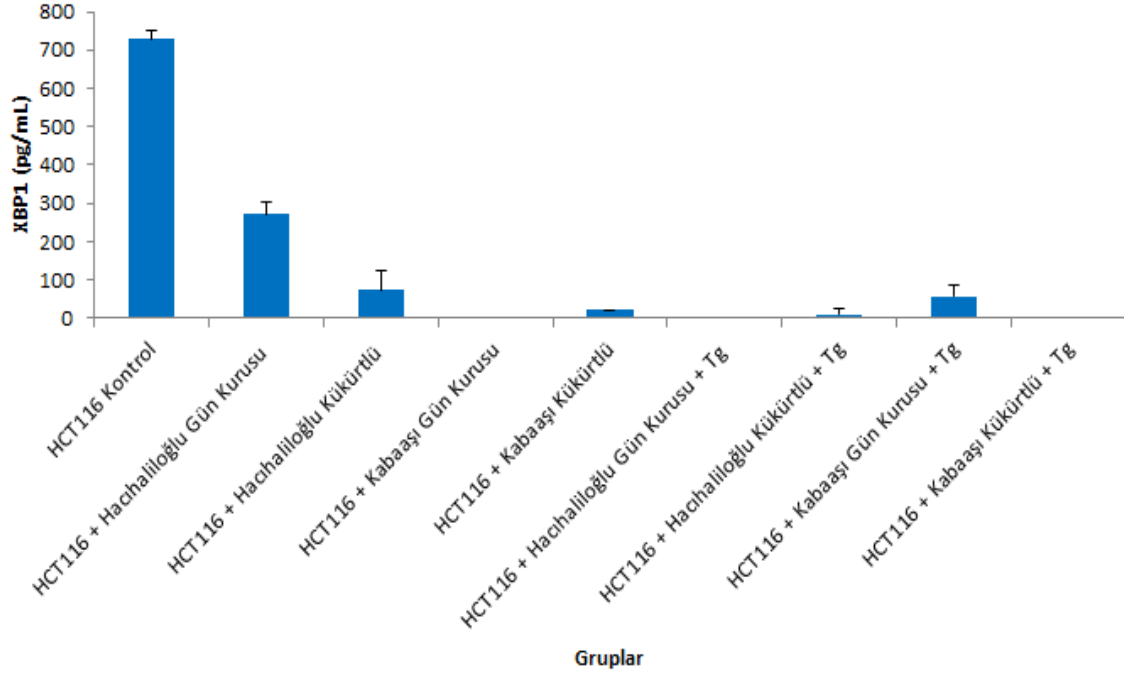
## **XBP1**

**Çizelge 4.20 : HCT116 Hücrelerinin XBP1 ELISA Sonuçları.**

<b>Gruplar</b>	<b>Ortalama (pg/mL)</b>	<b>Standart Sapma</b>	<b>N</b>
HCT116 Kontrol	727.851	31.479	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu	272.296	34.760	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Kükürtlü	72.295	9.601	4
HCT116 + Kabaası Gün Kuruğu	0.000	0.000	4
HCT116 + Kabaası Kükürtlü	21.740	8.389	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu + Thapsigargin	0.000	0.000	4
HCT116 + Hacihaliloğlu Kükürtlü + Thapsigargin	10.073	0.000	4
HCT116 + Kabaası Gün Kuruğu + Thapsigargin	57.295	2.127	4
HCT116 + Kabaası Kükürtlü + Thapsigargin	0.000	0.000	4

HCT116 Kontrol grubuna ait XBP1 değerleri diğer tüm gruplardan yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). HCT116 + Hacihaliloğlu Gün Kuruğu grubu, diğer tüm gruplarla kıyaslandığında XBP1 bakımından aralarında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0.05$ ). HCT116 + Hacihaliloğlu Kükürtlü grubu, HCT116 + Kabaası Gün Kuruğu + Thapsigargin haricindeki diğer tüm gruplarla kıyaslandığında XBP1 bakımından aralarında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.20, Şekil 4.68).

## HCT116



Şekil 4.68 : HCT116 hücrelerindeki XBP1 proteinine ait ELISA sonuçları grafiği.

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Hacıhaliloğlu ve Kabaası olmak üzere 2 adet kayısı çeşidinin hem gün kurusu hem de kükürtlü (2000 ppm) olarak kurutulmuş meyvelerinin sitotoksik aktiviteleri, metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve insan kolon kanseri hücre hattı HCT116 hücreleri üzerinde uygulanarak MTT testi ile araştırılmıştır. Ayrıca, farklı yollarla kurutulmuş kayısı ekstraktlarının sitotoksik aktivite deneyleri sonuçlarına göre %50 inhibisyon sağlayan IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri kullanılarak yara iyileşme testiyle hücre göçü incelenmiş ve akrinin turuncusu (AT)/etidyum bromür (EB) boyamasından yararlanılarak hücre canlılıkları gözlenmiştir. Son olarak, endoplazmik retikulum stresinde etkin faaliyet gösteren, birbirinden farklı yollara ait ELISA kitler kullanılarak ATF6, CHOP ve XBP1 proteinlerinin miktarları saptanmıştır.

Malatya kayısılarının gün ışığıyla ve ayrıca kükürtlü (2000 ppm) kurutulmuş farklı çeşitlerinin MCF-7 ve HCT116 hücreleri üzerindeki antikanser ve antiproliferatif etkilerinin yanında endoplazmik retikulum stresinde belli başlı yollarda yer alan spesifik proteinlerin miktarlarındaki değişikliklerden ilk kez bu tez çalışmasında bahsedilmiştir. Malatya kayısı ile ilgili literatürde çok az araştırma bulunmaktadır. Kayısı hakkında yapılan kısıtlı çalışmalar çoğunlukla kayısının antioksidan özelliğinin incelenmesine yöneliktir.

Literatürde, kayısının endoplazmik retikulum stresi üzerine etkisinin incelendiği tek bir araştırma vardır. Kayısı çekirdeğinin kullanıldığı o çalışmada, tunikamisine indüklenen endoplazmik retikulum stresine bağlı olarak farelerdeki antioksidan enzim aktivite düzeyleri belirlenmiştir (Moslehi ve diğ., 2019). Bunun haricinde Japonya kayısı ile yapılan bir antikanser çalışmada, triterpen ve çeşitli antikanser ilaç karışımlarının özofagus skuamöz karsinoma hücreleri üzerindeki antineoplastik etkisi WST-8 hücre canlılık testiyle ve hayvan modeli kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçta, Japonya kayısının bazı ilaçların antikanser etkisini arttırmada hastalar için fayda sağladığı bulunmuştur (Yamai ve diğ., 2009). Yapılan bir başka çalışmada, Japonya kayısının ekstraktından elde edilen bir bileşiğin (MK615) insan pankreas kanseri hücreleri üzerindeki antineoplastik etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak bu bileşiğin, üç farklı pankreas kanserinin proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Okada ve diğ., 2008).

Bu bilimsel araştırmamızda, Malatya kayısı çeşitlerinin MCF-7 ve HCT116 hücre hatları üzerindeki direkt sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde 24, 48 ve 72 saat olmak üzere *in vitro* MTT testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 72 saat sonunda kayısılarla

muamele edilen hücrelerin sitotoksiteleri en yüksek değerlere ulaşmıştır. Ayrıca, hem gün ışığında hem de kükürlenerek kurutulmuş farklı kayısı türleri için hücrelerin proliferasyonu gün geçtikçe azalmış ve üçüncü günün sonunda en düşük değerlere sahip olmuştur.

İnsan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 üzerinde yapılan MTT testinin Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 1., 2. ve 3. günlerde ortak olan 50, 55, 60 ve 65 mg/mL konsantrasyonları için 24 saatlik sonucuna göre %17.27-69.64 aralığında, 48 saatlik sonucuna göre %45.02-93.86 aralığında ve 72 saatlik sonucuna göre %50.59-98.45 aralığında; Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 1., 2. ve 3. günlerde ortak olan 50 ve 75 mg/mL konsantrasyonları için 24 saatlik sonucuna göre %26.23-29.77 aralığında, 48 saatlik sonucuna göre %33.19-59.82 aralığında ve 72 saatlik sonucuna göre %36.11-75.28 aralığında; Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 1., 2. ve 3. günlerde ortak olan 55, 60 ve 65 mg/mL konsantrasyonları için 24 saatlik sonucuna göre %43.76-69.56 aralığında, 48 saatlik sonucuna göre %65.40-84.54 aralığında ve 72 saatlik sonucuna göre %73.45-92.22 aralığında; Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 2. ve 3. günlerde ortak olan 50 ve 75 mg/mL konsantrasyonları için 48 saatlik sonucuna göre %44.10-64.46 aralığında ve 72 saatlik sonucuna göre %47.57-78.04 aralığında inhibisyon değerleri göstermiştir.

MCF-7 hücrelerinde ayrıca MTT testi ile, %50 hücre büyüme inhibisyonu gösteren kayısı ekstraktlarının  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir. Hacihaliloğlu Gün kurusu, Hacihaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitleri karşılaştırıldığında en iyi  $IC_{50}$  değerleri, 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 56.32, 48.38 ve 45.26 mg/mL konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu metanol ekstraktlarına aittir. Hacihaliloğlu Gün kurusu ve Kabaası Gün Kurusu  $IC_{50}$  değerleri açısından tüm günler birbirine yakın değerlerde olmasına rağmen Hacihaliloğlu Kükürtlü ve Kabaası Kükürtlü kayısıların  $IC_{50}$  değerleri ikinci günün sonunda ani olarak düşerek üçüncü günle birbirine yakın değerler haline gelmiştir.

Gün ışığında veya kükürlenerek kurutulmuş kayısı ekstraktlarının MTT testiyle belirlenen  $IC_{50}$  değerleri kullanılarak MCF-7 hücrelerinin canlılığını gözlemlemek için akridin turuncusu ve etidyum bromür boyaması gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücreleri ile yapılan floresans boyama testleriyle (+) Kontrol grubundaki tüm hücrelerin parlak yeşil renkte ve canlı olduğu görülmüştür. (-) Kontrol grubundaki tüm hücreler ise uygulanan DMSO yüzünden canlılıklarını kaybederek kırmızı ve turuncu renkte boyanmışlardır. Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısına ait 24, 48 ve 72 saatlik  $IC_{50}$  değerleri olan sırasıyla

60.16, 52.08 ve 49.79 mg/mL; Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısıya ait 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri olan sırasıyla 95.47, 66.18 ve 59.69 mg/mL; Kabaası Gün Kurusu kayısıya ait 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri olan sırasıyla 56.32, 48.38 ve 45.26 mg/mL; Kabaası Kükürtlü kayısıya ait 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri olan sırasıyla 108.99, 58.06 ve 54.13 mg/mL konsantrasyonlarının uygulandığı MCF-7 hücre hattındaki hücrelerde ölümlerin olması nedeniyle neredeyse ekilen hücrelerin yarısı öldüğü için ölmek üzere olan hücreler de etidyum bromür ile kırmızıya ve kalan canlı hücreler ise akridin turuncusu ile yeşil renge boyanmıştır. Ayrıca, bu boyama yönteminde uygulanan konsantrasyonlar hücrelerin yarısını öldüren IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri olduğundan floresans mikroskopla çekilen akridin turuncusu ve etidyum bromür boyama testi fotoğrafları, MTT testi sonucunda invert mikroskopla çekilen hücre görüntüleriyle tamamen tutarlı olarak saptanmıştır. Buna ilaveten, hücrelere endoplazmik retikulum stresi oluşturmak amacıyla uygulanan 1 µM Thapsigargin %50'den daha fazla hücre ölümü meydana getirmediğinden bu konsantrasyonun diğer deneylerde kullanılabilceği hem invert mikroskopla çekilen hücre görüntülerinden hem de akridin turuncusu ve etidyum bromür boyama testi fotoğraflarından anlaşılmıştır.

