

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HEp2 HÜCRE MODELİNDE DEKSAMETAZONUN
UNFOLDED PROTEİN RESPONSE GENLERİ ÜZERİNE
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Aynur DÜZGÜN

SAMSUN 2010

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HEp2 HÜCRE MODELİNDE DEKSAMETAZONUN
UNFOLDED PROTEİN RESPONSE GENLERİ ÜZERİNE
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Aynur DÜZGÜN

DANIŞMAN
Prof. Dr. ABDULKERİM BEDİR

SAMSUN 2010

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım değerli hocalarım; Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdülkerim Bedir'e, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Doç. Dr. Ramazan Amanvermez, Doç Dr. Nermin Kılınç, Yrd. Doç. Dr. Birşen Bilgici, Yrd. Doç. Dr. Özgür K. Tuncel, Yrd. Doç. Dr. Bahattin Avcı ve Yrd. Doç. Dr. Hasan Alaçam'a, beraber çalıştığımız arkadaşlarım Dr. Mukadder Erdem, Dr. Tülay Özdemir, Dr. Rukiye Nar, Dr. Veli kılınç, Dr. Osman Saliş, kardeşim Dr. Barış Düzgün ve diğer asistan arkadaşlarım Dr. Murat Günay, Dr. Seher Aydoğan, Dr. Ayşegül Bahadır, Dr. Şimal Gürler, Dr. Uğur Düz, Dr. Mesut Kılıçoğlu, Dr. Sedat Gülten, Dr. Yasemin Küçük'e, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvar çalışanları Şennur Sungur, Orhan Erol, Kadriye Bardak, Hande Koldaş ve diğer laboratuvar çalışanlarına, her zaman bana destek olan sevgili anneme, babama, kardeşlerim Muhammed ve Sonnur'a sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Not: Bu çalışma (PYO.TIP. 1901 09 001 NO'lu proje) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
TABLolar	IV
ŞEKİLLER	V
KISALTMALAR	VII
ÖZET	IX
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Endoplazmik Retikulum (ER)	4
2.1.1 Endoplazmik retikulum tipleri	4
2.1.1.1 Düz endoplazmik retikulum	4
2.1.1.2 Granüllü endoplazmik retikulum	5
2.1.2 Endoplazmik retikulum fonksiyonları	5
2.1.2.1 Protein sentezi	5
2.1.2.2 Ca ⁺² konsantrasyonunun regülasyonu	5
2.1.2.3 Lipit sentezi	5
2.1.2.4 Karbonhidrat metabolizması	5
2.1.3 Protein katlanması	6
2.1.3.1 Protein katlanma esasları	6
2.1.3.2 Protein katlanmasında rol oynayan moleküller	7
2.1.3.2.1 Moleküler şaperonlar	7
2.1.3.2.1.1 Glukoz-regüle protein 78 (Grp78)	7
2.1.3.2.1.2. Glukoz-regüle protein 94 (Grp94)	8
2.1.3.2.2 Lektin benzeri proteinler	8
2.1.3.2.3 Foldazlar	9
2.1.4 Katlanamayan ya da yanlış katlanan proteinlerin tesbiti	10
2.2 Unfolded Protein Response (UPR)	10
2.2.1 UPR yolları	11
2.2.1.1 Protein kinase RNA like ER kinase (PERK) yolağı	11

2.2.1.2 Activating transcription factor 6 (ATF6) yolağı	12
2.2.1.3 Inositol requiring kinase 1 (IRE1) yolağı	13
2.2.2 UPR ve apoptosis	14
2.2.2.1 İntrensek yol	14
2.2.2.2 Ekstrensek yol	14
2.2.3 Fizyolojik durumlarda UPR	15
2.2.3.1 B hücre diferansiyasyonu	15
2.2.3.2 Pankreatik β hücre fonksiyonu	15
2.2.4 Patolojik durumlarda UPR	16
2.2.4.1 UPR ve hiperhomosistinemi	16
2.2.4.2 UPR ve nörolojik hastalıklar	16
2.2.5 UPR hedef genleri	17
2.2.5.1 CCAT/enhancer (C/EBP) homolog protein (CHOP)	17
2.2.5.2 Hem oksijenaz 1 (HMOX1)	17
2.2.5.3 Grp78	18
2.2.5.4 Grp94	18
2.2.5.5 Murine Tumor cell DNAJ protein (MTJ1)	19
2.3 Hücre Yüzey Grp78	20
2.4 Deksametazon	22
3. GEREÇ - YÖNTEM	24
3.1 Kullanılan araç ve gereçler:	24
3.2 Kullanılan kimyasallar	26
3.3 Hücre kültürü	27
3.3.1 Hücre kültür solüsyonları	27
3.3.2 Hücre kültür protokolleri	29
3.3.2.1 -70°C'de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi	29
3.3.2.2 HEp2 hücrelerinin pasajlanması	30
3.3.2.3 HEp2 hücrelerinin dondurulması	30
3.3.3 Hücre kültür medyum hazırlığı (çalışma grup medyumları)	30
3.3.3.1 Deksametazon içeren hücre kültür grubu	31
3.3.3.2 4-Fenil bütirik asit (PBA) içeren hücre kültür grubu	32
3.3.3.3 Brefeldin A (BRFA) içeren hücre kültür grubu	32

3.3.3.4 Lipopolisakkarit (LPS) içeren hücre kültür grubu	32
3.3.3.5 Çalışma gruplarının içerikleri	32
3.3.4 HEp2 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması	33
3.3.4.1 Hücrelerin 96 kuyucuklu pleyte ekilmesi	33
3.3.4.2 HEp2 hücre RNA izolatları için hücre ekimi	34
3.4 RT-PCR ile gen ekspresyon çalışmaları	35
3.4.1 RNA izolasyon protokolü	35
3.4.2 RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü	37
3.5 Grp78 Cell ELISA protokolü	39
3.5.1 Grp78 cell ELISA pleyt dizaynı	42
3.6. Biyoinformatik analiz	43
3.6.1 Primer prob dizaynı	44
3.6.2 UPR gen ekspresyonları için RT-PCR protokolü	47
4. BULGULAR	48
4.1 RNA kantitasyonu	48
4.2 Kantitatif RT-PCR ile UPR gen ekspresyon çalışması	52
4.3 Komparatif Ct metodu ile UPR gen ekspresyon analizi	82
4.3.1 Relatif kantitasyon	82
4.3.1.1 Komparatif C _T (Threshold Siklus) Metodu	82
4.4 Yüzey Grp78 cell ELISA sonuçları	89
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ	99
7. KAYNAKLAR	100

TABLÖLAR

		Sayfa
Tablo I	Komplet RPMI1640 komplet medyum hazırlığı, 100 ml	28
Tablo II	Freeze Medyum, 10 ml	29
Tablo III	RT-PCR gen ekspresyonu için pleyt dizaynı 1. pleyt	33
Tablo IV	RT-PCR gen ekspresyonu için pleyt dizaynı 2. pleyt	34
Tablo V	RNA izolasyon protokolü	35
Tablo VI	RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı	36
Tablo VII	RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü	37
Tablo VIII	Yüzey Grp78 cell ELISA çalışması için pleyt dizaynı I	42
Tablo IX	Yüzey Grp78 cell ELISA çalışması için pleyt dizaynı II	42
Tablo X	UPR gen ekspresyonları için RT-PCR protokolü	47
Tablo XI	RNA 6. saat kantitasyon sonuçları	48
Tablo XII	RNA 12. saat kantitasyon sonuçları	49
Tablo XIII	RNA 24. saat kantitasyon sonuçları	50
Tablo XIV	RNA 48. saat kantitasyon sonuçları	51
Tablo XV	Yüzey Grp78 cell ELISA sonuçları	89

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1	Endoplazmik Retikulum	4
Şekil 2	Moleküler şaperonlar	9
Şekil 3	Foldaz reaksiyonları	9
Şekil 4	UPR	11
Şekil 5	UPR Yolakları	13
Şekil 6	UPR ve Apoptosis	14
Şekil 7	Yüzey Grp78 ve ligandları	21
Şekil 8	GAPDH primer-prob dizaynı	44
Şekil 9	MTJ1 primer-prob dizaynı	44
Şekil 10	Grp94 primer-prob dizaynı	45
Şekil 11	Grp78 primer-prob dizaynı	45
Şekil 12	CHOP primer-prob dizaynı	46
Şekil 13	HMOX1 primer-prob dizaynı	46
Şekil 14	Brefeldin A ile muamele edilen HEp2 hücrelerinin zaman-doza bağlamında UPR-gen analiz grafiği	83
Şekil 15	LPS ile muamele edilen HEp2 hücrelerinin zaman-doza bağlamında UPR-gen analiz grafiği	83
Şekil 16	Brefeldin A ve LPS ile muamele edilen HEp2 hücrelerinin zaman-doza bağlamında UPR-gen analiz grafiği	84
Şekil 17	0.1 µM Dekametazon ile muamele edilen HEp2 hücrelerinin zaman-doza bağlamında UPR-gen analiz grafiği	84
Şekil 18	1 µM Dekametazon ile muamele edilen HEp2 hücrelerinin zaman-doza bağlamında UPR-gen analiz grafiği	85
Şekil 19	0.1 µM Dekametazon ve PBA ile muamele edilen HEp2 hücrelerinin zaman-doza bağlamında UPR-gen analiz grafiği	85
Şekil 20	1 µM Dekametazon ve PBA ile muamele edilen HEp2 hücrelerinin	86

	zaman-doç bağlamında UPR-gen analiz grafiği	
Şekil 21	0.1 μ M Deksametazon ve LPS ile muamele edilen HEp2 hücreslerinin zaman-doç bağlamında UPR-gen analiz grafiği	86
		87
Şekil 22	1 μ M Deksametazon ve LPS ile muamele edilen HEp2 hücreslerinin zaman-doç bağlamında UPR-gen analiz grafiği	
Şekil 23	0.1 μ m Deksametazon, PBA ve LPS ile muamele edilen HEp2 hücreslerinin zaman-doç bağlamında UPR-gen analiz grafiği	87
Şekil 24	1 μ M Deksametazon, PBA ve LPS ile muamele edilen HEp2 hücreslerinin zaman-doç bağlamında UPR-gen analiz grafiği	88
Şekil 25	Kontrol grubuna oranlı yüzey Grp78 ekspresyon grafiği	92