Kayısıların metanol ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki hücre göçüne etkilerini gözlemleyebilmek için yara iyileşme testi yapılmıştır. Kayısıların 24 saatlik IC<sub>50</sub> konsantrasyonları yara iyileşme testinde kullanılmıştır. Bu test için herhangi bir ekstrakt uygulanmayan (+) Kontrol grubunun yarı aralığı 0. saatte 639.92 ± 2.44 µm ve 24. saatte 491.10 ± 10.66 µm olarak ölçülmüştür. 60.16 mg/mL konsantrasyona sahip Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının uygulandığı MCF-7 hücresinde yarı aralığı 0. saatte 710.03 ± 4.77 µm ve 24. saatte 693.26 ± 6.61 µm olarak belirlenmiştir. Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değerine ilaveten 1 µM Thapsigargin uyguladığımızda MCF-7 hücresinde yarı aralığı 0. saatte 521.48 ± 4.21 µm ve 24. saatte 511.52 ± 1.60 µm olarak bulunmuştur. 95.47 mg/mL konsantrasyona sahip Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının uygulandığı MCF-7 hücresinde yarı aralığı 0. saatte 327.26 ± 4.02 µm ve 24. saatte 318.08 ± 1.54 µm olarak saptanmıştır. Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değerine ilaveten 1 µM Thapsigargin uyguladığımızda MCF-7 hücresinde yarı aralığı 0. saatte 686.68 ± 2.89 µm ve 24. saatte 799.24 ± 11.42 µm olarak hesaplanmıştır. 56.32 mg/mL konsantrasyona sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının uygulandığı MCF-7 hücresinde yarı aralığı 0. saatte 704.76 ± 5.86 µm ve 24. saatte 740.11 ± 11.74 µm olarak ölçülmüştür. Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değerine ilaveten 1 µM Thapsigargin

uyguladığımızda MCF-7 hücresinde yarık aralığı 0. saatte  $590.89 \pm 5.05 \mu\text{m}$  ve 24. saatte  $534.15 \pm 5.81 \mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir.  $108.99 \text{ mg/mL}$  konsantrasyona sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının uygulandığı MCF-7 hücresinde yarık aralığı 0. saatte  $498.87 \pm 3.75 \mu\text{m}$  ve 24. saatte  $534.99 \pm 9.28 \mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının  $\text{IC}_{50}$  değerine ilaveten  $1 \mu\text{M}$  Thapsigargin uyguladığımızda MCF-7 hücresinde yarık aralığı 0. saatte  $360.31 \pm 3.30 \mu\text{m}$  ve 24. saatte  $398.61 \pm 10.34 \mu\text{m}$  olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda hücre göçü yeteneği yani hücre proliferasyonu azalmasına rağmen, kükürtlü kayısı çeşitlerine Thapsigargin uygulanması gün kurusu kayıslara Thapsigargin uygulanmasına nazaran çalışılan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin hücre göçü yeteneğini ve dolayısıyla da hücre proliferasyonunu azaltıcı etkiye sahiptir.

MCF-7 hücrelerine yönelik ELISA sonuçları incelendiğinde, ATF6 proteinini açısından MCF-7 Kontrol grubu diğer tüm gruplardan ortalama olarak daha yüksek değerde bulunmuştur. Ayrıca, MCF-7 + Kabaası Gün Kurusu grubuyla MCF-7 + Kabaası Gün Kurusu + Thapsigargin birbirleriyle kıyaslandığında Thapsigarginin ATF6 protein miktarını oldukça arttırdığı belirlenmiştir. Bunun zıttı olarak, Thapsigargin eklenmesiyle birlikte MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü grubunun ortalama değeri 5 kat azalmıştır. Elde edilen ELISA sonuçlarından, MCF-7 hücrelerinde CHOP proteinine rastlanmamıştır. Endoplazmik retikulum stresinde bir başka yolakta yer alan XBP1 proteinini açısından ise MCF-7 + Hacihaliloğlu Kükürtlü grubu, MCF-7 + Hacihaliloğlu Gün Kurusu haricindeki diğer tüm gruplardan yüksektir ( $p < 0.05$ ).

İnsan kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 üzerinde yapılan MTT testinin Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 1., 2. ve 3. günlerde ortak olan 55, 60 ve 65 mg/mL konsantrasyonları için 24 saatlik sonucuna göre %26.04-32.21 aralığında, 48 saatlik sonucuna göre %36.41-54.38 aralığında ve 72 saatlik sonucuna göre %55.71-86.05 aralığında; Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 1., 2. ve 3. günlerde ortak olan 100 ve 125 mg/mL konsantrasyonları için 24 saatlik sonucuna göre %45.02-57.50 aralığında, 48 saatlik sonucuna göre %47.45-60.63 aralığında ve 72 saatlik sonucuna göre %60.32-83.05 aralığında; Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının 1., 2. ve 3. günlerde ortak olan 55, 60 ve 65 mg/mL konsantrasyonları için 24 saatlik sonucuna göre %36.93-47.90 aralığında, 48 saatlik sonucuna göre %39.83-49.03 aralığında ve 72 saatlik sonucuna göre %54.09-78.19 aralığında; Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının 1. ve 2. günlerde ortak olan 100 ve 125 mg/mL konsantrasyonları için 24 saatlik sonucuna

göre %43.71-52.60 aralığında ve 48 saatlik sonucuna göre %49.52-65.73 aralığında inhibisyon değerleri göstermiştir.

HCT116 hücrelerinde ayrıca MTT testi ile, %50 hücre büyüme inhibisyonu gösteren kayısı ekstraktlarının IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. Hacıhaliloğlu Gün kurusu, Hacıhaliloğlu Kükürtlü, Kabaası Gün Kurusu ve Kabaası Kükürtlü kayısı çeşitleri karşılaştırıldığında en iyi IC<sub>50</sub> değerleri, 24 ve 72. saatlerde sırasıyla 74.94 ve 50.03 mg/mL konsantrasyonlara sahip Kabaası Gün Kurusu metanol ekstraktlarına aittir. 48. saatteki en iyi IC<sub>50</sub> değeri ise 63.05 mg/mL konsantrasyona sahip Hacıhaliloğlu Gün kurusu metanol ekstraktına aittir. Hacıhaliloğlu Gün kurusu ve Kabaası Gün Kurusu IC<sub>50</sub> değerleri açısından tüm günler birbirine yakın değerlerde olmasına rağmen Hacıhaliloğlu Kükürtlü ve Kabaası Kükürtlü kayısıların IC<sub>50</sub> değerleri üçüncü günün sonunda ani olarak düşerek diğer günlerden farklı bir profil çizmişlerdir.

Gün ışığında veya kükürlenerek kurutulmuş kayısı ekstraktlarının MTT testiyle belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri kullanılarak HCT116 hücrelerinin canlılığını gözlemlemek için akridin turuncusu ve etidyum bromür boyaması gerçekleştirilmiştir. HCT116 hücreleri ile yapılan floresans boyama testleriyle (+) Kontrol grubundaki tüm hücrelerin parlak yeşil renkte ve canlı olduğu görülmektedir. (-) Kontrol grubundaki tüm hücreler ise uygulanan DMSO yüzünden canlılıklarını kaybederek kırmızı ve turuncu renkte boyanmışlardır. Hacıhaliloğlu Gün Kurusu kayısıya ait 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri olan sırasıyla 79.97, 63.05 ve 52.31 mg/mL; Hacıhaliloğlu Kükürtlü kayısıya ait 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri olan sırasıyla 110.11, 104.38 ve 79.55 mg/mL; Kabaası Gün Kurusu kayısıya ait 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri olan sırasıyla 74.94, 63.56 ve 50.03 mg/mL; Kabaası Kükürtlü kayısıya ait 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri olan sırasıyla 117.77, 100.92 ve 69.57 mg/mL konsantrasyonlarının uygulandığı HCT116 hücre hattındaki hücrelerde ölümlerin olması nedeniyle neredeyse ekilen hücrelerin yarısı öldüğü için ölmek üzere olan hücreler de etidyum bromür ile kırmızıya ve kalan canlı hücreler ise akridin turuncusu ile yeşil renge boyanmıştır. Ayrıca, bu boyama yönteminde uygulanan konsantrasyonlar hücrelerin yarısını öldüren IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri olduğundan floresans mikroskopla çekilen akridin turuncusu ve etidyum bromür boyama testi fotoğrafları, MTT testi sonucunda invert mikroskopla çekilen hücre görüntüleriyle tamamen tutarlı olarak saptanmıştır. Buna ilaveten, hücrelere endoplazmik retikulum stresi oluşturmak amacıyla uygulanan 1 µM Thapsigargin %50'den daha fazla hücre ölümü meydana getirmediğinden bu konsantrasyonun diğer deneylerde kullanılabileceği hem invert mikroskopla çekilen

hücre görüntülerinden hem de akridin turuncusu ve etidyum bromür boyama testi fotoğraflarından anlaşılmıştır.

Kayısıların metanol ekstraktlarının HCT116 hücreleri üzerindeki hücre göçüne etkilerini gözlemleyebilmek için yara iyileşme testi yapılmıştır. Kayısıların 24 saatlik IC<sub>50</sub> konsantrasyonları yara iyileşme testinde kullanılmıştır. Bu test için herhangi bir ekstrakt uygulanmayan (+) Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 701.00 ± 20.81 µm ve 24. saatte 380.79 ± 15.36 µm olarak ölçülmüştür. 79.97 mg/mL konsantrasyona sahip Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının uygulandığı HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 779.15 ± 2.21 µm ve 24. saatte 735.69 ± 8.03 µm olarak belirlenmiştir. Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değerine ilaveten 1 µM Thapsigargin uyguladığımızda HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 700.50 ± 14.53 µm ve 24. saatte 409.52 ± 21.81 µm olarak bulunmuştur. 110.11 mg/mL konsantrasyona sahip Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının uygulandığı HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 561.04 ± 19.96 µm ve 24. saatte 469.60 ± 8.65 µm olarak saptanmıştır. Hacihaliloğlu Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değerine ilaveten 1 µM Thapsigargin uyguladığımızda HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 809.95 ± 8.12 µm ve 24. saatte 788.59 ± 26.59 µm olarak hesaplanmıştır. 74.94 mg/mL konsantrasyona sahip Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının uygulandığı HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 620.22 ± 37.81 µm ve 24. saatte 699.32 ± 40.68 µm olarak ölçülmüştür. Kabaası Gün Kurusu kayısı metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değerine ilaveten 1 µM Thapsigargin uyguladığımızda HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 850.08 ± 33.30 µm ve 24. saatte 841.89 ± 46.55 µm olarak belirlenmiştir. 117.77 mg/mL konsantrasyona sahip Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının uygulandığı HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 517.82 ± 16.85 µm ve 24. saatte 579.79 ± 21.56 µm olarak bulunmuştur. Kabaası Kükürtlü kayısı metanol ekstraktının IC<sub>50</sub> değerine ilaveten 1 µM Thapsigargin uyguladığımızda HCT116 hücresinde yarık aralığı 0. saatte 650.61 ± 9.56 µm ve 24. saatte 624.76 ± 2.90 µm olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda hücre göçü yeteneği yani hücre proliferasyonu azalmasına rağmen, Hacihaliloğlu Gün Kurusu kayısıya Thapsigargin uygulanması diğer gruplara kıyasla hücre göçü yeteneğini ve dolayısıyla da hücre proliferasyonunu fazlasıyla artırıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

HCT116 hücrelerine yönelik ELISA sonuçları incelendiğinde, ATF6 proteini açısından HCT116 Kontrol grubu diğer tüm gruplardan ortalama olarak daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Ayrıca, HCT116 + Hacihaliloğlu Gün Kurusu + Thapsigargin diğer

gruplarla kıyaslandığında ATF6 proteini bakımından anlamlıdır. Elde edilen ELISA sonuçlarından, HCT116 hücrelerinde CHOP proteinine rastlanmamıştır. Endoplazmik retikulum stresinde bir başka yolda yer alan XBP1 proteini açısından ise HCT116 Kontrol grubu diğer tüm gruplardan çok daha yüksek değerlerde saptanmıştır ( $p<0.05$ ). HCT116 + Hacıhaliloğlu Kükürtlü grubu, HCT116 + Kabaası Gün Kuru + Thapsigargin haricindeki diğer tüm gruplarla kıyaslandığında XBP1 bakımından aralarında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ )

Bu tez çalışmamızda, Hacıhaliloğlu ve Kabaası kayısı çeşitlerine ait gün kuru ve kükürtlenmiş metanol ekstraktlarının yüzde inhibisyon sonuçlarına göre MCF-7 ve HCT116 hücre hatlarında antikanser aktivite gösterdikleri ve ayrıca hücre göçü testlerinden elde edilen verilere göre antimetastatik etki sergiledikleri belirlenmiştir. Ayrıca, akridin turuncusu ve etidyum bromür boya karışımı uygulanarak hücre ölümleri gözlemlenmiştir. Çok daha spesifik olarak, endoplazmik retikulum stresine ait farklı yollarda yer alan ATF6, CHOP ve XBP1 proteinlerinin MCF-7 ve HCT116 hücrelerinde ifade edilen miktarlarındaki değişimler ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sonuç olarak, insan sağlığı açısından pek çok faydalı özellikleri olan Malatya yöremize ait kayısıların beslenmemizde sıklıkla yer bulmasının gerekliliği araştırmamızla ortaya konulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Adachi, M., Suzuki, Y., Mizuta, T., Osawa, T., Adachi, T., Osaka, K., Suzuki, K., Shiojima, K., Arai, Y., Masuda, K., Uchiyama, M., Oyamada, T. & Clerici, M.** (2007). The “Prunus mume Sieb. et Zucc” (Ume) is a Rich Natural Source of Novel Anti-Cancer Substance. *Int. J. Food Prop.* 10 (2), 375-384.
- Adams, C.J., Kopp, M.C., Larburu, N., Nowak, P.R. & Ali, M.M.U.** (2019). Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1. *Front. Mol. Biosci.* 6, 11.
- Aguayo-Ortiz, R. & Espinoza-Fonseca, L.M.** (2020). Linking Biochemical and Structural States of SERCA: Achievements, Challenges, and New Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4146.
- Aguissa-Touré, A.H. & Li, G.** (2012). Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (9), 1475–91.
- Akin, E.B., Karabulut, I. & Topcu, A.** (2008). Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Food Chem.* 107, 939-948.
- Ali, S., Masud, T. & Abbasi, K.S.** (2011). Physico-chemical characteristics of apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown in Northern Areas of Pakistan. *Sci. Hortic.* 130, 386-392.
- Andersen, T.B., López, C.Q., Manczak, T., Martinez, K. & Simonsen, H.T.** (2015). Thapsigargin—From *Thapsia* L. to mipsagargin. *Molecules.* 20, 6113–6127.
- Andrews, S.P., Ball, M., Wierschem, F., Cleator, E., Oliver, S., Högenauer, K., Simic, O., Antonello, A., Hüniger, U., Smith, M.D. & Ley, S. V.** (2007). Total synthesis of five thapsigargins: Guaianolide natural products exhibiting sub-nanomolar SERCA inhibition. *Chemistry.* 13, 5688–5712.
- Arnal, M., Solary, E., Brunet-Lecomte, P. & Lizard-Nacol, S.** (1999). Expression of the gadd153 gene in normal and tumor breast tissues by a sensitive RT-PCR method. *Int. J. Mol. Med.* 4, 545–48.
- Bailly-Maitre, B., Fondevila, C., Kaldas, F., Droin, N., Luciano, F., Ricci, J.E., Croxton, R., Krajewska, M., Zapata, J.M., Kupiec-Weglinski, J.W., Farmer, D. & Reed, J.C.** (2006). Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2809–14.
- Ball, M., Andrews, S.P., Wierschem, F., Cleator, E., Smith, M.D. & Ley, S.V.** (2007). Total synthesis of thapsigargin, a potent SERCA pump inhibitor. *Org. Lett.* 9, 663–666.
- Baltzis, D., Qu, L.K., Papadopoulou, S., Blais, J.D., Bell, J.C., Sonenberg, N. & Koromilas, A.E.** (2004). Resistance to vesicular stomatitis virüs infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2-kinases PERK and PKR. *J. Virol.* 78, 12747–61.

- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L.** (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (7), 517-29.
- Berson, E.L.** (1993). Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture Invest. *Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 1659-76.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B. & Ron, D.** (2001). Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107 (5), 585-93.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. & Ron, D.** (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2 (6), 326-32.
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B.G. & Koumenis, C.** (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* 24, 3470-81.
- Blais, J.D., Addison, C.L., Edge, R., Falls, T., Zhao, H., Wary, K., Koumenis, C., Harding, H.P., Ron, D., Holcik, M. & Bell, J.C.** (2006). Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* 26 (24), 9517-32.
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D. & Yuan, J.** (2005). A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science.* 307, 935-39.
- Bramley, P.M.** (2003). In I. Johnson & G. P. Williamson (Eds.), Phytochemical functional foods. *Boca Raton: CRC Press.*
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., Quest, A.F.G. & Lavandero, S.** (2013). Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 301, 215-90.
- Brown, M., Strudwick, N., Suwara, M., Sutcliffe, L.K., Mihai, A.D., Ali, A.A., Watson, J.N. & Schröder, M.** (2016). An initial phase of JNK activation inhibits cell death early in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Cell Sci.* 129, 2317-2328.
- Camppbell, O.E. & Padilla-Zakour, O.I.** (2013). Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Res. Int.* 54, 448-455.
- Cantwell-Dorris, E.R., O'Leary, J.J. & Sheils, O.M.** (2011). BRAF<sup>V600E</sup>: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol. Cancer Ther.* 10 (3), 385-94.

- Cardozo, A.K., Ortis, F., Storling, J., Feng, Y.M., Rasschaert, J., Tonnesen, M., Eylen, F.V., Mandrup-Poulsen, T., Herchuelz, A. & Eizirik, D.L.** (2005). Cytokines down-regulate the sarcoendoplasmic reticulum pump  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*. *54*, 452–61.
- Carrasco, D.R., Sukhdeo, K., Protopopova, M., Sinha, R., Enos, M., Carrasco, D.E., Zheng, M., Mani, M., Henderson, J., Pinkus, G.S., Munshi, N., Horner, J., Ivanova, E.V., Protopopov, A., Anderson, K.C., Tonon, G. & DePinho, R.A.** (2007). The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell*. *11*, 349–60.
- Chemaly, E.R., Troncione, L. & Lebeche, D.** (2018). SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium*. *69*, 46–61.
- Chen, C.Y., Malchus, N.S., Hehn, B., Stelzer, W., Avci, D., Langosch, D. & Lemberg, M.K.** (2014). Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u. *EMBO J*. *33* (21), 2492–506.
- Chen, D. & Evans, P.A.** (2017). A Concise, Efficient and Scalable Total Synthesis of Thapsigargin and Nortrilobolide from (R)-(-)-Carvone. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 6046–6049.
- Chen, L.H., Jiang, C.C., Kiejda, K.A., Wang, Y.F., Thorne, R.F., Zhang, X.D. & Hersey, P.** (2007). Thapsigargin sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 through the unfolded protein response. *Carcinogenesis*. *28*, 2328–2336.
- Chen, X., Shen, J. & Prywes, R.** (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* *277* (15), 13045–52.
- Chevet, E., Hetz, C. & Samali, A.** (2015). Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* *5* (6), 586–97.
- Chidawanyika, T., Sergison, E., Cole, M., Mark, K. & Supattapone, S.** (2018). SEC24A identified as an essential mediator of thapsigargin induced cell death in a genome-wide CRISPR/Cas9 screen. *Cell Death Discov.*, *4*, 115.
- Chou, J. & Roizman, B.** (1994). Herpes simplex virus 1  $\gamma(1)34.5$  gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 5247–51.
- Christensen, S.B. & Norup, E.** (1985). Absolute configurations of the histamine liberating sesquiterpene lactones thapsigargin and trilobolide. *Tetrahedron Lett.* *26*, 107–110.
- Chu, H., Smith, J.M., Felding, J. & Baran, P.S.** (2017). Scalable Synthesis of (-)-Thapsigargin. *ACS Cent. Sci.* *3*, 47–51.

- Clapham, D.E.** (2007). Calcium signaling. *Cell*. 131 (6), 1047-58.
- Cnop, M., Ladriere, L., Hekerman, P., Ortis, F., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Flamez, D., Boyce, M., Yuan, J. & Eizirik, D.L.** (2007). Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282, 3989–97.
- Coen, P.M. & Goodpaster, B.H.** (2012). Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends. Endocrinol. Metab.* 23 (8), 391-8.
- Corazzari, M.** (2013). ER stress & autophagy in cancer: contenders or partners in crime? *Int. J. Mol. Biol. Biochem.* 1 (1), 23–38.
- Corazzari, M., Rapino, F., Ciccocanti, F., Giglio, P., Antonioli, M., Conti, B., Fimia, G.M., Lovat, P.E. & Piacentini, M.** (2015). Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death Differ.* 22 (6), 946–58.
- Cullinan, S.B. & Diehl, J.A.** (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 279 (19), 20108-17.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J. & Diehl, J.A.** (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. and Cell. Biol.* 23 (20), 7198-209.
- Crestey, F., Toma, M. & Christensen, S.B.** (2015). Concise synthesis of thapsigargin from nortrilobolide. *Tetrahedron Lett.* 56, 5896–5898.
- Dai, B.H., Geng, L., Wang, Y., Sui, C.J., Xie, F., Shen, R.X., Shen, W.F. & Yanget, J.M.** (2013). microRNA-199a-5p protects hepatocytes from bile acid-induced sustained endoplasmic reticulum stress. *Cell Death & Dis.* 4, e604.
- Das, A., Rui, H., Nakamoto, R. & Roux, B.** (2017). Conformational Transitions and Alternating-Access Mechanism in the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump. *J Mol. Biol.* 429, 647–666.
- Davies, S.E., Portmann, B.C., O'Grady, J.G., Aldis, P.M., Chaggar, K., Alexander, G.J. & Williams, R.** (1991). Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology.* 13, 150–57.
- Delepine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M. & Julier, C.** (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2- $\beta$  kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet.* 25, 406–9.
- Dever, T.E.** (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell.* 108 (4), 545-56.