KISALTMALAR

HEp2	Larinks Epidermoid Karsinom
DEX	Deksametazon
UPR	Unfolded Protein Response
ER	Endoplazmik Retikulum
BRFA	Brefeldin A
PBA	4-Phynel Butryic Acide
LPS	Lipopolisakarit
Grp78	Glucose-regulated protein 78 kDa
Grp94	Glucose-regulated protein 94 kDa
HMOX1	Hem oksijenase 1
MTJ1	Murine Tumor cell DNAJ protein
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetal Bovine Serum
PDI	peptidil disülfit izomeraz
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid (okside form)
ATF6	Activating transcription Factor 6
IRE1	Inositol requiring kinase 1
ERAD	ER-associated degradation
Hsp 70	Heat shock protein 70
ADP	Adenozindifosfat
NEF	Nucleotid Exchange Factor
UGGT	UDP _glukoz; glukoprotein glukoziltransferaz
EDEM	ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein
XBP1	X -Box Binding Protein 1
PERK	Protein Kinase RNA (PKR) like ER kinase

eIF2-α	eucaryotic initiation factor-2 alfa
ATF4	Activating transcription Factor 4
CNX	Calnexin
CRT	Calreticulin
S1P	Site 1 protease
CHOP	CCAAT/enhance binding protein (C/EBP) homolog protein
RNA	Ribonukleikasit
DMSO	Dimetilsülfooksit
Ct	Treshold cycle
ARE	Antioksidan response element
GADD153	growth arrest and DNA damage inducible gene
PLA2	Plazminojen A2

ÖZET

HEp2 HÜCRE MODELİNDE DEKSAMETAZONUN UNFOLDED PROTEİN RESPONSE GENLERİ ÜZERİNE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Endoplazmik retikulum protein sentezi ve katlanmasından sorumludur. Ayrıca hücre stresini algılamada önemli bir rol sahiptir. ER'nin, unfolded ve misfolded protein birikimine cevap olarak hücre içi bir sinyal yolları ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Genel olarak bu sinyal yolları unfolded protein response (UPR) olarak bilinmektedir. Hücre koruyucu cevaplarla sonlanan UPR yolları stres ile yeterli kadar mücadele edemezse apoptotik hücre ölümü başlatılır. UPR'nin diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi patolojiler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar kanser tedavisinde UPR üzerinden etki edecek yeni tedavi ajanları keşfetmektedirler. ER lümeninde bulunan bir şaperon olan Glukoz-regüle protein (Grp78) UPR'nin önemli bir düzenleyicisidir ve ayrıca kanser hücre yüzeylerinde de bulunmaktadır. Laboratuvar ortamlarında farklı hücre kültürlerinde UPR çalışılabilir. Ayrıca UPR gen ekspresyonu RT-PCR ile analiz edilebilir. Bizim bu çalışmadaki amacımız deksametazon uygulanmış larinks epidermoid karsinom (HEp2) hücrelerinde UPR gen ekspresyonunu ve yüzey Grp78 ekspresyonunu araştırmaktır.

HEp2 hücre modelinde kültür çalışmaları yapılmıştır. Hücreler 0.1 ve 1 µM deksametazon, 1mM PBA, 0.1 µM Brefeldin ve 0.1 µM LPS kullanılarak oluşturulan farklı kombinasyonlarla 6, 12, 24, 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Gen ekspresyon analizi için kullanılacak hücrelerden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha önceden biyoinformatik analizleri yapılarak dizayn edilen primer ve probler kullanılarak UPR gen ekspresyon tayini kantitatif RT-PCR ile yapılmıştır. Kantitatif RT-PCR analizleri sonucu elde edilen C_T değerleri ticari RT-PCR analiz programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrole göre 1.2 kat değişen sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. Yüzey Grp78 ekspresyonu için yine aynı hücre grupları

kullanılmıştır. Hazırlanan uygun hücre kültür ortamında elde edilen HEp2 hücre yüzey Grp78 tespiti Cell ELISA metodu kullanılarak yapılmıştır. Kontrole göre grupların yüzey Grp78 miktarı değerlendirilmiştir.

Bu çalışma ile deksametazonun UPR gen ekspresyonunu azalttığını gösterdik. Bu sonuca göre deksametazonun HEp2 hücre modelinde apoptotik etkili olmadığı anlaşılmıştır. Bu etkinin kimyasal şaperon olan PBA ile azaltılabildiği diğer sonuçlar ile gösterilmiştir. Ayrıca HEp2 hücrelerinde ER stres ajanı olan BRFA'nın UPR genleri üzerine etkisi detaylı olarak tarafımızca çalışılmıştır. LPS'nin BRFA'nın neden olduğu UPR gen ekspresyon artışını anlamlı şekilde azalttığı da yine bu çalışma ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler; UPR, Deksametazon, Yüzey Grp78, HEp2, PBA

SUMMARY

INVESTIGATION OF MOLECULAR EFFECTS ON UNFOLDED PROTEIN RESPONSE GENES IN HEP2 CELL LINE TREATED WITH DEXAMETHASONE

The endoplasmic reticulum (ER) is responsible for protein synthesis and folding and it also has an important role in perception of cellular stress. It has been reported that ER mediates a group of intracellular signaling pathways in response to accumulation of misfolded and unfolded proteins. These pathways are known as unfolded protein response (UPR). When cytoprotective UPR signaling is not sufficient to deal with the stress conditions, apoptotic cell death is initiated. It is shown that UPR is related with some of disease like diabetes, neurodegenerative diseases and cancer. Researchers are investigating new therapeutics, upon UPR, which are associated with cancer. Glucose-regulated protein (Grp78), a molecular chaperone in ER lumen, is an important regulator of UPR and it is also found on cancer cell surface. In laboratory, UPR can be studied in cell culture with different cell lines. The expression of UPR genes can be analyzed by RT-PCR. In this study we aimed to investigate UPR gene expression and cell surface Grp78 in larynx epidermoid carcinoma (HEp2) cell line treated with dexamethasone.

To investigate the UPR molecular mechanism, we decided to use dexamethasone, phenyl butyric acid (PBA), brefeldin A and lipopolysaccharide (LPS) as chemical agents in HEp2 cell line. With different combination of these chemical agents cells were treated during 6, 12, 24, 48 hours. After RNA isolation for UPR gene expression analysis, cDNA synthesis was studied. The primers' and probes' of UPR genes were analyzed according to bioinformatic analysis programmes, then used in quantitative RT-PCR. We used a software for the analysis of quantitative RT-PCR and 1.2 fold control expression was accepted meaningful for this study. Cell surface Grp78

expression of HEp2 cells has been analyzed by using Cell ELISA method. The surface Grp78 cantitation results in different sudy groups were compared to control group.

With this study we showed that dexamethasone decreased the UPR gen expression. According to this result, it is understood that dexamethasone doesn't have apoptotic effects in HEp2 cell line. Our results indicated that dexamethasone effects on UPR gen expression can be prevented with chemical chaperone PBA. We also examined the ER stressor brefeldin A effects on UPR in details in HEp2 cell culture and observed that LPS can prevent the ER stresor effects of Brefeldin A.

Key words; UPR, Dexamethasone, cell surface Grp78, PBA, HEp2

1. GİRİŞ ve AMAÇ

ER protein katlanmasının düzenlendiği en önemli organeldir. ER, protein sentezi için kalite kontrol merkezi olarak tanımlanabilir. Protein katlanmasının doğru olup olmadığı, yanlış katlanma oldu ise düzeltilmesi eğer düzeltilemezse yanlış katlanan proteinlerin yıkıma gönderilmesi ER'nin görevleridir (49, 106). ER'de proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı moleküller bulunmaktadır ve bu moleküllerin en önemlilerinin başında Grp78 şaperonu gelmektedir. Protein katlanmasına yardımcı olan moleküller aynı zamanda iyi birer kalsiyum tamponlayıcı proteinlerdir ve ayrıca aktiviteleri için kalsiyuma ihtiyaç duymaktadırlar (13).

ER fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik ve ya patolojik durumlarda lümeninde misfolded/unfolded protein birikimi meydana gelmektedir. Hücre diferansiyasyonu fizyolojik ER stres nedenlerinin başında gelmektedir. Hipoksi, hipoglisemi, asidoz ise patolojik ER stres kaynaklarıdır (102). Hücrede homeostazi tekrar sağlamak ve stresten en az zararla kurtulmak için UPR adı verilen ve bir takım hücre içi sinyal yollarından oluşan kaskad aktiflenmektedir. UPR ile öncelikle hücre yaşamının devamı sağlanmaya çalışılır. Sitoprotektif etkili bu aşamada translasyon durdurulur, moleküler şaperon sentezi artırılır ve ER yükünü azaltmak için yanlış katlanan proteinler yıkıma gönderilir. Ancak stres devam eder ise hücrenin çevre dokuya zarar vermemesi için UPR'nin apoptozis kolu aktiflenir (59, 65).

Yapılan çalışmalarda ER stresine yol açan bir çok hastalık ve kimyasal madde tanımlanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız deksametazon anti-enflamatuvar, anti-emetik etkileri olan bir ilaçtır (70). Etki mekanizması hücreden hücreye değişmektedir (14, 33, 95). Monosit hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda apoptotik özellikleri araştırılmıştır (104, 105). Deksametazonun apoptozise UPR yolu üzerinden mi sebep olduğu bilinmemektedir. Çalışmamızda hücre modeli olarak Larinks epidermoid kanser (HEp2) hücre hattı seçilmiştir. Bu hücre hattının seçilmesinin esas nedenlerinden biri daha önce deksametazon-UPR bakımından detaylı çalışma yapılmamış olmasıdır. Uygulanan deksametazon dozları literatür taranarak tespit edilmiştir (8, 105).

Çalışmada kullanılan fenil bütirik asit (PBA) kimyasal bir şaperondur. Bu özelliğinden dolayı deksametazonun UPR üzerine olabilecek etkisini engelleyip

engellemediği araştırılmıştır. Yapılan farklı çalışmalar göz önüne alınarak doz tespiti yapılmıştır (77, 137).

ER stres ajanı olan Brefeldin ile yapılan çalışmalarda UPR'yi aktiflediği gözlemlenmiştir (99). BRFA golgi ile ER arasındaki transportu bozarak strese yol açar ve hücreyi apoptozise götürür (133). Çalışmalarda kullanılan doz aralıkları dikkate alınarak pozitif çalışma grubu oluşturmak amacı ile kullanılmıştır. Ayrıca literatürde HEP2 hücre hattında BRFA ile UPR gen ekspresyonunun detaylı çalışıldığı bir yayına rastlanmamıştır. Yine literatür bilgileri ışığında bazı hücrelerde BRFA'nın neden olduğu apoptozisin LPS ile engellenebileceği rapor edilmiştir (53). Ancak aynı etkiyi HEP2 hücre kültüründe gösterip göstermediği bilinmemektedir. Bu çalışmadaki amaçlarımızdan biri de var ise bu etkiyi gösterebilmektedir.