- Dey, S. & Bajaj, S.O.** (2018). Promising anticancer drug thapsigargin: A perspective toward the total synthesis. *Synth. Commun.*, 48, 1–13.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. & Gore, A.C.** (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30 (4), 293-342.
- Dimcheff, D.E., Askovic, S., Baker, A.H., Johnson-Fowler, C. & Portis, J.L.** (2003). Endoplasmic reticulum stress is a determinant of retrovirus-induced spongiform neurodegeneration. *J. Virol.* 77, 12617–29.
- Dimcheff, D.E., Faasse, M.A., McAtee, F.J. & Portis, J.L.** (2004). Endoplasmic reticulum (ER) stress induced by a neurovirulent mouse retrovirus is associated with prolonged BiP binding and retention of a viral protein in the ER. *J. Biol. Chem.* 279, 33782–90.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N. & Montminy, M.** (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science.* 300, 1574–77.
- Dubois, C., Vanden Abeele, F., Sehgal, P., Olesen, C., Junker, S., Christensen, S.B., Prevarskaya, N. & Møller, J.V.** (2013). Differential effects of thapsigargin analogues on apoptosis of prostate cancer cells: Complex regulation by intracellular calcium. *FEBS J.* 280, 5430–5440.
- Dufey, E., Sepúlveda, D., Rojas-Rivera, D. & Hetz, C.** (2014). Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307 (7), C582-94.
- Enomoto, S., Yanaoka, K., Utsunomiya, H., Niwa, T., Inada, K., Deguchi, H., Ueda, K., Mukoubayashi, C., Inoue, I., Maekita, T., Nakazawa, K., Iguchi, M., Tamai, H., Fujishiro, M., Oka, M. & Ichinose, M.** (2010). Inhibitory effects of Japanese Apricot, (*Prunus Mume* Siebold ET Zucc.; Ume), on *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 478.
- Esposito, L., Gan, L., Yu, G.Q., Essrich, C. & Mucke, L.** (2004). Intracellularly generated amyloid- $\beta$  peptide counteracts the antiapoptotic function of its precursor protein and primes proapoptotic pathways for activation by other insults in neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 91, 1260–74.
- Fels, D.R. & Koumenis, C.** (2006). The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol. Ther.* 5 (7), 723–8.
- Ferreiro, E., Resende, R., Costa, R., Oliveira, C.R. & Pereira, C.M.** (2006). An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid- $\beta$  peptides neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 23, 669–78.
- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphaël, M., Vandenberghe, M., Abeele, F.V., Roudbaraki, M., Lepage, G., Mauroy, B., Romanin, C., Shuba, Y., Skryma, R. & Prevarskaya, N.** (2010). Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* 1, e75.

- Fonseca, S.G., Fukuma, M., Lipson, K.L., Nguyen, L.X., Allen, J.R., Oka, Y. & Urano, F.** (2005). WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 280, 39609–15.
- Foo, N.C., Ahn, B.Y., Ma, X., Hyun, W. & Yen, T.S.** (2002). Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology.* 36, 1400–7.
- Forus, A., Florenes, V.A., Maelandsmo, G.M., Fodstad, O. & Myklebost, O.** (1994). The pro-tooncogene CHOP/GADD153, involved in growth arrest and DNA damage response, is amplified in a subset of human sarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 78, 165–71.
- Friedman, J.M. & Halaas, J.L.** (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395 (6704), 763-70.
- Garg, A.D., Maes, H., van Vliet, A.R. & Agostinis, P.** (2014). Targeting the hallmarks of cancer with therapy-induced endoplasmic reticulum (ER) stress. *Mol. Cell. Oncol.* 2 (1), e975089.
- Giglio, P., Fimia, G.M., Lovat, P.E., Piacentini, M. & Corazzari, M.** (2015). Fateful music from a talented orchestra with a wicked conductor: connection between oncogenic BRAF, ER stress, and autophagy in human melanoma. *Mol Cell Oncol.* 2 (3), e995016.
- Glimcher, L.H.** (2010). XBP1: the last two decades. *Ann. Rheum. Dis.* 69 Suppl 1, i67-71.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E.E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D.P., Louis, D.N., Goldstraw, P., Nicholson, A.G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B.L., Chiew, Y.E., deFazio, A., Greaves, M.F., Green, A.R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D.F., Chenevix-Trench, G., Tan, M.H., Khoo, S.K., Teh, B.T., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Wooster, R., Futreal, P.A. & Stratton, M.R.** (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature.* 446 (7132), 153–8.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y.H., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. & Ron, D.** (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* 6 (5), 1099-108.
- Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D. & Ron, D.** (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell.* 7 (6), 1153-1163.

- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D.** (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.* 5 (5), 897-904.
- Harding, H.P., Zhang, Y. & Ron, D.** (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 397 (6716), 271-4.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. & Ron, D.** (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* 11, 619–33.
- Hatahet, F. & Ruddock, L.W.** (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal.* 11 (11), 2807-50.
- Hersey, P. & Zhang, X.D.** (2008). Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21 (3), 358–67.
- Hettmann, T., Barton, K. & Leiden, J.M.** (2000). Microphthalmia due to p53-mediated apoptosis of anterior lens epithelial cells in mice lacking the CREB-2 transcription factor. *Dev Biol.* 222, 110–123.
- Hetz, C.** (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2), 89-102.
- Hetz, C., Chevet, E. & Oakes, S.A.** (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* 17, 829–838.
- Hetz, C. & Papa, F.R.** (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell.* 69, 169–181.
- Hinnebusch, A.G. & Lorsch, J.R.** (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. in Biol.* 4 (10).
- Hino, S., Kondo, S., Yoshinaga, K., Saito, A., Murakami, T., Kanemoto, S., Sekiya, H., Chihara, K., Aikawa, Y., Hara, H., Kudo, T., Sekimoto, T., Funamoto, T., Chosa, E. & Imaizumi, K.** (2010). Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 28 (2), 131-138.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. & Tohyama, M.** (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A $\beta$ -induced cell death. *J. Cell. Biol.* 165, 347–56.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. & Weissman, J.S.** (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The J. of Cell Biol.* 186 (3), 323-31.

- Hoozemans, J.J., Veerhuis, R., Van Haastert, E.S., Rozemuller, J.M., Baas, F., Eikelenboom, P. & Scheper, W.** (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 110, 165–72.
- Hosoi, T., Sasaki, M., Miyahara, T., Hashimoto, C., Matsuo, S., Yoshii, M. & Ozawa, K.** (2008). Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol. Pharmacol.* 74 (6), 1610-9.
- Hotamisligil, G.S.** (2005). Role of endoplasmic reticulum stress and c-jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes.* 54 (Suppl 2), S73-8.
- Huang, Z.M., Tan, T., Yoshida, H., Mori, K., Ma, Y. & Yen, T.S.B.** (2005). Activation of hepatitis B virus S promoter by a cell type-restricted IRE1-dependent pathway induced by endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7522–33.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y. & Permutt, M.A.** (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat. Genet.* 20, 143–48.
- Iqbal, J., Dai, K., Seimon, T., Jungreis, R., Oyadomari, M., Kuriakose, G., Ron, D., Tabas, I. & Hussain, M.M.** (2008). IRE1beta inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. *Cell Metab.* 7, 445–455.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y. & Oka, Y.** (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive  $\beta$ -cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1159–70.
- Isler, J.A., Skalet, A.H. & Alwine, J.C.** (2005). Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J. Virol.* 79, 6890–99.
- Iurlaro, R. & Muñoz-Pinedo, C.** (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 283, 2640–2652.
- Iwawaki, T., Akai, R. & Kohno, K.** (2010). IRE1 disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level. *PLoS One.* 5, e13052.
- Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S. & Kohno, K.** (2009). Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (39), 16657-62.
- Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A. & Kohno, K.** (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat. Cell Biol.* 3 (2), 158-64.

- Jamora, C., Dennert, G. & Lee, A.S.** (1996). Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 7690–94.
- Jiang, D., Niwa, M. & Koong, A.C.** (2015). Targeting the IRE1 $\alpha$ -XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. *Semin. Cancer Biol.* *33*, 48–56.
- Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T.M., Block, T.M. & Romano, P.R.** (2002). Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J. Virol.* *76*, 9588–99.
- Kadowaki, H., Nishitoh, H., Urano, F., Sadamitsu, C., Matsuzawa, A., Takeda, K., Masutani, H., Yodoi, J., Urano, Y., Nagano, T. & Ichijo, H.** (2005). Amyloid  $\beta$  induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ.* *12*, 19–24.
- Karagöz, G.E., Acosta-Alvear, D. & Walter, P.** (2019). The Unfolded Protein Response: Detecting and Responding to Fluctuations in the Protein-Folding Capacity of the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *11*, a033886.
- Kaushal, S. & Khorana, H.G.** (1994). Structure and function in rhodopsin 7 Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Biochemistry.* *33*, 6121–28.
- Kharroubi, I., Ladriere, L., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Cnop, M. & Eizirik, D.L.** (2004). Free fatty acids and cytokines induce pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology.* *145*, 5087–96.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M. & Kohno, K.** (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J. Cell Biol.* *179* (1), 75–86.
- Koge, D., Schomburg, R., Schurmann, T., Reimertz, C., König, H.G., Poppe, M., Eckert, A., Müller, W.E. & Prehn, J.H.M.** (2003). The amyloid precursor protein protects PC12 cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Neurochem.* *87*, 248–56.
- Koo, E.H. & Kopan, R.** (2004). Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nat. Med.* *10* (Suppl), S26–33.
- Koumenis, C.** (2006). ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Curr. Mol. Med.* *6*, 55–69.
- Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A. & Wouters, B.G.** (2002). Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . *Mol. Cell Biol.* *22*, 7405–16.

- Krebs, J., Agellon, L.B. & Michalak, M.** (2015) Ca<sup>(2+)</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: an integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460 (1), 114-21.
- Kurus, M., Ugras, M., Ates, B. & Otlu, A.** (2009). Apricot ameliorates alcohol induced testicular damage in rat model. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2666-2672.
- Lam, M., Lawrence, D.A., Ashkenazi, A. & Walter, P.** (2018). Confirming a critical role for death receptor 5 and caspase-8 in apoptosis induction by endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 25, 1530–1531.
- Lange, P.S., Chavez, J.C., Pinto, J.T., Coppola, G., Sun, C.W., Townes, T.M., Geschwind, D.H. & Ratan, R.R.** (2008). ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 205, 1227–1242.
- Lau, J.Y., Bain, V.G., Davies, S.E., O'Grady, J.G., Alberti, A., Alexander, G.J., Williams, R.** (1992). High-level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology.* 102, 956–62.
- Laybutt, D.R., Preston, A.M., Akerfeldt, M.C., Kench, J.G., Busch, A.K., Biankin, A.V. & Biden, T.J.** (2007). Endoplasmic reticulum stress contributes to  $\beta$  cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 1, 1.
- Leccese, A., Bartolini, S. & Viti, R.** (2007). Total Antioxidant Capacity and Phenolics Content in Apricot Fruits. *Int. J. Fruit Sci.* 7 (2), 3-16.
- Lee, A.H., Chu, G.C., Iwakoshi, N.N. & Glimcher, L.H.** (2005). XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J.* 24, 4368–80.
- Lee, A.H., Heidtman, K., Hotamisligil, G.S. & Glimcher, L.H.** (2011). Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 $\alpha$  and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108, 8885–8890.
- Lee, A.H., Scapa, E.F., Cohen, D.E. & Glimcher, L.H.** (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science.* 320, 1492–1496.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. & Kaufman, R.J.** (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 16 (4), 452-66.
- Leissring, M.A., Akbari, Y., Fanger, C.M., Cahalan, M.D., Mattson, M.P. & LaFerla, F.M.** (2000). Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J. Cell. Biol.* 149, 793–98.

- Leroux, L., Desbois, P., Lamotte, L., Duvillie, B., Cordonnier, N., Jackerott, M., Jami, J., Bucchini, D. & Joshi, R.L.** (2001). Compensatory responses in mice carrying a null mutation for Ins1 or Ins2. *Diabetes*. *50*, S150–53.
- Liberman, E., Fong, Y.L., Selby, M.J., Choo, Q.L., Cousens, L., Houghton, M. & Yen, T.S.** (1999). Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Virol.* *73*, 3718–22.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., LaVail, M.M. & Walter, P.** (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*. *318* (5852), 944–9.
- Lindner, P., Christensen, S.B., Nissen, P., Møller, J.V. & Engedal, N.** (2020). Cell death induced by the ER stressor thapsigargin involves death receptor 5, a non-autophagic function of MAP1LC3B, and distinct contributions from unfolded protein response components. *Cell Commun. Signal.* *18*, 12–23.
- Lipson, K.L., Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Nguyen, L.X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A.A. & Urano, F.** (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic  $\beta$  cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab.* *4*, 245–54.
- Liu, J., Xiao, M., Li, J., Wang, D., He, Y., He, J., Gao, F., Mai, L., Li, Y., Liang, Y., Liu, Y. & Zhong, X.** (2017). Activation of UPR signaling pathway is associated with the malignant progression and poor prognosis in prostate cancer. *Prostate*. *77* (3), 274–81.
- Liu, M.Q., Chen, Z. & Chen, L.X.** (2016). Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* *37* (4), 425–43.
- Liu, N., Scofield, V.L., Qiang, W., Yan, M., Kuang, X. & Wong, P.K.Y.** (2006). Interaction between endoplasmic reticulum stress and caspase 8 activation in retrovirus MoMuLV-ts1-infected astrocytes. *Virology*. *348*, 398–405.
- Liu, W., Zhu, X., Wang, Q. & Wang, L.** (2013). Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts. *Exp. Ther. Med.* *5* (5), 1289–1292.
- Liu, X., Garriga, P. & Khorana, H.G.** (1996). Structure and function in rhodopsin: correct folding and misfolding in two point mutants in the intradiscal domain of rhodopsin identified in retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4554–59.
- Logue, S.E., Cleary, P., Saveljeva, S. & Samali, A.** (2013). New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis*. *18* (5), 537–46.
- Lu, M., Lawrence, D.A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimmig, P., Mendez, A.S., Paton, A.W., Paton, J.C., Walter, P. & Ashkenazi, A.** (2014). Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*. *345*, 98–101.

- Lu, P.D., Jousse, C., Marciniak, S.J., Zhang, Y., Novoa, I., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D. & Harding, H.P.** (2004). Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J.* 23, 169–79.
- Lynch, J.M., Maillet, M., Vanhoutte, D., Schloemer, A., Sargent, M.A., Blair, N.S., Lynch, K.A., Okada, T., Aronow, B.J., Osinska, H., Prywes, R., Lorenz, J.N., Mori, K., Lawler, J., Robbins, J. & Molkenin, J.D.** (2012). A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell.* 149 (6), 1257–68.
- Lytton, J., Westlin, M. & Hanley, M.R.** (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 266, 17067–17071.
- Ma, Z., Fan, C., Yang, Y., Di, S., Hu, W., Li, T., Zhu, Y., Han, J., Xin, Z., Wu, G., Zhao, J., Li, X. & Yan, X.** (2016). Thapsigargin sensitizes human esophageal cancer to TRAIL-induced apoptosis via AMPK activation. *Sci. Rep.* 6, 35196.
- Makunga, N.P., Jäger, A.K. & van Staden, J.** (2006). Improved in vitro rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 86, 77–86.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P. & Ron, D.** (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18 (24), 3066–77.
- Martino, M.B., Jones, L., Brighton, B., Ehre, C., Abdulah, L., Davis, C.W., Ron, D., O’Neal, W.K. & Ribeiro, C.M.** (2013). The ER stress transducer IRE1beta is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol.* 6, 639–654.
- Masuoka, H.C. & Townes, T.M.** (2002). Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood.* 99 (3), 736–45.
- Maurel, M. & Chevet, E.** (2013). Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am. J. of Physiol.-Cell Physiol.* 304 (12), C1117–26.
- Mayerhofer, T. & Kodym, R.** (2003). Gadd153 restores resistance to radiation-induced apoptosis after thiol depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 115–20.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y. & Holbrook, N.J.** (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 21 (4), 1249–59.
- Meex, S.J.R., van Greevenbroek, M.M.J., Ayoubi, T.A., Vlietinck, R., van Vliet-Ostaptchouk, J.V., Hofker, M.H., Vermeulen, V.M.M.-J., Schalkwijk, C.G., Feskens, E.J.M., Boer, J.M.A., Stehouwer, C.D.A., van der Kallen, C.J.H. & de Bruin, T.W.A.** (2007). Activating transcription factor 6 polymorphisms and haplotypes are associated with impaired glucose homeostasis and type 2 diabetes in Dutch Caucasians. *J Clin Endocrinol Metabol.* 92, 2720–25.

- Meuleman, P., Libbrecht, L., Wieland, S., DeVos, R., Habib, N., Kramvis, A., Roskams, T. & Leroux-Roels, G.** (2006). Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *J. Virol.* 80, 2797–807.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. & Sommer, T.** (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 7 (8), 766-72.
- Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K. & Opas, M.** (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 344 Pt 2, 281-92.
- Michelangeli, F. & East, J.M.** (2011). A diversity of SERCA Ca<sup>2+</sup> pump inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 789–797.
- Minchenko, D.O., Kharkova, A.P., Tsymbal, D.O., Karbovskiy, L.L. & Minchenko, O.H.** (2015). IRE1 inhibition affects the expression of insulin-like growth factor binding protein genes and modifies its sensitivity to glucose deprivation in U87 glioma cells. *Endocr Regul.* 49 (4), 185-97.
- Moslehi, A., Komeili-movahed, T. & Moslehi, M.** (2019). Antioxidant effects of amygdalin on tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in the mice liver: Cross talk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences.* 2 (8), 298-302.
- Mulvey, M., Arias, C. & Mohr, I.** (2007). Maintenance of ER homeostasis in HSV-1 infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER-stress sensor. *J. Virol.* 17, 17.
- Muñoz-Pinedo, C. & López-Rivas, A.** (2018). A role for caspase-8 and TRAIL-R2/DR5 in ER-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 25, 226.
- Naidoo, N.** (2009). ER and aging-protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev.* 8 (3), 150-9.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. & Yuan, J.** (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature.* 403, 98–103.
- Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T., Ozawa, K., Ogawa, S., Hori, M., Yamasaki, Y. & Matsuhisa, M.** (2005). Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem.* 280, 847–51.
- Nazi, C., Chao, J. & Xiaokun, L.** (2016). Endoplasmic reticulum stress and disease. *China Biotechnology.* 36 (01), 76-85.
- Netherton, C.L., Parsley, J.C. & Wileman, T.** (2004). African swine fever virus inhibits induction of the stress-induced proapoptotic transcription factor CHOP/GADD153. *J. Virol.* 78, 10825–28.

- Newbold, R.R.** (2010). Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)*. 9 (3), 206-17.
- Ng, D.T., Watowich, S.S. & Lamb, R.A.** (1992). Analysis in vivo of GRP78-BiP/substrate interactions and their role in induction of the GRP78-BiP gene. *Mol Biol Cell*. 3 (2), 143-55.
- Oakes, S.A., Lin, S.S. & Bassik, M.C.** (2006). The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr. Mol. Med.* 6, 99–109.
- Oakes, S.A. & Papa, F.R.** (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu. Rev. Pathol.* 10, 173–194.
- Okada, T., Sawada, T., Osawa, T., Adachi, M. & Kubota, K.** (2008). MK615 inhibits pancreatic cancer cell growth by dual inhibition of Aurora A and B kinases. *World J. Gastroenterol.* 14 (9), 1378-1382.
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E. & Mori, M.** (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 525–32.
- Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E. & Mori, M.** (2001). Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$  cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 98, 10845–50.
- Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Jr, M.G.M. & Ozcan, U.** (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 9 (1), 35-51.
- Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H. & Hotamisligil, G.S.** (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 306 (5695), 457–61.
- Özcan, U., Yilmaz, E., Özcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z. & Hotamisligil, G.S.** (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 313, 1137–40.
- Palam, L.R., Baird, T.D. & Wek, R.C.** (2011). Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J. Biol. Chem.* 286 (13), 10939-49.
- Parlakpınar, H., Olmez, E., Acet, A., Ozturk, F., Tasdemir, S., Ates, B., Gul, M. & Otlu, A.** (2009). Beneficial effects of apricot-feeding on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 802-808.
- Patil, C. & Walter, P.** (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 13 (3), 349-55.