Çalışmamızın diğer bir ayağı da HEP2 hücre kültüründe yukarıda adı geçen kimyasal maddeler kullanılarak yüzey Grp78 ekspresyon tayinidir. Bilindiği gibi yüzey Grp78 daha çok kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir (65). Hücre yüzeyinde multifonksiyonel bir reseptör gibi rol oynayan molekülün tümör progresyonu, ilaç direnci ve invazyon ile arasında ilişki olduğu bir çok yayında rapor edilmiştir (40, 79, 125). Ancak ER'deki şaperonun nasıl olup da membrana yerleştiği hala aydınlatılamamıştır .

Hücre kültürü bir çok hücre içi mekanizmaların araştırılabildiği uygun çalışma koşullarını sağlamaktadır. Uygun koşullar sağlandığı takdirde araştırmaların güvenilirliği de yüksek olmaktadır. Aynı zamanda hücreler farklı kimyasallarla muamele edilerek hücrenin vermiş olduğu organel bazındaki cevaplar da araştırılabilmektedir.

RT-PCR, gen ekspresyon analizleri için sık kullanılmaktadır. Kullanılan primer ve problemlerin tayini farklı biyoinformatik analizler ile (BLAT, Blast, UPL) yapılabilmektedir.

ELISA yöntemi bir çok proteinin kantitasyonunda kullanılmaktadır. Farklı protokollere sahip ticari formları olmakla birlikte uygun reaktifler sağlanarak tasarlanma imkanı da bulunmaktadır.

Çalışmada UPR gen ekspresyon analizi için kullanılan primer ve problemlerin biyoinformatik analizi tarafımızca yapılmıştır. Gen analizi ise kantitatif RT-PCR

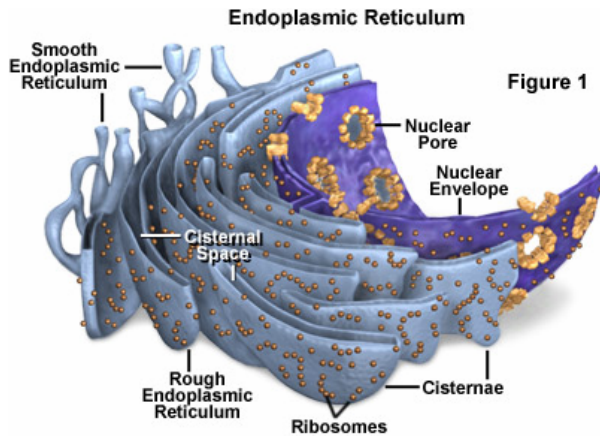
metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuçların yorumlanması Komparatif C_T (Threshold Siklus) Metodunu kullanan bir software aracılığı ile yapılmıştır.

Bu çalışmanın hücre kültürü aşamasında bir kanser hücre hattı olan HEp2 hücre modeli kullanılacaktır. HEp2 hücrelerinde apoptotik ajan olduğu varsayılan deksametazon farklı dozlarda uygulanarak UPR gen ekspresyonları değerlendirilecektir. Bu çalışmanın sonucunda deksametazonun HEp2 hücrelerinde ER stres ve apoptozis ile ilişkisi olup olmadığı araştırılmış olacaktır. Ayrıca HEp2 kanser hücrelerinde yüzey Grp78 ekspresyonu olup olmadığı; var ise deksametazon uygulanmasından etkilenip etkilenmediği ortaya çıkarılacaktır. Çalışmada kullanılacak kimyasal şaperon olan PBA'nın deksametozunun UPR ile olan ilişkisini nasıl etkilediği yine bu çalışma ile aydınlatılmış olacaktır. Sonuç olarak deksametazonun UPR üzerine moleküler etkisi araştırılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ENDOPLAZMİK RETİKULUM

Endoplazmik Retikulum (ER) ökaryotik hücrelerde bulunan, nukleus ve ribozomla bağlantıları olan membranöz ağ yapısında bir organeldir. Membranöz ağ yapısı tübül, kanal ve keseciklerin birbirleriyle bağlantılarından oluşur. Hücre içinde ribozom ve nukleusla yakın etkileşim içindedir ve bulunduğu hücre tipine göre işlevleri değişmektedir (58).



Şekil 1 Endoplazmik Retikulum

2.1.1 Endoplazmik Retikulum Tipleri

2.1.1.1 Düz Endoplazmik Retikulum

Düz ER tübül ve vezikül dallanmalarından oluşan ağ yapısına sahiptir ve bu yapı sayesinde geniş yüzey alanı mevcuttur. Sarkoplazmik retikulum çizgili ve düz kaslarda bulunan düz ER'dir (49, 58). Görevleri;

- Lipid-steroid sentezi
- Karbonhidrat metabolizması
- Kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesi
- İlaç detoksifikasyonu
- Steroid metabolizması
- Reseptörlerin hücre membran proteinlerine iliştilmesi

Düz ER ayrıca glukoneogenez sırasında glukoz 6 fosfatı glukozu çeviren glukoz 6 fosfataz enzimine sahiptir.

2.1.1.2 Granüllü Endoplazmik Retikulum

Ribozomlarla yakın etkileşimi nedeniyle granüllü ER ismini almıştır. Ancak bu etkileşim daimi değildir, protein sentezi durduktan sonra ribozom ER' den ayrılmaktadır.

Hücre dışına gönderilecek proteinler ve membran yapısındaki proteinler burada sentezlenerek transport edilmektedir. Kısaca protein sentezinin kalite kontrol merkezi olarak tanımlanabilir(49, 58).

2.1.2 Endoplazmik Retikulum Fonksiyonları

2.1.2.1 Protein Sentezi

Granüllü ER; membran yapılarında rol alan proteinlerin ve hücre dışına gönderilen proteinlerin son halini kazandığı en önemli organeldir. Ribozomda translasyonu devam eden polipeptid zinciri bir yandan da ER'ye transloke olmaktadır (131). Detaylı olarak daha sonra anlatılacaktır.

2.1.2.2 Ca⁺² konsantrasyonunun regülasyonu

Sitoplazmada Ca⁺² konsantrasyonu 0.1 µM civarında iken ER'de yaklaşık 5 mM'dır. Yaklaşık 50.000-100.000 kat fazla Ca⁺² konsantrasyonuna sahip olan ER, kalsiyum deposu olan bir organeldir. Endoplazmik retikulum içindeki kalsiyumun konsantrasyonunun düzenlenmesi, ATP bağımlı alım ile reseptör bağımlı atılım arasındaki dengeye bağlıdır(62, 85, 127).

ER lümenindeki moleküler şaperonlar, lektin benzeri proteinler ve PDI önemli kalsiyum taşıyıcılarıdır (21, 72).

2.1.2.3 Lipid Sentezi

2.1.2.4 Karbonhidrat metabolizması

2.1.3 Protein Katlanması

2.1.3.1 Protein Katlanma esasları

Ökaryotlarda en önemli protein katlanma kompartmanı ER'dir. Kompleks yapıdaki proteinler ER'de katlanırken sitoplazmada daha basit yapıdaki proteinler katlanır. Katlanma en düşük serbest enerjiye sahip konformasyonda durdurulur ve protein matür halini almış olur (25). Anfinsen'in dogmasında özetlendiği gibi proteinin katlanmasının esas belirleyicisi primer aminoasit dizisidir (1).

Protein katlanması hidrofobik zincirlerin sudan korunmak için birbirlerinin üzerine katlanmasıyla başlar. Protein katlanması çok hızlı olmaktadır (116). 0.1-1 mikrosaniyede alfa heliks veya beta dönüşleri meydana gelmektedir (28). Basit yapıdaki proteinlerin katlanması 50 mikrosaniyeden daha kısa zamanda olmaktadır (138). Daha kompleks yapıdaki proteinin domainleri birbirinden bağımsız katlanabilir. Protein merkezinden suyun çıkışıyla beraber protein katlanması tamamlanır (75).

Endoplazmik retikuluma gelen yeni sentezlenmiş protein çeşitli modifikasyonlara uğramadan katlanamaz. Bu bağlamda posttranslasyonel modifikasyonların çoğu (N-bağımlı glikozilasyon, disülfid bağ oluşumu, hidroksilasyon, oligomerizasyon) ER'de meydana gelir (121).

Endoplazmik retikuluma disülfid bağ oluşumu peptidil disülfid izomerazlar ile katalizlenir ve disülfid bağ recycle ise FAD dependent oksidazlar olan Ero 1p ve Erv 2p ile sağlanır (32). Ero 1p ve Erv 2p için son elektron alıcısı oksijendir. Ero 1p için peroksit ve superoksit minör alıcılar olarak görev yapar (38). Glutasyon endoplazmik retikuluma disülfid bağ oluşumu ile indirgenmeye katkıda bulunur ve oksidatif stres oluşumunun önlenmesinde önemli rol oynar (122).

Membran bağlı dolikol fosfattan protein zincirindeki Asn-X-Ser/Thr rezidülerine oligosakkarit transferi glikozilasyonun ilk basamağını oluşturur. Glikozilasyon proteine bazı özellikler kazandırır. Şöyle ki; hidrofilik özellik kazandırarak proteinin suda çözünürlüğünü artırır. Oligosakkaritin sağladığı özellikler sayesinde proteinin etrafını çevreleyen proteinlerle ilişkisi engellenir ve oligosakkarit bir nevi şaperon olarak görev yapmış olur (106). Oligosakkarit peptid omurgayla etkileşerek yapının stabile olmasını sağlar. Şeker rezidülerinin ardışık eklenmeleri lektin mekanizması ile monitorize edilerek proteinin katlanması takip edilir. Bu da bir çeşit kalite kontrol olarak değerlendirilebilir. CNX/ CRT siklusu kalite kontrolün sadece bir

koludur. Kontrolde geçen protein ya golgiye transport edilecek ya da yıkım için ERAD'a transfer edilecektir (31, 117, 135).

2.1.3.2 Protein Katlanmasında Rol Oynayan Moleküller

Protein katlanmasına yardımcı olan moleküller esas olarak üç ana sınıfta kategorize edilebilir. Bunlardan en önemlisi moleküller şaperon ailesi ile lektin benzeri proteinler ve foldazlar ailenin diğer üyeleridir (6).