- Pavio, N., Romano, P.R., Graczyk, T.M., Feinstone, S.M. & Taylor, D.R.** (2003). Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2 kinase PERK. *J. Virol.* 77, 3578–85.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. & Collins, F.** (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 269 (5223), 540-3.
- Pereira, E.R., Frudd, K., Awad, W. & Hendershot, L.M.** (2014). Endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia response pathways interact to potentiate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcriptional activity on targets like vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Biol. Chem.* 289 (6), 3352–64.
- Perkins, D.J. & Barber, G.N.** (2004). Defects in translational regulation mediated by the sub-unit of eukaryotic initiation factor 2 inhibit antiviral activity and facilitate the malignant transformation of human fibroblasts. *Mol. and Cell. Biol.* 24, 2025–40.
- Peterková, L., Kmoníčková, E., Ruml, T. & Rimpelová, S.** (2020). Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase Inhibitors: Beyond Anticancer Perspective. *J. Med. Chem.* 63, 1937–1963.
- Pluquet, O., Qu, L.K., Baltzis, D. & Koromilas, A.E.** (2005). Endoplasmic reticulum stress accelerates p53 degradation by the cooperative actions of Hdm2 and glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Mol. Cell. Biol.* 25, 9392–405.
- Primeau, J.O., Armanious, G.P., Fisher, M.E. & Young, H.S.** (2018). The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Subcell Biochem.* 87, 229–258.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. & Strasser, A.** (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 129 (7), 1337-49.
- Qi, L., Tsai, B. & Arvan, P.** (2017). New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends Cell Biol.* 27, 430–440.
- Rahate, K., Bhatt, L.K. & Prabhavalkar, K.S.** (2020). SERCA stimulation: A potential approach in therapeutics. *Chem Biol Drug Des.* 95, 5–15.
- Ranganathan, A.C., Adam, A.P., Zhang, L. & Aguirre-Ghiso, J.A.** (2006). Tumor cell dormancy induced by p38SAPK and ER-stress signaling: an adaptive advantage for metastatic cells? *Cancer Biol. Ther.* 5 (7), 729–35.
- Ranganathan, A.C., Zhang, L., Adam, A.P. & Aguirre-Ghiso, J.A.** (2006). Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res.* 66 (3), 1702–11.

- Rasmussen, U., Christensen, S.B. & Sandberg, F.** (1978). Thapsigargin and thapsigarginic acid, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm. Suec.* 15, 133–140.
- Reimold, A.M., Etkin, A., Clauss, I., Perkins, A., Friend, D.S., Zhang, J., Horton, H.F., Scott, A., Orkin, S.H., Byrne, M.C., Grusby, M.J. & Glimcher, L.H.** (2000). An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* 14 (2), 152-7.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F. & Glimcher, L.H.** (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* 412, 300–7.
- Riggs, A.C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R.E., Herrera, P.L. & Permutt, M.A.** (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet  $\beta$  cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia.* 48, 2313–21.
- Rivera, J., Abrams, C., Hernaez, B., Alcazar, A., Escibano, J.M., Dixon, L. & Alonso, C.** (2007). The MyD116 African swine fever virus homologue interacts with the catalytic subunit of protein phosphatase 1 and activates its phosphatase activity. *J. Virol.* 81, 2923–29.
- Romero-Ramirez, L., Cao, H., Nelson, D., Hammond, E., Lee, A.H., Yoshida, H., Mori, K., Glimcher, L.H., Denko, N.C., Giaccia, A.J., Le, Q.T. & Koong, A.C.** (2004). XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* 64 (17), 5943–7.
- Ron, D.** (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* 110 (10), 1383-8.
- Ron, D. & Hubbard, S.R.** (2008). How IRE1 reacts to ER stress. *Cell.* 132 (1), 24-6.
- Ron, D. & Walter, P.** (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (7), 519-29.
- Roussos, P.A., Denaxa, N-K., Tsafouros, A., Efstathios, N. & Intidhar, B.** (2016). Nutritional Composition of Fruit Cultivars. *Academic Press.* 19-48.
- Roybal, C.N., Yang, S., Sun, C.W., Hurtado, D., Vander Jagt, D.L., Townes, T.M. & Abcouwer, S.F.** (2004). Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J. Biol. Chem.* 279 (15), 14844-52.
- Ryoo, H.D., Domingos, P.M., Kang, M.J., Steller, H.** (2007). Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J.* 26, 242–52.

- Sagara, Y. & Inesi, G.** (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.*, 266, 13503–13506.
- Sagara, Y., Wade, J.B. & Inesi, G.** (1992). A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum ATPase with thapsigargin. *J. Biol. Chem.* 267, 1286–1292.
- Samtleben, S., Jaepel, J., Fecher, C., Andreska, T., Rehberg, M. & Blum, R.** (2013). Direct imaging of ER calcium with targeted-esterase induced dye loading (TED). *J. Vis. Exp.* (75), e50317.
- Sano, R. & Reed, J.C.** (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1833 (12), 3460-70.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. & Seubert, P.** (1999). Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 400, 173–77.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S. & Kaufman, R.J.** (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.* 7, 1165–76.
- Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C. & Kaufman, R.J.** (2005). Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in  $\beta$  cells and maintains glucose homeostasis. *Nat. Med.* 11, 757–64.
- Schwarz, D.S. & Blower, M.D.** (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. and Mol. Life Sci.* 73 (1), 79-94.
- Sehgal, P., Szalai, P., Olesen, C., Praetorius, H.A., Nissen, P., Christensen, S.B., Engedal, N. & Møller, J.V.** (2017). Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER  $\text{Ca}^{2+}$  depletion and the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 292, 19656–19673.
- Selkoe, D.J.** (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–66.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H. & Staudt, L.M.** (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity.* 21, 81–93.

- Shi, Y.G., Vattem, K.M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L. & Wek, R.C.** (1998). Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. and Cell. Biol.* 18 (12), 7499-509.
- Shiu, R.P., Pouyssegur, J. & Pastan, I.** (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (9), 3840-4.
- Shuda, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Tanaka, K., Okada, T., Mori, K., Hada, A., Arai, M., Wakatsuki, T., Matsubara, O., Yamamoto, N. & Yamamoto, M.** (2003). Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* 38 (5), 605-14.
- Smith, J.A., Schmechel, S.C., Raghavan, A., Abelson, M., Reilly, C., Katze, M.G., Kaufman, R.J., Bohjanen, P.R. & Schiff, L.A.** (2006). Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* 80, 2019-33.
- Smitt, U.W. & Christensen, S.B.** (1991). Nortrilobolide, a new potent guaianolide secretagogue from *Thapsia garganica*. *Planta Med.* 57, 196-197.
- Sohocki, M.M., Daiger, S.P., Bowne, S.J., Rodriquez, J.A., Northrup, H., Heckenlively, J.R., Birch, D.G., Mintz-Hittner, H., Ruiz, R.S., Lewis, R.A., Saperstein, D.A. & Sullivan, L.S.** (2001). Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum. Mutat.* 17, 42-51.
- Southwood, C.M., Garbern, J., Jiang, W. & Gow, A.** (2002). The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron.* 36, 585-96.
- Spiotto, M.T., Banh, A., Papandreou, I., Cao, H., Galvez, M.G., Gurtner, G.C., Denko, N.C., Le, Q.T. & Koong, A.C.** (2010). Imaging the unfolded protein response in primary tumors reveals microenvironments with metabolic variations that predict tumor growth. *Cancer Res.* 70 (1), 78-88.
- Strom, T.M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K.D. & Meitinger, T.** (1998). Diabetes in-sipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum. Mol. Genet.* 7, 2021-28.
- Su, H.L., Liao, C.L. & Lin, Y.L.** (2002). Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J. Virol.* 76, 4162-71.
- Sung, C.H., Schneider, B.G., Agarwal, N., Papermaster, D.S. & Nathans, J.** (1991). Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8840-44.

- Szalai, P., Parys, J.B., Bultynck, G., Christensen, S.B., Nissen, P., Møller, J.V. & Engedal, N.** (2018). Nonlinear relationship between ER Ca<sup>2+</sup> depletion versus induction of the unfolded protein response, autophagy inhibition, and cell death. *Cell Calcium*. 76, 48–61.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. & Samali, A.** (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7 (9), 880-5.
- Tadini-Buoninsegni, F., Smeazzetto, S., Gualdani, R. & Moncelli, M.R.** (2018). Drug Interactions With the Ca<sup>2+</sup>-ATPase From Sarco(Endo) Plasmic Reticulum (SERCA). *Front. Mol. Biosci.* 5, 36.
- Tandon, A. & Fraser, P.** (2002). The presenilins. *Genome Biol.* 3, 3014–20.
- Tardif, K.D., Mori, K., Kaufman, R.J. & Siddiqui, A.** (2004). Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 279, 17158–64.
- Thameem, F., Farook, V.S., Bogardus, C. & Prochazka, M.** (2006). Association of amino acid variants in the activating transcription factor 6 gene (ATF6) on 1q21-q23 with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes.* 55, 839–42.
- Ting, J. & Lee, A.S.** (1988). Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *DNA.* 7 (4), 275-86.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A. & Kaufman, R.J.** (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12 (12), 1812-24.
- Tirosh, B., Iwakoshi, N.N., Lilley, B.N., Lee, A.H., Glimcher, L.H. & Ploegh, H.L.** (2005). Human cytomegalovirus protein US11 provokes an unfolded protein response that may facilitate the degradation of class I major histocompatibility complex products. *J. Virol.* 79, 2768–79.
- Tohmonda, T., Chiba, K., Toyama, Y. & Horiuchi, K.** (2012). Unfolded protein response mediator.the IRE1a-XBP1 pathway is involved in osteoblast differentiation. *Arthritis Res. & Ther.* 14 (Suppl. 1), 70.
- Tombal, B., Weeraratna, A.T., Denmeade, S.R. & Isaacs, J.T.** (2000). Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells. *Prostate.* 43, 303–317.
- Trinh, M.A., Kaphzan, H., Wek, R.C., Pierre, P., Cavener, D.R. & Klann, E.** (2012). Brain-specific disruption of the eIF2alpha kinase PERK decreases ATF4 expression and impairs behavioral flexibility. *Cell Rep.* 1, 676–688.

- Tsuru, A., Fujimoto, N., Takahashi, S., Saito, M., Nakamura, D., Iwano, M., Iwawaki, T., Kadokura, H., Ron, D. & Kohno, K.** (2013). Negative feedback by IRE1beta optimizes mucin production in goblet cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110, 2864–2869.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.F., Hao, Y.H., Serneels, L., Strooper, B.D., Yu, G. & Bezprozvanny, I.** (2006). Presenilins form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*. 126, 981–93.
- Ueda, K., Kawano, J., Takeda, K., Yujiri, T., Tanabe, K., Anno, T., Akiyama, M., Nozaki, J., Yoshinaga, T., Koizumi, A., Shinoda, K., Oka, Y. & Tanizawa, Y.** (2005). Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells via transcriptional activation. *Eur. J. Endocrinol*. 153, 167–76.
- Unterberger, U., Hoftberger, R., Gelpi, E., Flicker, H., Budka, H. & Voigtländer, T.** (2006). Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 65, 348–57.
- Upton, J.P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F.R. & Oakes, S.A.** (2012). IRE1 $\alpha$  cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic caspase-2. *Science*. 338 (6108), 818-22.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. & Ron, D.** (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 287 (5453), 664-6.
- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D.Y. & Nagata, K.** (2008). ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science*. 321 (5888), 569-72.
- Usui, M., Yamaguchi, S., Tanji, Y., Tominaga, R., Ishigaki, Y., Fukumoto, M., Katagiri, H., Mori, K., Oka, Y. & Ishihara, H.** (2012). Atf6alpha-null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism*. 61, 1118–1128.
- Ünal, M.R.** (2010). Kayısı Araştırma Raporu. T.C. Fırat Kalkınma Ajansı. Malatya.
- Vandewynckel, Y.P., Laukens, D., Bogaerts, E., Paridaens, A., Van den Bussche, A., Verhelst, X., Steenkiste, C.V., Descamps, B., Vanhove, C., Libbrecht, L., Rycke, R.D., Lambrecht, B.N., Geerts, A., Janssens, S. & Vlierberghe, H.V.** (2014). Modulation of the unfolded protein response impedes tumor cell adaptation to proteotoxic stress: a PERK for hepatocellular carcinoma therapy. *Hepatol. Int*. 9 (1), 93–104.
- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ozturk, F., Ates, B., Gul, M., Cetin, A., Erdogan, A. & Otlu, A.** (2008). Potent protective effect of apricot and  $\beta$ -carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food Chem. Toxicol*. 46, 3015-3022.

- Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A.D., Bultynck, G., Rizzuto, R., Decuypere, J.P., Piette, J., Linehan, C., Gupta, S., Samali, A. & Agostinis, P.** (2012). PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 19 (11), 1880-91.
- Walter, P. & Ron, D.** (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 334 (6059), 1081-6.
- Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., Kubo, S.K., Kayo, T., Lu, D., Takata, K., Koizumi, A. & Izumi, T.** (1999). A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in the Mody mouse. *J. Clin. Invest.* 103, 27-37.
- Wang, M. & Kaufman, R.J.** (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature.* 529 (7586), 326-35.
- Wang, M. & Kaufman, R.J.** (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer.* 14, 581-597.
- Ware, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A. & Williams, D.B.** (1995). The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem.* 270 (9), 4697-704.
- Whitley, R.J., Kern, E.R., Chatterjee, S., Chou, J. & Roizman, B.** (1993). Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus  $\gamma$  1 34.5 deletion mutants in rodent models. *J. Clin. Invest.* 91, 2837-43.
- Williams, B.L. & Lipkin, W.I.** (2006). Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with borna disease virus. *J. Virol.* 80, 8613-26.
- Wong, S.H.M., Kong, W.Y., Fang, C.M., Loh, H.S., Chuah, L.H., Abdullah, S. & Ngai, S.C.** (2019). The TRAIL to cancer therapy: Hindrances and potential solutions. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 143, 81-94.
- Wootton, L.L. & Michelangeli, F.** (2006). The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA)  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors. *J. Biol. Chem.* 281, 6970-6976.
- Wu, L., Huang, X., Kuang, Y., Xing, Z., Deng, X. & Luo, Z.** (2019). Thapsigargin induces apoptosis in adrenocortical carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress and the JNK signaling pathway: An in vitro and in vivo study. *Drug Des. Dev. Ther.* 13, 2787-2798.
- Xu, H., Zhou, Y.L., Zhang, X.Y., Lu, P. & Li, G.S.** (2010). Activation of PERK signaling through fluoridemediated endoplasmic reticulum stress in OS732 cells. *Toxicology.* 277 (1-3), 1-5.

- Xu, Z., Jensen, G. & Yen, T.S.** (1997). Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 71, 7387–92.
- Yamaguchi, H. & Wang, H.G.** (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279 (44), 45495-502.
- Yamai, H., Sawada, N., Yoshida, T., Seike, J., Takizawa, H., Kenzaki, K., Miyoshi, T., Kondo, K., Bando, Y., Ohnishi, Y. & Tangoku, A.** (2009). Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *Int. J. Cancer.* 125, 952-960.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. & Mori, K.** (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell.* 13 (3), 365-76.
- Yamamoto, K., Takahara, K., Oyadomari, S., Okada, T., Sato, T., Harada, A. & Mori, K.** (2010). Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. of the Cell.* 21 (17), 2975-86.
- Yoo, A.S., Cheng, I., Chung, S., Grenfell, T.Z., Lee, H., Pack-Chung, E., Handler, M., Shen, J., Xia, W., Tesco, G., Saunders, A.J., Ding, K., Frosch, M.P., Tanzi, R.E. & Kim, T.W.** (2000). Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron.* 27, 561–72.
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K. & Mori, K.** (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell.* 4, 265–71.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K.** (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 107 (7), 881-91.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. & Mori, K.** (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 20 (18), 6755-67.
- Yurt, B. & Celik, I.** (2011). Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* 49, 508-513.
- Yusta, B., Baggio, L.L., Estall, J.L., Koehler, J.A., Holland, D.P., Li, H., Pipeleers, D., Ling, Z. & Drucker, D.J.** (2006). GLP-1 receptor activation improves  $\beta$  cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* 4, 391–406.

- Zhang, F., Moon, A., Childs, K., Goodbourn, S. & Dixon, L.K.** (2010). The African swine fever virus DP71L protein recruits the protein phosphatase 1 catalytic subunit to dephosphorylate eIF2 $\alpha$  and inhibits CHOP induction but is dispensable for these activities during virus infection. *J. Virol.* 84 (20), 10681–9.
- Zhang, K., Wong, H.N., Song, B., Miller, C.N., Scheuner, D. & Kaufman, R.J.** (2005). The unfolded protein response sensor IRE1 $\alpha$  is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J. Clin. Invest.* 115, 268–81.
- Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K. & Cavener, D.R.** (2002). The PERK eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol. Cell. Biol.* 22 (11), 3864–3874.
- Zhang, P., Su, C., Jiang, Z. & Zheng, C.** (2017). Herpes simplex virus 1 UL41 protein suppresses the IRE1/XBP1 signal pathway of the unfolded protein response via its RNase activity. *J. Virol.* 91 (4).
- Zhang, T., Zhang, N., Baehr, W. & Fu, Y.** (2011). Cone opsin determines the time course of cone photoreceptor degeneration in Leber congenital amaurosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (21), 8879–84.
- Zhang, W., Feng, D., Li, Y., Iida, K., McGrath, B. & Cavener, D.R.** (2006). PERK EIF2AK3 control of pancreatic  $\beta$  cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab.* 4, 491–97.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H. & Cai, D.** (2008). Hypothalamic IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 135 (1), 61–73.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M.** (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372 (6505), 425–32.
- Zhao, L. & Ackerman, S.L.** (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 (4), 444–52.
- Zhong, Y., Li, J., Wang, J.J., Chen, C., Tran, J.T., Saadi, A., Yu, Q., Le, Y., Mandal, M.N.A., Anderson, R.E. & Zhang, S.X.** (2012). X-box binding protein 1 is essential for the anti-oxidant defense and cell survival in the retinal pigment epithelium. *PLoS One.* 7 (6), e38616.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L. & Ron, D.** (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12, 982–95.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** Canbolat GÜRSES

**Lisans:** T.C. Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2003-2007) (Y.Ö.K. Bursu)

**Yüksek Lisans:** University of Washington, Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği (2009-2012) (M.E.B. Yurtdışı Eğitim Bursu)

**Doktora:** İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı/Biyokimya Bilim Dalı (2014-2021), Biyoloji Anabilim Dalı/Moleküler Biyoloji Bilim Dalı (2014-...)

### 1. YAYINLAR

#### 1.1. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (SCI & SSCI)

**1.1.1.** Özgür, M.E., Ulu, A., Gürses, C., Özcan, İ., Noma, S.A.A., Köytepe, S., Ateş, B. The Cytotoxicity, DNA Fragmentation, and Decreasing Velocity Induced By Chromium(III) Oxide on Rainbow Trout Spermatozoa, *Biological Trace Element Research*, (2023).

**1.1.2.** Ekinci, O., Akkoç, M., Khan, S., Yaşar, S., Gürses, C., Noma, S., Balcıoğlu, S., Sen, B., Aygün, M., Yılmaz, İ. Synthesis and biological evaluation of Au-NHC complexes, *Applied Organometallic Chemistry*, (2022).

**1.1.3.** Kantarcıoğlu, M., Karaaslan, M.G., Gürses, C., Ateş, B., Köytepe S. Fabrication, thermal and in vitro behaviors of Ciprofloxacin loaded  $\beta$ -Cyclodextrin-PEG Based Polyurethanes as Potential Biomaterial for Wound Dressing Applications, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, (2022).

**1.1.4.** Gürses, C., Karaaslan-Tunç, M. G., Keleştemur, Ü., Balcıoğlu, S., Gülgen, S., Köytepe, S., Ateş, B. Aliphatic Polyurethane Films Based on Hexamethylene Diisocyanate and Saccharides for Biocompatible Transparent Coating on Optic Medical Devices, *Starch-Starke*, 2100214, (2022).

**1.1.5.** Gürses, C., Aktaş, A., Balcıoğlu, S., Fadhilah, A., Gök, Y., Ateş, B. Synthesis, characterization, DNA binding and anticancer activities of the imidazolidine-functionalized (NHC)Ru(II) complexes, *Journal of Molecular Structure*, 1247, 131350, (2022).

**1.1.6.** Balcioglu, S., **Gurses, C.**, Ozcan, I., Yildiz, A., Koytepe, S., Parlakpinar, H., Vardi, N., Ates, B. Photocrosslinkable gelatin/collagen based bioinspired polyurethane-acrylate bone adhesives with biocompatibility and biodegradability, *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 1344-1356, (2021)

**1.1.7.** Ibrahimzade, L., Kaygili, O., Dundar, S., Ates, T., Dorozhkin, S.V., Bulut, N., Koytepe, S., Ercan, F., **Gurses, C.**, Hssain, A.H. Theoretical and experimental characterization of Pr/Ce co-doped hydroxyapatites, *Journal of Molecular Structure*, 1240, 130557, (2021).

**1.1.8.** Ates, B., Koytepe, S., Ulu, A., **Gurses, C.**, Thakur, V.K. Chemistry, Structures, and Advanced Applications of Nanocomposites from Biorenewable Resources, *Chemical Reviews*, 120 (17), 9304-9362, (2020).

**1.1.9.** Karatas, M., Noma, S., **Gurses, C.**, Balcioglu, S., Ates, B., Alici, B., Cakir, U. Water Soluble Coumarin Quaternary Ammonium Chlorides: Synthesis and Biological Evaluation, *Chemistry & Biodiversity*, 9 (17), (2020).

**1.1.10.** Mahmood, B.K., Kaygili, O., Bulut, N., Dorozhkin, S.V., Ates, T., Koytepe, S., **Gurses, C.**, Ercan, F., Kebiroglu, H., Agid, R.S., Ince, T. Effects of strontium-erbium co-doping on the structural properties of hydroxyapatite: An Experimental and theoretical study, *Ceramics International*, 46 (10), 16354-16363, (2020).

**1.1.11.** Sarı, Y., **Gurses, C.**, Celepci, D.B., Kelestemur, U., Aktas, A., Yuksel, S., Ates, B., Gok, Y. 4-Vinylbenzyl and 2-morpholinoethyl substituted ruthenium (II) complexes: Design, synthesis, and biological evaluation, *Journal of Molecular Structure*, 1202, (2020).

**1.1.12.** Karaaslan, M.G., Aktas, A., **Gurses, C.**, Gok, Y., Ates, B. Chemistry, structure, and biological roles of Au-NHC complexes as TrxR inhibitors, *Bioorganic Chemistry*, 95, (2020).