2.1.3.2.1 Moleküller Şaperonlar

Moleküller şaperonlar çok sayıda üyeye sahiptir. Aşağıda en fazla araştırılan iki üyesi anlatılacaktır.

2.1.3.2.1.1 Glukoz-regüle Protein 78 (Grp78)

Hsp 70 ailesindedir ve 78 kD'dur. monomerik veya dimerik formdadır. Oligomerik form, peptid binding domain fosforilasyonu ve ADP ribozilasyonu ile posttranslasyonel modifiye edilmiştir ve depo şeklidir. Monomerik formu ile şaperon görevi görmektedir. İnsan Grp78 proteini, 654 aminoasitten meydana gelmektedir. Protein; N-terminal ucunda ER sinyal peptid (1-18 a.a), ATPase domain (125-280 a.a), peptid-binding domain (400-500 a.a) ve C-terminal ucunda KDEL motif (551-654) içermektedir. Grp78'in nukleus ve mitokondride de bulunduğu rapor edilmiştir. Son zamanlarda sitoplazmada alternatif splicing ile oluşan Grp78 izoformunun varlığı tespit edilmiştir. Hsp40 (DnaJ) ve Nucleotid Exchange Factor (NEFs) ile birlikte fonksiyon görür (45, 71, 125). Başlıca görevleri;

- Proteinin ER'a translokasyonunun regülasyonu
- Protein katlanması
- Kalsiyum bağlanması
- Apoptozisin düzenlenmesi
- ER stres sensörü
- UPR sinyal regülasyonu
- Kalite kontrol
- Protein degradasyonu

2.1.3.2.1.2 Glukoz regüle Protein 94 (Grp94)

HSP90 grubundandır. 94 kDa dimerik bir proteindir. N terminal ATPaz domain, koşaperona bağlanan middle domain ve C-terminal dimerizasyon domainden meydana gelmiştir. ER' de en fazla bulunan proteindir (4, 71). Başlıca görevleri;

- Protein katlanması
- Kalsiyum bağlanması
- Apoptozisin düzenlenmesi
- İmmünite (antijen sunumu)
- Protein degradasyonu
- Kalite kontrol

2.1.3.2.2 Lektin Benzeri Proteinler

Kalneksin ve kalretikulin, glikoproteinlerin kalite kontrolünden sorumlu lektinler ailesindedir. Kalneksin transmembran protein iken kalretikulin lümende dolaşan soluble homologudur. Kalneksin membran proksimal domaindeki glikanlara bağlanırken soluble kalretikulin endoplazmik retikulum lümenindeki glikanlarla bağlanır (106).

Glikozilasyon sayesinde proteinin hidrofilik özellik kazanması sağlanarak karbonhidrat bağlayan ligandlarla etkileşimi mümkün hale gelir. Glikoproteinlere bağlanan lektinler disülfid izomerazlar ve foldazlar için substrat sunar. Sonuçta proteinin tersiyer yapısı şekillenmiş olur (135).

UGGT ile reglikozilasyon kalneksinle interaksyonu sağlayarak proteinin EDEM' e yönleneşine aracılık eder. Bu sayede retrotranslokasyon ile proteazoma gidiş ile katlanmayan ya da yanlış katlanan proteinin agregasyonunun önüne geçilir (180).

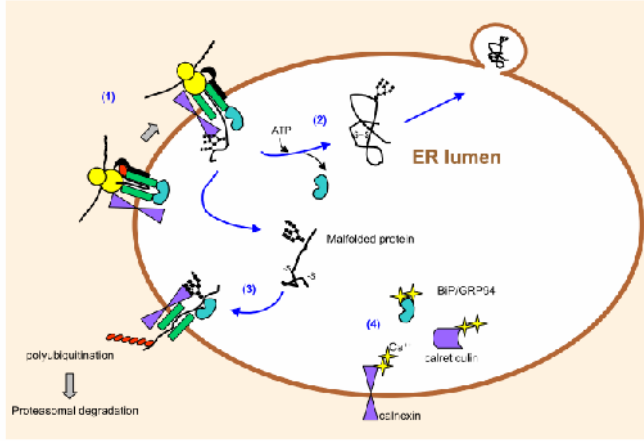
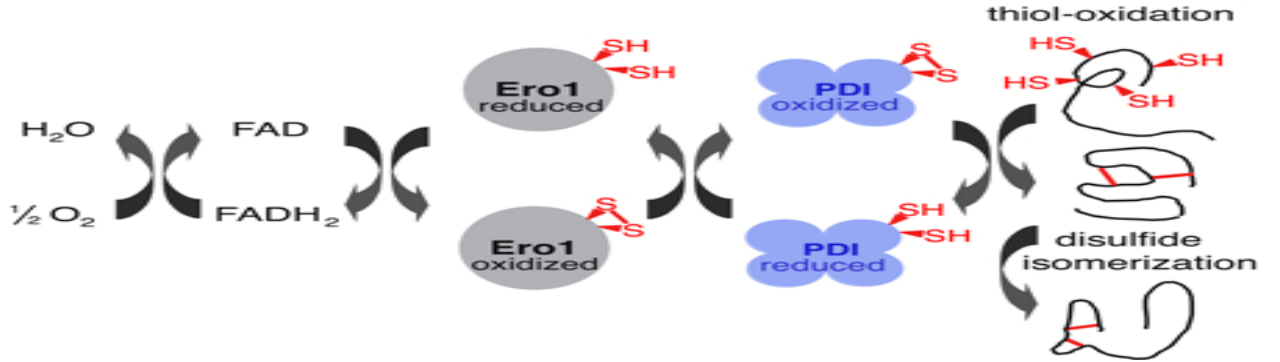


Fig. 1. Schematic illustration of ER-resident chaperone functions under non-stress conditions including (1) facilitating co-translational translocation; (2) helping protein to fold; (3) facilitating retro-translocation and ERAD; and (4) contributing to ER calcium storage.

Şekil 2 Moleküler şaperonlar (74)

2.1.3.2.3 Foldazlar

ER’ a lokalize şaperon benzeri enzimlerdir. Protein disülfid izomeraz (PDI) 110 kD homodimerik bir proteindir. ER protein içeriğinin %2’sini oluşturur. Disülfid bağ oluşumu, protein katlanması ve unfolded proteinlerin tanınmasında ve degradasyona gidişinde görev alırlar (90, 108).



Şekil 3 Foldaz reaksiyonlar (13)

2.1.4 Katlanamayan ya da yanlış katlanan proteinlerin tesbiti

Olgunlaşmamış protein endoplazmik retikuluma girdiği zaman N-bağlı glikanlarla (iki N-Asetilglukozamin, dokuz mannoz, ve üç glukoz molekülünden oluşur) modifiye edilir. Modifiye yapıdan iki glukoz, glukozidaz I ve II etkisiyle uzaklaştırılır. Tek glukozlu hale gelince kalneksin ve kalretikulin için substrat halini alır. Protein doğru katlanmışsa, son glukozun uzaklaştırılması bu şaperonların bağlandığı bölgeyi ortadan kaldırarak olgun proteinin golgiye transferi gerçekleşir. Ancak protein doğru katlanamamışsa UGGT (ER membranına bağlı UDP-glukoz; glikoprotein glikoziltransferaz) unfolded kısma bağlanır ve deglikozile glikana glukoz ekler. Dolayısıyla kalneksin, kalretikulin için bağlanma bölgesi oluşturulur. Bu zaman zarfında doğru konformasyon sağlanmışsa UGGT tekrar aktive olmaz ve protein golgiye gider. Bu durum sağlanamamışsa UGGT' nin rol aldığı sikluslar protein yıkım kararı çıkana kadar tekrarlanır (21, 106).

2.2 UNFOLDED PROTEİN RESPONSE (UPR)

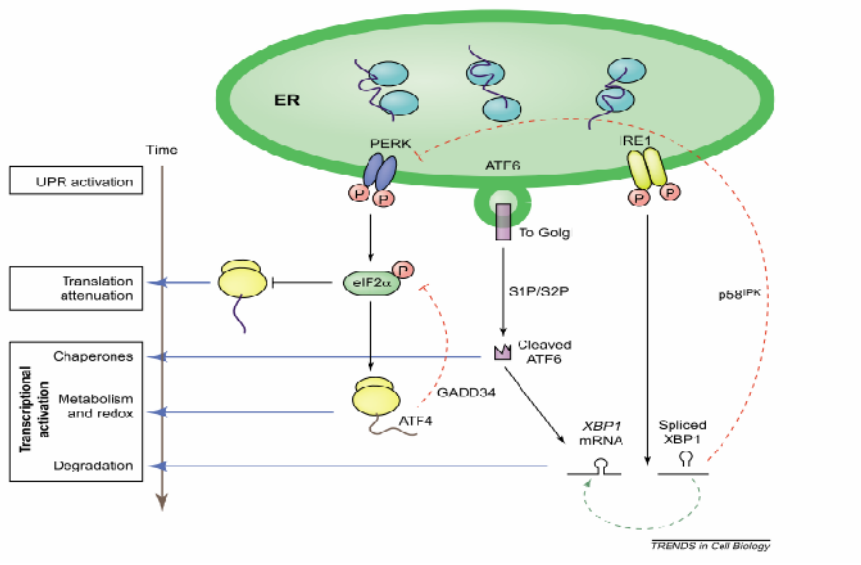
Bir hücrenin stresi hissetmesi, cevap vermesi ve stresi yenmesi homeostazın sağlanması için gereklidir. N-linked glikozilasyon inhibisyonu ve kalsiyum homeostazının bozulması, enfeksiyon, genetik mutasyon, besin eksikliği, hipoksi gibi egzojen ya da endojen kaynaklı bir çok stres nedeni vardır. (57, 63)

Hücre, karşılaştığı ER stresi ile baş edebilmek ve homeostazı sağlamak için UPR yolunu kullanır. ER lümeninde biriken katlanamamış proteinlerin katlanmasını sağlamak için kapasitesini artırır. Katlanmaya yardımcı olan yardımcı moleküllerin sentezi artırılır. Yanlış katlanan proteinler düzeltilemezse ER yükünü azaltmak için yıkıma gönderilir. Hücre yine de adaptasyonu sağlayamazsa çevre dokuya zarar vermemesi için apoptozise yönlendirilir (20).

Makrofaj, pankreas beta hücreleri gibi sekreter hücrelerin diferansiyasyonu ve hücre büyümesi yanlış katlanan protein üretimine neden olarak UPR'yi indükleyen fizyolojik durumlardır. Patolojik durumlar ise; hipoglisemi, hiper-homosistinemi ve iskemi artmış metabolik durumlar; sekreter ve transmembran proteinleri kodlayan genlerde mutasyon; hepatit C gibi enfeksiyonlardır (63).