**1.1.13.** Turker, F., **Gurses, C.**, Celepci, D.B., Aktas, A., Ates, B., Gok, Y. New morpholine-liganded palladium(II) N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, and DNA-binding studies, *Archiv Der Pharmazie*, 352 (12), (2019).

**1.1.14.** Onar, G., **Gurses, C.**, Karatas, M.O., Balcioglu, S., Akbay, N., Ozdemir, N., Ates, B., Alici, B. Palladium(II) and ruthenium(II) complexes of benzotriazole functionalized N-heterocyclic carbenes: Cytotoxicity, antimicrobial, and DNA interaction studies, *Journal Of Organometallic Chemistry*, 886, 48-56, (2019).

**1.1.15.** Ulu, A., Noma, S.A.A., **Gurses, C.**, Koytepe, S., Ates, B. Chitosan/Polyvinylpyrrolidone/MCM-41 Composite Hydrogel Films: Structural, Thermal, Surface, and Antibacterial Properties, *Starch-Starke*, 70 (11-12), (2018).

**1.1.16.** Onar, G., Karatas, M.O., Balcioglu, S., Tok, T.T., **Gurses, C.**, Kilic-Cikla, I., Ozdemir, N., Ates, B., Alici, B. Benzotriazole functionalized N-heterocyclic carbene-silver(I) complexes: Synthesis, cytotoxicity, antimicrobial, DNA binding, and molecular docking studies, *Polyhedron*, 153, 31-40, (2018).

**1.1.17.** Akkoc, M., Balcioglu, S., **Gurses, C.**, Tok, T.T., Ates, B., Yasar, S. Protonated water-soluble N-heterocyclic carbene ruthenium(II) complexes: Synthesis, cytotoxic and DNA binding properties and molecular docking study, *Journal of Organometallic Chemistry*, 869, 67-74, (2018).

## **1.2. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

**1.2.1.** Ulu, A., Balcıoğlu, S., **Gürses, C.**, Köytepe, S., Ateş, B. Yenilenebilir Kaynaklı Poliüretan Kompozitler, *Putech (Poliüretan Sanayi Dergisi)*, 7 (26), 14-26, (2015).

**1.2.2.** Ateş, B., Köytepe, S., Karaaslan, M.G., **Gürses, C.**, Gülgen, S. Poliüretan Temelli Biyoyapıştırıcılar, *Putech (Poliüretan Sanayi Dergisi)*, 23, 22-34, (2015).

### **1.3. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler**

**1.3.1. Gurses, C., Ates, B.** The Comparative Investigation of Cytotoxic Properties for Synthetic Commercial Tissue Adhesives, 2nd ICABC (International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry), 11-14 Mart 2020, Antalya, Türkiye.

**1.3.2. Çakmen, A.B., Noma, S.A.A., Gürses, C., Köytepe, S., Ateş, B., Yılmaz, İ.** The Preparation of Antibacterial Wound Dressing Materials Containing Allantoin via Electrospinning Method, 2. EBAT (Eurasia Biochemical Approaches & Technologies) Kongresi, ss. 170, 26-29 Ekim 2019, Antalya, Türkiye.

**1.3.3. Çakmen, A.B., Noma, S.A.A., Gürses, C., Köytepe, S., Ateş, B., Yılmaz, İ.** Preparation of Allantoin-Based Wound Dressing Materials to Enhance Wound Healing, 5th International Eurasian Congress on 'Natural Nutrition, Healthy Life & Sport', ss. 1734-1735, 2-6 Ekim 2019, Ankara, Türkiye.

**1.3.4. Culum, A.A., Gürses, C., Yürekli, M.** The Investigation of Adrenomedullin Effects over Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha under Hypoxic Conditions in Rats, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 26-27 Nisan 2018, Ankara, Türkiye.

**1.3.5. Kantarcıoğlu, M., Karaaslan, M.G., Gürses, C., Ateş, B., Köytepe, S.** Yara Örtüsü Uygulamaları İçin Siproflaksasin/ $\beta$ -Siklodekstrin Temelli Poliüretan Malzemelerin Antibakteriyel ve Biyouyumluluk Özelliklerinin Araştırılması, 6. İlaç Kimyası Kongresi, ss. 175, 22-25 Mart 2018, Antalya, Türkiye.

**1.3.6. Culum, A.A., Gürses, C., Yürekli, M.** Adrenomedullin Affects Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha in Rats under Hypoxic Conditions, 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life, cilt.283, ss. 220, 3-8 Eylül 2016, Kuşadası, Türkiye.

**1.3.7. Gurses, C., Dastan, H., Karaaslan, M.G., Gulgen, S., Koytepe, S., Ates, B.** The Comparison of Isothermal and Hydrolytic Degradability Properties of Non-aromatic Polyurethanes Prepared for Medical Applications, MACRO 2016 (World Polymer Congress), 17-21 Temmuz 2016, İstanbul, Türkiye.

**1.3.8. Gurses, C.,** Ates, B., Koytepe, S., Karaaslan, M.G., Kelestemur, U., Balcioglu, S., Gulgen, S. Aliphatic Polyurethanes Based on Hexamethylene Diisocyanate and Saccharides for Biocompatible Transparent Surface in Medical Devices, European Polymer Federation (EPF Congress), 21-26 Haziran 2015, Dresden, Almanya.

#### **1.4. Kitap Bölümleri**

**1.4.1. Gürses, C.,** Geçkil, H. *Bölüm 9 - Kemotrofik Enerji Metabolizması: Glikoliz ve Fermentasyon.* Becker'ın Hücre Dünyası, 9. Baskıdan Çeviri, Editör: Ali Osman Beldüz, Palme Yayın Dağıtım, Ankara, ss. 215-241, 2019.

**1.4.2.** Ates B., Koytepe S., Balcioglu S., Ulu A., **Gurses C.** *Biomedical applications of hybrid polymer composite materials.* Hybrid Polymer Composite Materials Applications, Editör: Vijay Kumar Thakur, Elsevier Science, Oxford/Amsterdam, Cambridge, ss. 343-408, 2017.

**1.4.3.** Koytepe S., Ates B., **Gurses C.** *Synthesis and Properties of Soy-based Biopolymeric Composites.* Soy-based Bioplastics, Editör: Vijay Kumar Thakur, Smithers Rapra, Shawbury, ss.201-226, 2017.

## **2. TEZLER VE SEMİNERLER**

**2.1.** Biyoloji Doktora Seminer Konusu: “Doğal Öldürücü (NK) Hücrelerin Apoptotik Yolaktaki Rolü”, İnönü Üniversitesi, 2017.

**2.2.** Kimya Doktora Seminer Konusu: “Yara Örtü Materyalleri ve Güncel Uygulamalar”, İnönü Üniversitesi, 2016.

**2.3.** Kimya Doktora Seminer Konusu: “Adeziv Olmayan Biyomateryaller ve Medikal Kullanımları”, İnönü Üniversitesi, 2015.

**2.4.** Doktora Tezi: “Sentetik Ticari Doku Yapıştırıcılarının Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin Karşılaştırılmalı Araştırılması”, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2021.

**2.5.** Yüksek Lisans Tezi: “Multifunctional Core-shell Nanoparticles Towards Targeted Biological Interactions”, University of Washington, Seattle, 2012.

**2.6.** Bitirme Çalışma Konusu: “Nanobiyosensörler”, T.C. Haliç Üniversitesi, 2007.

### 3. KATILDIĞI SEMİNERLER, EĞİTİMLER VE ÇALIŞTAYLAR

3.1. “7. Kimya AR-GE Proje Pazarı” Katılım Sertifikası, 11 Kasım 2017, İstanbul.

3.2. “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” T.C. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu, Malatya.

3.3. “Advanced Technologies on Health Sciences Symposium” Katılım Sertifikası, Hacettepe Üniversitesi, 15-16 Eylül 2014, Ankara.

3.4. “Türk İmmünoloji Derneği 9. Bölgesel Sempozyumu” Katılım Sertifikası, T.C. İnönü Üniversitesi, Mayıs 2014, Malatya.

### 4. PROJELER

4.1. “*Ajuga chamaepitys* subsp. *laevigata* (Banks-Sol) Bitkisinin Yara ve Yanık Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi için Biyoaktivitelerinin İncelenmesi”, Araştırmacı, **Proje No: TOA-2021-2652** (İnönü Üniversitesi BAP, 08.2021 - ...).

4.2. “Hidrofilik Grup İçeren N-Heterosiklik Karben Öncülleri ve Komplekslerinin Sentezi Karakterizasyonu Enzim İnhibisyon ve Antikanser Özelliklerinin Hücre Geçirgenliği ile DNA Bağlanma Özelliklerine Göre Araştırılması”, Araştırmacı, **Proje No: FOA-2021-2320** (İnönü Üniversitesi BAP, 01.2021 - ...).

4.3. “Tiyol Grubu İçeren BenzimidazolFonksiyonlu N-heterosiklik Karben (NHC) Öncülleri ile Gümüş ve Rutenyum Metal Komplekslerinin Sentezi Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi”, Araştırmacı, **Proje No: FOA-2020-2240** (İnönü Üniversitesi BAP, 09.2020 - ...).

4.4. “Endoplazmik Retikulum Stresinin Çeşitli Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi”, Araştırmacı, **Proje No: FDK-2019-1938** (İnönü Üniversitesi BAP, 10.2019 - ...).

4.5. “Sentetik Ticari Doku Yapıştırıcılarının Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin Karşılaştırılmalı Araştırılması”, Araştırmacı, **Proje No: FDK-2018-1355** (İnönü Üniversitesi BAP, 07.2018 - 11.2021).

4.6. “Floresans Spektrofotometresi Kullanarak Yeni Sentezlenen Organometalik Bileşiklerinin Ayrıntılı DNA Etkileşim Modellerinin Araştırılması”, Araştırmacı, **Proje No: FBG-2018-1569** (İnönü Üniversitesi BAP, 11.2018 - 04.2020).

**4.7.**“İlaç Etken Maddesi Olarak N-Heterosiklik Karben (NHC-M, M:Ag, Ru, Pd) Komplekslerinin Sentezi: Antikanser, Enzim İnhibisyonu, DNA Bağlanma Özellikleri ve Moleküler Modelleme”, Araştırmacı, **Proje No: FOA-2018-1342** (İnönü Üniversitesi BAP, 08.2018 - 07.2020).

## **5. BİLİMSEL ve MESLEKİ BİLİRKİŞİLİK GÖREVLERİ**

**5.1.** Araştırma Görevlisi, T.C. İnönü Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Malatya. (Ağustos 2013 - ...)

## **6. BURS VE ÖDÜLLER**

**6.1.** Karaaslan, M.G., **Gurses, C.**, Ates, B., Koytepe, S., 7. Kimya AR-GE Proje Pazarı, Kozmetik, Sabun ve Temizlik Ürünleri Kategorisi 1.'lük Ödülü, *Propolis İçeriğine Bağlı Olarak Yara İyileşmesini Hızlandıran Antibakteriyel Özellikte Poliüretan Temelli Yara Kapayıcıların Hazırlanması*, 11 Kasım 2017, İstanbul.