B hücre diferansiyasyonu (sitokinlerce uyarılan) sonucu XBP1 sentezi indüklenmektedir. XBP1 eksik micelerde yapılan çalışmalarda diferansiyasyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir. Ve XBP1 in gerekli olduğu ispat edilmiştir (129).

Günümüze kadar UPR sensörü olarak üç transmembran protein tanımlanmıştır (81, 101).



Şekil 4 UPR (102)

2.2.1 UPR Yolakları

2.2.1.1 Protein Kinase RNA (PKR) like ER kinase (PERK) Yolağı;

ER membranında lokalize Tip I transmembran seri treonin kinazdır. Normal şartlar altında Grp78 ile beraber bulunması molekülün inaktif monomerik durumda kalmasını sağlar (106, 142). ER kapasitesini aşan yükü veya stresle karşılaştığı zaman beraberinde bulunan Grp78 lümen katlanmaya yardımcı olması için gönderilirken PERK homodimerize olarak fosforillenir. Aktive olan PERK daha sonra eucaryotic initiation factor (eIF)2 α 'yı fosforiller. Fosforillenen eIF2 α , genel translasyonu hücre içinde durdurur. Ancak bazı seçilmiş proteinlerin translasyonu devam eder ve miktarları artar (59). PerK^{-/-} hücreler ER stresse duyarlıdır. Translasyonun inhibe olması sonucu kısa ömürlü proteinler hücreden temizlenir. En tipik örnek Cyclin D'dir. ER stres

sırasında bu proteinin yokluğu memeli hücrelerinin G1 fazında kalmasına yol açar (44, 58, 103).

eIF2 α 'ya ek olarak NRF'2 de PERK tarafından fosforillenir. NRF2, normal şartlarda sitoplazmada Keap1 ile kompleks halde ve inaktiftir. ER stres, sonucu fosforillenen molekül kompleksinden ayrılır ve aktifleşir. Nukleusa giden aktif NRF2 antioksidan response elementle (ARE) etkileşir. ARE tarafından düzenlenen genler; Glutasyon S-transferazın A1 ve A2 subunitleri, NAD(P)H: quinone oksidoredüktaz, gama glutamil sistein sentetaz ve UDP-glukoronozil transferaz'dır. PERK^{-/-} hücreler ER stres ile karşılaşınca reaktif oksijen ürünlerinin biriktiği ve NRF^{-/-} hücrelerin de ER strese duyarlı olduğu gösterilmiştir (66).

Katlanamayan proteinlerin birikmesi sonucu hücre redoks durumundaki dengesizlik redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan nF-kB'nin aktive olmasına neden olurken antioksidanların bu aktivasyonu inhibe ettiği tesbit edilmiştir (112).

eIF2 α 'nın fosforilenmesi sonucu memeli hücrelerinde ATF4 translasyonu artar ve bu molekül aminoacid response elemente bağlanarak CHOP, GADD34 ve ATF3 gen ekspresyonunu artırır. Ayrıca ATF4, aminoasit import, glutasyon biyosentez ve oksidatif strese dirençte rol alan genlerin de ekspresyonunu düzenler. ATF3 ise CHOP ve GADD34 ekspresyonunu düzenlemede katkıda bulunur (63).

Sonuç olarak PERK sinyalizasyonu ile ER strese karşı hücrenin protein yükü azaltılarak katlanmamış veya yanlış katlanan proteinlerin düzeltilmesi ve ER' ye ek yük getirilmeyerek de ek stresten korunma sağlanmaya çalışılmaktadır (83, 59, 103).

2.2.1.2 ATF6 Yolağı;

ATF6, bZIP proteindir. İki formu vardır. ATF- α 90-kDa ve ATF6- β 110 kDa'dur. ATF6- β ayrıca CREB-RP olarak da bilinmektedir.

Hücre normal şartlar altında iken ER membranında Grp78 ile beraber inaktif şekilde bulunmaktadır. ER stres ile karşılaşınca Grp78 lümene katlanmaya yardımcı olmak için gönderilirken ATF6 da posttranskripsiyonel modifikasyona uğrar. Golgiye gönderilen ATF6 Site1 proteazla (S1) etkileşerek kırılmaya uğrar. Daha sonra Site2 (S2) proteaz tarafından kırılan ATF6 50 kDa'a dönüşür ve nukleusa gönderilir. Burada ER response elemente bağlanır. Grp78, Grp94 gibi ER şaperonlarının ekspresyonunu

artırır. Sonuç olarak bu proteinlerin sentezi artar ve ER katlama kapasitesi yükselerek strese karşı korunma sağlanmaya çalışılır (11, 141, 142).

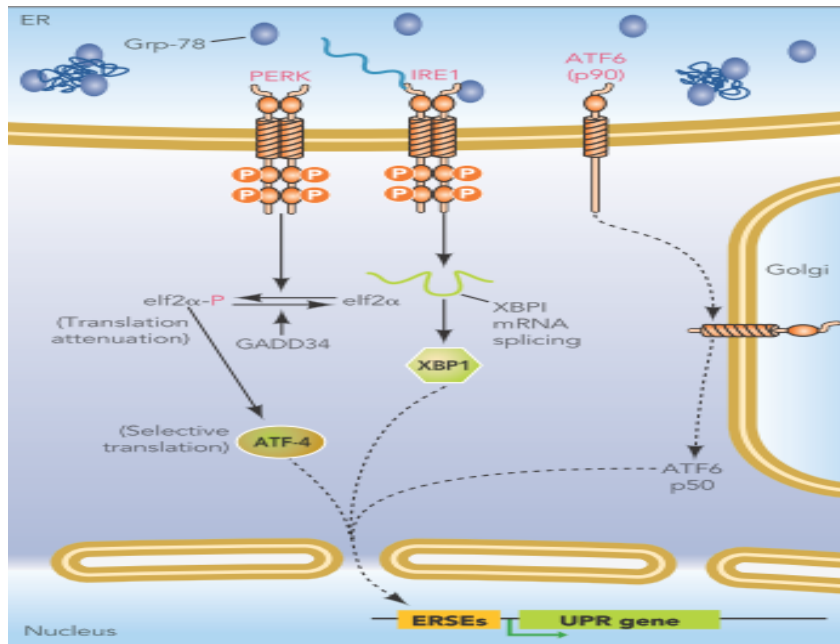
ATF6 tarafından düzenlenen diğer gen ekspresyonları XBP1, CHOP, Herp (Hyperhomocysteinemia-induced ER response protein) ve PDI'dır (20, 86).

2.2.1.3 Inositol Requiring Kinase 1 (IRE1) Yolağı

Transmembran proteindir. Sitoplazmik domaini endoribonükleaz ve kinaz aktivitesine sahiptir. Lümeneye bakan bölümü PERK ile benzerdir ve dimerizasyon gösterir. İki formu vardır. IRE1- α tüm hücrelerde bulunurken β formu ise barsaklarda bulunmaktadır. Micelarda yapılan çalışmalarda IRE- α 'nın delesyonu sonucu embriyonun 9.5 ve 11.5 günleri arasında öldüğü tesbit edilmiştir. IRE- β negatif micelarin ise dekstran sodyum sülfata duyarlı kolit geliştirdiği gösterilmiştir (100).

IRE1, diğer UPR yolakları gibi Grp 78 ile beraberken inaktiftir. ER stres sırasında Grp78'in ayrılmasıyla dimerize olur ve otofosforillenir. Aktif haldeki IRE1'in RNAaz aktivitesi ile mRNA XBP'den 26 nükleotid nükleotid uzaklaştırılır. sXBP1 mRNA translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüşür. ER şaperonlarının ve katlanmaya yardımcı olan enzimlerin (PDI gibi) upregulasyonuna neden olur (69).

XBP1 mRNA sitoplazmada normalde bulunmaktadır. Ancak un-spliced şekildedir (16).



Şekil 5 UPR Yolakları (63)

2.2.2 UPR ve APOPTOSİS

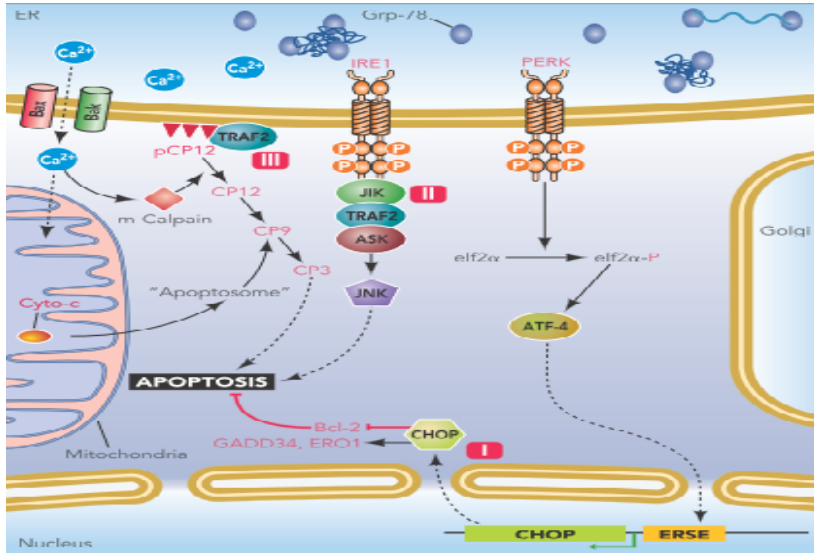
Apoptosis, iki major yol olan intrinsek yol(örneğin DNA hasarı) ve ekstrinsek (ekstraselüler) yol ile kontrol edilir.

2.2.2.1 İntrensek yol

ER strese cevap olarak Bax ve Bak konformasyonel değişikliğe uğrar. ER lokalize Bak ile ER lümeninden sitoplazmaya Ca^{2+} salınır. Kalsiyum havuzunun bozulması sonucu sitoplazmada Kalpain aktiflenir ve Kaspaz 12'nin aktiflenmesini sağlar. Ve kaspaz3 ve 9'u içine alan kaspaz kaskadı aktiflenir. Bu yol Apaf-1 ve mitokondriyal sitokrom-c salıverilmesinden bağımsızdır. ER' den salınan Ca^{2+} mitokondri tarafından alınır ve iç membran potansiyeli bozulur. Sonuç olarak apoptosis başlatılmış olur (63).

2.2.2.2 Ekstresek yol

ER, strese yanıtlardan biri olan IRE1'in TRAF2 ve apoptosis sinyal-regulating kinase(ASK1) ile nin oluşturduğu heterodimer kompleks ile c-Jun N-terminal inhibitory kinase(JIK) aktiflenir ve hücre ölümü başlar (63).



Şekik 6 UPR ve Apoptosis (63)

2.2.3 Fizyolojik Durumlarda UPR

2.2.3.1 B hücre diferansiyasyonu

Monosit hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümü sırasında sekretuar yollar tekrar yapılandırılır, hücrenin görünümü değişir ve antikor sentez ve sekresyonu yeteneği kazandırılır. LPS ile veya sitokinlerle hücrenin stimülasyonu sonucu diferansiyasyon meydana gelebilir. Stimülasyon sonucunda UPR genlerinden Grp78, Grp94 ve CHOP ekspresyonu indüklenir. IL4 ile stimülasyon sonucunda B hücre diferansiyasyonu meydana gelir ve XBP1 mRNA hızla artırılır. Ancak IgM ağır zincir sentezi meydana gelmeden sXBP1 oluşmaz. sXBP1'in overekspresyonu sonucu IgM sekresyonu artar. Bu sonuçların da gösterdiği gibi terminal plazma hücre diferansiyasyonu ve yüksek miktarda immünglobin sentezi için XBP1 gerekmektedir (37, 54, 63, 98).

LPS veya IL4 ile stimülasyonun erken fazlarında ATF6 aktifleşmektedir. Ancak diferansiyasyon sırasında aktiflenen UPR'de sensör olarak kullanılıp kullanılmadığı açık değildir. Ek olarak CHOP sentezi erken dönemde artarken PERK'in aktifleştiğine dair delil yoktur (2).

Yukarıdaki bilgilerin ışığında fizyolojik UPR'nin IRE1'i özellikle aktive ettiği ve ER şaperon ve sekretuar yolak proteinlerinin sentezinin artırıldığı söylenebilir. Bu esnada protein sentezi, büyümeyi durdurmadan işlemler yürütülmektedir.

2.2.3.2 Pankreatik β hücre fonksiyonu;

PERK pankreasda yüksek miktarda ifade edilir. PERK^{-/-} mice'de pankreatik disfonksiyona rastlanmıştır. Doğumdan hemen sonra diabet gelişmiştir. İnsanlarda Perk genindeki mutasyon Wolcott_Rallison Syndrome (otozomal resesif genetik hasar) adı verilen ve çocuklukla ortaya çıkan insülin bağımlı diabet, epifizyal displazi, büyüme retardasyonu ile karakterizedir (23, 63).

Pankreatik β hücreleri, kan glukozundaki fizyolojik fluktuasyonlara (3-10 mM) çok hassastır. Diğer hücrelerden farklı olarak β hücrelerindeki ATP üretimi ve protein sentez oranı ekstraselüler glukoz seviyeleri ile alakalıdır. Azalmış glukoz seviyeleri PERK aktivasyonuna ve eIF2 α fosforilasyonuna neden olarak protein sentezini inhibe eder. Sonuç olarak proinsülin mRNA translasyonunu durdurur. Glukoz seviyesi yükselince ATP/ADP oranı da artacak PERK sinyalizasyonu inaktive olacaktır. Bu

durumda yükselmiş glukoz proinsulin translasyonunu artırırken azalmış glukoz translasyonu azaltır. β hücrelerinin glukoz seviyesini hissetmesi insülin sekresyon ve biyosentezi üzerine de etkilidir. Yapılan çalışmalar sonucunda hücredeki anlatılan özelleşmiş fonksiyonların ER sinyalizasyon yolları ile başarılı olduğu düşünülmektedir (43, 47).

2.2.4 Patolojik durumlarda UPR

2.2.4.1 UPR ve Hiperhomosisteinemi

Homosisteinemi, metiyonin ve sistein metabolizmaları için önemli ara metabolittir. Aterosklerotik arter hastalıklarında ve venöz tromboembolizmde artmış seviyeleri ortak ve bağımsız faktördür. Homosisteinin tiol gruplarının reaktif oksijen radikalleri oluşturmak üzere oksidasyona gitmesi hücrede disfonksiyona ve hasara neden olur (55, 128, 130) .

Homosisteinin, sekretuar proteinlerin sistein aminoasitleri arasında istenmeyen disülfid bağları oluşturarak protein katlanmasını engellediği hipotez edilmektedir. Hipoteze göre bu durum ER strese yol açmaktadır (30, 143).

Homosistein ile muamele edilen kültür hücrelerinde oluşan UPR'ye cevapta artan gen ekspresyonlarından bazıları BİP, Grp94, CHOP, HERP'dir (93).

2.2.4.2 UPR ve Nörolojik Hastalıklar

Geçici iskemi sonrası enerji gereksinimini karşılayamayan hücrelerde protein sentezi büyük oranda inhibe edilir. Translasyon inhibisyonu, E1f2 α fosforilasyonu ile koreledir. Serebral iskemi ile UPR gen mRNA miktarı artar. Ek olarak protein agregatlarının endoplazmik retikulum membranına ilişik olduğu tespit edilmiştir. İskemideki bulgular bu hastalıkların etyolojisinde işlevsiz proteinlerin klirensinin tam olmaması ve biriken agregate proteinlere verilen hücresel cevabın rol oynamadığını göstermektedir (11, 50).

Alzheimer, Parkinson gibi sık rastlanan nörodejeneratif hastalıklar altında yatan neden; etkilenen nöronların etrafında ve içinde biriken anormal protein agregatlarıdır. Bu agregatlar hücrenin nükleus veya sitoplazmasındadır. Dolayısı ile UPR ve hücre ölümü ile beraberdir (26, 120).

2.2.5UPR HEDEF GENLERİ

2.2.5.1 CCAAT/enhancer protein (C/EBP) HOMOLOG PROTEİN (CHOP)

CHOP, transkripsiyonel düzenleyici C/EBP protein ailesinin bir üyesidir. Diğer bir aile üyesi ile dimerize olur ve DNA'ya bağlanmayı ve transaktivasyon özelliklerini değiştirir (48). DNA hasarı veya ER stres sonucu büyümeyi durdurur ve apoptozisi indükler. Bazı tümör dokularda ve hepatoma, neuroblastoma, myeloid, kolon gibi kanser hücre hatlarında eksprese edildiği gösterilmiştir (61, 107). Ayrıca proliferen olan çoğu hücrede düşük seviyede eksprese edilirken oksidatif stres, DNA hasarı ve ER strese maruz kalan farklı dokularda ekspresyonun dikkat çekecek şekilde up-regüle olduğu iddia edilmiştir (123, 126). CHOP, strese cevap olarak hücre siklus arresti yapar ve apoptozisi uyarır (118). Bu nedenle diğer bir adı da 'growth arrest ve DNA damage inducible gene' dir (GADD153) (146).

2.2.5.2 HEM OKSİJENAZ 1 (HMOX1)

Fe-Protoporfirin IX olan hem, HMOX1 ile Labil Fe, karbonmonoksit ve biliverdine dönüşür. Hem, hemoproteinlerin prostetik grubu gibi rol oynamaktadır (39). Serbest hem fenton kimyası ,reaksiyonu, ile serbest radikallerin oluşumuna neden olabilmektedir. Homeostaz sırasında pro-oksidan hem, hemoproteinlerin yapısına sokularak kontrol edilir. Oksidan stres sonucunda hemoprotein yapısındaki hem ayrılır ve serbest hem açığa çıkar (114). HMOX1 ekspresyonu transkripsiyon düzeyinde kontrol edilir . Stres durumunda HMOX1 ekspresyonu artar ve artan protein miktarı ile serbest hem katabolize edilir. Ürünler karbonmonoksit ve biliverdinin katabolizması ile oluşan bilirubin anti-oksidan olarak rol oynar (41, 119, 144, 132).

HMOX1'in sitoproduktif etkisi ilk kez R. Tyrrell ve meslektaşları tarafından belirlenmiştir (124). Fibroblastlarda HMOX1 ekspresyonunun oksidatif strese karşı adaptif hücre koruyucu cevapla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Kısa bir zaman sonra da G.Balla ve arkadaşları kültüre endotel hücrelerinde HMOX1 indüksiyonunun oksidatif strese karşı hücre koruyucu olduğunu rapor etmişler ve endotel hücrelerinin TNF aracılı apoptozise gidişini önlediğini bulmuşlardır (6). Daha sonra benzer çalışmayı farklı pro-apoptotik ajanlar ve farklı hücreler kullanarak da genişletmişlerdir (12, 97).

Yapılan farklı çalışmalarda HMOX1'in sitoprotektif etkisinin p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal yolağına bağımlı olduğu iddia edilmiştir. P38

alfa ve p38 beta MAPK'ın farmakolojik inhibisyonu ile HMOX1'in anti-apoptotik etkisinin süprese edildiği açığa çıkarılmıştır. P38 MAPK'ın HMOX1 tarafından aktivasyonunun, Bcl-xl ekspresyonuna PI3K/Akt sinyal yolu aracılığı ile yol açtığı ve bu sayede intrinsek (mitokondriyal) apoptotik yolağın inhibe edildiği gösterilmiştir (5, 51).

2.2.5.3 Grp78

En iyi karakterize edilen ER şaperon proteinlerinden olan Grp78, ilk kez 70'li yılların sonunda glukozu azaltılmış medyum ile muamele edilen doku kültür hücrelerinde sentezinin artması ile tesbit edilmiştir.

Yapısı moleküler şaperonlar başlığı altında detaylıca incelenen molekülün ER' de protein kalite kontrol mekanizmasında çok önemli rol oynadığı bilinmektedir (13, 125).

UPR'nin esas düzenleyicisi olan Grp78 ayrıca embriyolojik gelişimde, kanser progresyonunda ve ilaç direncinde rol almaktadır (34, 67, 96).

2.2.5.4 Grp94

Bütün organizmalarda Grp94 single copy genidir. İnsanlarda 12. kromozomda bulunur. 782 aminoasitten oluşur. N-terminal ucunda nukleotid/geldanamycin/radicicol-binding domain bulunmaktadır. Daha sonra iki asidik domaininden biri olan ve ilaç bağlanmasını regüle eden domain gelir. Diğer asidik domain ise C-terminal ucunda bulunur. Grp78'de olduğu gibi ER'de kalmasını sağlayan KDEL motifine de sahiptir (10, 76).

Bir glikoprotein olan Grp94, Hsp90 şaperon ailesinin bir üyesidir. ER lümenindeki proteinlerin %5-10'unu oluşturur. Hemen hemen tüm hücrelerde mevcuttur. Hipoglisemi, hipoksi, asidoz, viral enfeksiyonlar ve mutant protein ekspresyonu gibi stres durumlarında ekspresyonları artar. Kısacası, Grp78 upregulasyonuna neden olan durumların Grp94'ün de upregulasyonuna yol açtığı söylenebilir (4).

Grp94, aynı zamanda, kalsiyum bağlama kapasitesine sahip, ER kalsiyum tampon proteinlerinden biridir. 15 tane kalsiyum bağlayabilen bölgeye sahip olduğuna inanılmaktadır. Kalsiyum taşıyıcısı olmasının yanında Grp94 kendi aktivitesinin düzenlenmesi için kalsiyuma ihtiyaç duyar (64).

ER'de strese maruz kalan hücrelerde hasar oranını sınırlamak için Grp94 overekspresyonu meydana gelir. Halbuki kanser hücrelerindeki overekspresyonu anti-apoptotik fonksiyonları ile kanser progresyonuna ve ilaç direncine öncülük etmektedir. Birçok kanser hücre hattında, solid tümörlerde ve kanser biopsilerinde yapılan çalışmalarda artmış Grp78/Grp94 seviyeleri ile malignensi arasında ilişki tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada meme kanser hücrelerinde overeksprese olan Grp94'ün kötü prognoz ile ilintili olduğu rapor edilmiştir. Bu hücrelerin anti-proliferatif ajan olan geldanamycin ile muamele edilmesi sonucu Grp94-p158 kompleks oluşumu engellenir. Grp94'ün ekspresyonu engellenerek hücre etoposide karşı hassas hale getirilebilmektedir (35).

Grp94 normal hücrelerde şaperon görevi görmesinin yanında kanser hücreleri ve virüsle enfekte hücrelerde de görev yapar. Bu nedenle tümör hücrelerinden derivate edilen Grp94 tümör antijenik peptit taşımaktadır. Ayrıca virüs ile enfekte hücrelerden elde edilen Grp94'ün viral epitoplara taşıdığı rapor edilmiştir. Normal şartlar altında intraselüler protein iken nekrotik hücrelerden Grp94-Peptid kompleksi salıverildiği bunun da antijen sunan çöpçü hücrelerce alındığı tespit edilmiştir (94).

Farelerde yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonda Grp94-peptid preparatlarının kullanımı sonucu oluşan immünizasyon ile tümör büyümesinin inhibe edilebileceği iddia edilmektedir. Bu çalışmaların ışığında ileriki dönemlerde hasta spesifik kanser tedavisinin bir parçası olan immünoterapide şaperon bazlı aşı kullanımı gündeme gelebilecektir (56)

2.2.5.5 MTJ1

DNAJ-like proteinler Hsp70 ailesi ile protein konformasyonunun ve oligomerizasyonunun sağlanmasında beraber hareket eder. Diğer bir deyişle Hsp70'in ko-şaperonudur. DNAJ ailesi farklı kombinasyonlarda bulunan dört iyi korunmuş domaine sahiptir. Bu domainlerden biri olan J domain, ko-şaperon fonksiyonları için gereklidir (9, 92).

Murine tümör cell DNAJ-like protein 1 (MTJ1) DNAJ-like protein ailesinin bir üyesidir. Transmembran bir protein olan MTJ1, Grp78'in katalitik aktivitesi için yardımcı şaperon olarak rol oynar. J domaini Grp78'in protein bağlayan bölgesindeki ATPaz'ın hidrolitik etkisini simüle eder ve polipeptide bağlanarak protein katlanmasına

yardımcı olur. Ayrıca yeni sentezlenen polipeptidin ER membranından translokasyonu sırasında da ko-şaperonluk yapar (18, 27).

Uma Kant Misra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MTJ1 ko-şaperonunun, Grp78'in hücre yüzeyine translokasyonu ve membrana iliştilmesi sırasında da fonksiyon gördüğü iddia edilmektedir. Mice makrofajları kullanılan çalışmada yüzey Grp78 Cell ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. İmmünopresipitasyon ile plazma membranındaki Grp78 ve MTJ1 araştırılmıştır. Ayrıca MTJ1 mRNA ve protein düzeylerine de bakılmıştır. Çalışma sonucunda murin peritoneal makrofaj hücrelerine Grp78 ile MTJ1'in membranda ko-lokale olduğu tespit edilmiştir. Ancak MTJ1 gen ekspresyonunun engellenmesi sağlanınca yüzey Grp78 yüzey lokalizasyonunun inhibe olduğu rapor edilmiştir. Bilindiği gibi yüzey Grp78'in ligandlarından biri de α_2 makroglobulindir ve bu çalışmada MTJ1 ekspresyon inhibisyonunun Grp78- α_2 makroglobin kompleks oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Ancak mRNA Grp78 ekspresyonu etkilenmemektedir. Çalışma ile Grp78 in yüzeye translokasyonunda ve membranda lokalize kalmasında MTJ1'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir (78).

Ayrıca membrandaki MTJ1 / Grp78 kompleksinin hücre içine virüs girişinde de rol oynamaktadır (73).

2.3 HÜCRE YÜZEY Grp78

Grp78; Hsp70 ailesine üye, her hücrede bulunan, hücre homeostazında önemli rol oynayan iyi karakterize edilmiş endoplazmik retikulum şaperonudur. Primer fonksiyonu protein sentezi sırasında polipeptidin hidrofobik kısmıyla etkileşme kapasitesiyle alakalıdır ve bu rolü ile proteinin matür hale gelmesine yardımcı olmaktadır. Diğer bir önemli rolü ise UPR'yi oluşturan sinyal kaskadının aktifleşmesini sağlamaktır. Daha çok ER lümen proteini olarak bilinen Grp78 ayrıca hücre yüzeyinde de tanımlanmıştır ve alfa 2-makroglobin tarafından aktive edilen hücre yüzey sinyal reseptörü olarak görev yaptığı tespit edilmiştir (96, 84).

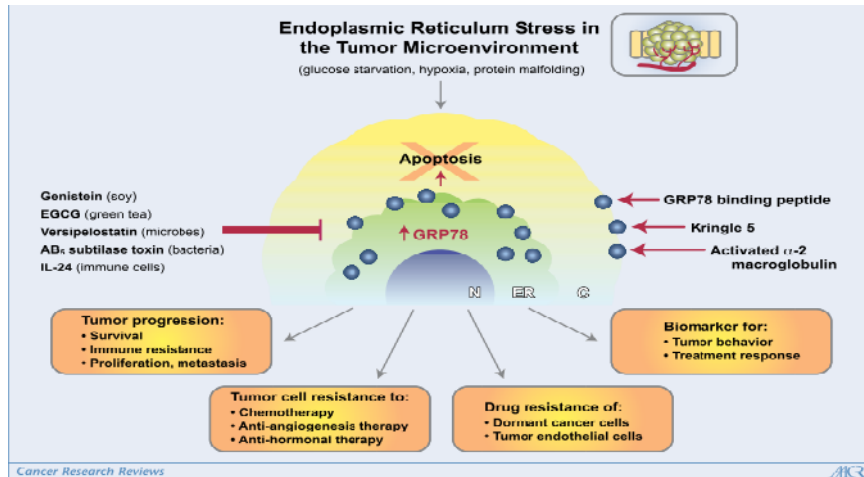
CHO, HepG2 hücre kültürlerinde Grp78'in topografisi incelenmiş ve hem N-terminal hem de COOH-terminal bölgenin membran dışında bulunduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca transmembran heliksleri dört hidrofobik domainden oluşmuştur. ATP ve peptid bağlayan domainleri plazma membranının dışında lokalizedir. Grp78'in

membran lokalizasyonu şaperon görevinden ziyade ko-reseptör görevi görmesini sağlar (40, 125).

Hücre yüzey Grp78 ayrıca endotel hücrelerinde anjiogenik reseptör olarak görev yapar. Anjiogenik peptid reseptörün N-terminal bölgesine bağlanır ve C-terminal bölgeden bağımsız olarak anjiogenez meydana gelir. Anti-anjiogenik olduğu bilinen plazminojen K5 ise anjiogenik peptidin bağlandığı N-terminal ucuna bağlanarak Grp78'in anjiogenik fonksiyonlarını interfere eder (3).

Yüzey Grp78, teratocarcinoma-derived growth factor 1 (Crito-1) ile kompleks yapar. Crito-1 embriyogenez, insan tümör progresyonu ile ilintili çeşitli sinyal yollarının da rol aldığı bir takım mekanizmada rol oynar. Ayrıca MHC-1 ile hücre yüzeyinde etkileşen Grp78'in oluşturduğu kompleks ise koksaki virüs-9 için reseptör fonksiyonu görür ve MHC-1 ilişkili endositoz meydana gelir (136).

ER'de kalsiyum depleksyonu ve un-glikolize protein birikmesi gibi stres durumlarında hücre yaşamının sürdürülmesinde Grp78 kritik rol oynamaktadır. Bu stres kaynakları kimyasal da olabilmektedir. Prostat kanser hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada kalsiyum ionofor olarak ionomycin (IM), glikozilasyon inhibitör tunicamycin (TM) 'in Grp78 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu ajanlardan ER kalsiyum depleksyonu yapan IM'nin Grp78'in yanında apoptozisi de indüklediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki Grp78 stres cevabında en az iki farklı yolak kullanılmaktadır (79, 65).



Şekil 7 Yüzey Grp78 ve ligandları (65)

2.4 DEKSAMETAZON

Glukokortikoid ailesinin bir üyesi olan deksametazonun anti-enflamatuvar, anti-emetik ve immünsüpresif etkileri bulunmaktadır. Glukokortikoidler, romatizmal hastalıklar ve alerjik durumların yanı sıra bazı kanser türlerinde kombine tedavide kullanılmaktadır. Etki mekanizmaları genomik ve non-genomik olmak üzere iki farklı başlık altında incelenebilir

Glukokortikoidler, ligand bağımlı nükleer reseptörler aracılığı ile genomik etkilerini gösterir. Aktive olan glukokortikoid reseptör kompleksi ile transkripsiyon aktivasyon veya inhibisyonu, translasyon ve spesifik düzenleyici protein sentezi meydana gelmektedir. Genomik etkilerinin ortaya çıkışı genomik olmayan etkilerine göre daha geç olmaktadır (14, 70).

Deksametazonun bilinen klasik genomik etkilerinden başka hızlı ve non-genomik etkileri de bulunmaktadır. Non-genomik etkileri ile ilgili üç farklı mekanizma tartışılmaktadır; 1) sitozolik glukokortikoid reseptör (cGCR) ile spesifik etkileşim 2) Hücre membranları ile non-spesifik etkileşimler 3) Membran bağımlı glukokortikoid reseptör ile spesifik etkileşimler (14).

İlk mekanizmaya göre glukokortikoidlerin cGRC ile ilişkili multi-protein komplekse bağlanması klasik yol olarak bilinen genomik etkilerin başlatılır. Aktive olan kompleks sonucunda klasik yolda transkripsiyon, translasyon, ve spesifik protein sentezi düzenlenir. Ancak bu işlemler için belli süre geçmesi gerekmektedir. Deksametazonun hızlı etkilerinin cGCR reseptörü ile etkileşimi sonucu olduğunu gen transkripsiyonun etkilenmediği rapor edilmiştir (22). Epidermal growth factor (EGF) tarafından stimüle edilen sitozolik PLA2'nin aktivasyonunun yol açtığı araşidonik asit salınması deksametazon tarafından inhibe edilir. Bu etkinin transkripsiyon bağımlı yani genomik olmadığı glukokortikoid-dependent olduğu ve non-genomik mekanizma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (115).

cGCR multi-protein kompleksi sitoplazmada Hsp90 ile inaktif haldedir. Bu kompleksde Src'yi de içine alan MAPK sinyal sistemi ile ilgili birkaç kinaz da bulunmaktadır. Deksametazonun komplekse bağlanması ile cGCR ve Src ayrılır. Bunların ayrı ayrı mekanizmalarla etkili olduğu düşünülmektedir. Özet olarak glukokortikoidlerin hızlı etkilerini multi-protein kompleksi üzerinden intraselüler sinyal yollarını kontrol ettiği söylenebilmektedir (87, 91).

İkinci mekanizmaya göre non-genomik etkiler, hücrel membranlarla non-spesifik etkileşimler sonucunda meydana gelmektedir. cGCR reseptörlerinin tam olarak doldurulması için 100-200 mg/gün prednisolon yeterli denmektedir. Yüksek doza bağlı elde edilen ek teröpatik faydaların farklı mekanizmalarla sağlandığı düşünülmektedir. Yapılan farklı çalışmaların sonucunda immün hücrelerde yüksek glukokortikoid kullanımının hızlı etkilerini enerji metabolizması üzerinden mi gerçekleştirdiği sorusu dikkat çekmiştir (7, 15).

Üçüncü mekanizmaya göre membran bağımlı GCR (mGCR) ile spesifik etkileşimler sonu olmaktadır. mGCR insan lösemi (T-Lenfoblast) hücrelerinde gösterilmiştir (36). Yapılan deneysel çalışmalarda aldosteronun düşük dozlarında sekonder mesaj sisteminde (Ca²⁺, IP₃, cAMP, PKC) hızlı etkileri gözlemlenmiştir (17, 19). mGCR ile ilgili yapılan çalışmalarda monositlerin ve B lenfositlerin % 25' de pozitif olduğunu göstermiştir. Ancak T-lenfositlerde tesbit edilmemiştir.

Monosit hücre izolasyonu sonrası yapılan hücre kültüründe, 10⁻⁸-10⁻⁶ M doz aralığında kullanılan deksametazonun doz ve zaman bağımlı olarak apoptozisi indüklediği ve bu etkisinin Mifepristone ile glukokortikoid reseptörü bloklandığında önlediği tespit edilmiştir (104).

İnsan lens epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada deksametazonun farklı dozları kullanılarak hücre üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca 0.1, 1, 10, ve 100 µM deksametazon ile inkübe edildikten sonra hücre canlılık testi (MTT) ve kaspaz 3 aktivitesi bakılmıştır. Sonuç olarak 0,1 µM dozda hücre proliferasyonu diğer dozlarda ise apoptozis meydana geldiği tesbit edilmiştir (89).

M. Schimit ve arkadaşları monosit hücre izolasyonu sonrası yapılan kültür çalışmasında 48 saat boyunca 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ ve 10⁻⁶ M deksametazon ile hücreleri inkübe etmişlerdir. Deneyin sonucunda deksametazonun monosit hücrelerinde doz ile doğru orantılı olarak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (105).

Buttgereit ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda LPS ile muamele edilen monosit hücrelerinde mGCR miktarının arttığını tespit etmişlerdir (8). LPS'nin İnsan lenfoma hücrelerinin kullanıldığı kültür çalışmalarında ER stresör ajan olan BRFA'nın neden olduğu apoptozisi önlediğine dair çalışma mevcuttur (133).

3. GEREÇ - YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler:

1. Santrifüj (MSE, MISTRAL 3000I, Serial no: 5691/02/075).
2. Mikropipetler (Sealpette Jencons 0.5-10, Treff Lab 20- 200, 100-1000, Genex Beta 10-100, 50, 2-20, Dialab 200-1000, Rainin Pipet-plus R 20, Socorex 50-200).
3. Mikrosantrifüj (SIGMA 3K30, Serial no: 76262).
4. Mikrosantrifüj (Jouan A-14, Seri no: 39903105).
5. 1,5 ml ve 0,6 ve nükleaz içermeyen eppendorf tüp (
6. 0,2 ml PCR tüp
7. Derin dondurucu (-70 °C, NUAIRE)
8. Benmari (ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N Serie: 3940517).
9. Vorteks (VM3, Windaus)
10. LightCycler 480 II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
11. Laminar-flow (Bilser, Seri no: 6087, Ankara, Türkiye)
12. Laminar-flow (Nuaire, Model no: Nu-425-400E)
13. High-pure PCR RNA isolation kit (Cat. No.11 828 665 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
14. Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Cat no. 04 379 012 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
15. Transcriptor reverse transcriptase (Cat no.03 531 295 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
16. LightCycler 480 Probe Master (04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
17. Human GAPDH forward-reverse (19/19 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL60, Cat No.04688589001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
18. Human Grp78 forward-reverse (18/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL39, Cat No. 04687973001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

19. Human Grp94 forward-reverse (24/23 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL62, Cat No.04688619001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
20. Human MTJ1 forward-reverse (20/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL32, Cat.No.04687655001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
21. Human HMOX1 forward-reverse (21/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL42, Cat.No.04688015001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
22. LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany Roche)
23. Rabbit Poliklonal IgG GRP 78 Antikoru, 200 µg/ml (H-129), ELISA uyumlu (SC-13968 Santa Cruise)
24. Goat Anti-Rabbit IgG (ALP konjuge) Poliklonal Antikor, 1 ml, ELISA uyumlu (Santa Cruise)
25. Ultrasonic Cleaner (Seri no: 030607)
26. Spektrofotometre (IMPLEN NanoPhotometer, Seri no: 1271,U.K.)
27. Güç kaynağı (Microcompiter Electrophoresis Power Supply BioKim International, S\N 42039)
28. pH metre (Microprocessor pH meter EDT Instruments RE 357)
29. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corparation, Seri no: 300258)
30. Distile su cihazı (Ecoro Reverse Osmosis Systems, USA)
31. PCR Cihazı (Genius ,Techne (Cambridge) Ltd, UK. Model: FGEN02CD)
32. Greiner Bio-one Cellstar Tissue Culture Flask (25 cm²) kırmızı kapak Cat No.690175 Grenier bio-one)
33. Greiner Bio-one Cellstar 96 well Cell Culture Plate (Cat no. 655 180 Grenier bio-one)
34. 20, 100, 200, 1000 µl pipet uçları, steril (Greiner)
35. 10 µl pipet ucu, steril (Neptune)
36. Biotek Synergy Micro-plate Reader

3.2 Kullanılan Kimyasallar

1. Dexamethasone powder, cell culture tested, powder, $\geq 97\%$, cell culture tested (Sigma Aldrich)
2. Brefeldin A, $\geq 99\%$, (HPLC and TLC), for molecular biology (Sigma Aldrich)
3. Lipopolisakkarides, Cell culture tested, γ -irradiated, from E.Coli 0111:B4 Powder (L-4391-1 MG, Sigma Aldrich)
4. 4-Phenyl Butyric acid, $\geq 99.0\%$ (HPLC) purum (Fluka)
5. RPMI1640, with 25 mM HEPES, with glutamin (Cat no.01 106 1 Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL)
6. Fetal Bovine Serum, Heat inactivated, Sterile filtered, insect cell culture tested (F7678 Sigma Aldrich)
7. Sodyum Pirüvat 100 mM (Cat No. 03042-1B Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL)
8. Tripsin-EDTA (%0.25 Tripsin, %0.02 EDTA) Cat No; 03052-1B Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
9. 10.000 Penisilin / 10 mg Streptomisin 100X (Cat No; P078, Sigma-Aldrich)
10. Dimethylsulfoxid (DMSO) (MERCK-Schuchardt, Art.802912)
11. PBS (Phosphat Buffer Salin), 10 mM, pH 7.4
 - NaCl, 136 mM (Merck, Art.6400)
 - KCl, 2.7 mM (Merck, Art.4935)
 - Na₂HPO₄, 10 mM (Merck, Art.6586)
 - KH₂PO₄, 10 mM (Merck, Art.4871)
12. HBSS pH: 7.2
 - NaCl, 8.0 gr, (Merck , Art.6400)
 - KCl, 0.40 gr, (Merck Art.4935)
 - Na₂HPO₄, 0.0477 gr, (Merck Art. 6586)
 - KH₂PO₄, 0.06 gr, (Merck Art.4871)
 - NaHCO₃, 0.35 gr, (Merck Art.6323)
 - D-Glukoz, 1.0 gr, (Sigma , G-5000)
13. Isopropanol (Merck, Art.995)
14. pH 4, pH 7, pH 10 kalibratörler (Orion Application Solution 910104, 910107, 910110 CAS Reg. No 7732-18-5)

3.3 HEp2 HÜCRE KÜLTÜRÜ

HEp2; Lariks epidermoid karsinom hücreleridir. Adheren karakterde olup epitel kaynaklıdır. Hücreler Mikrobiyoloji A.D öğretim üyesi Prof.Dr. Murat HÖKELEK ve Dr. Barış DÜZGÜN'ün katkılarıyla temin edilmiştir. Soğuk ortamda transfer edilen hücreler aşağıda verilen protokole göre pasajlanmıştır.

3.3.1 Hücre Kültür solüsyonları

1) RPMI 1640 Medyum pH; 7.4

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Cat No; 01.106.01
- With 25 mM HEPES, With glutamin, with Sodium Bicarbonate
- Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.

2) Fetal Bovin Serum (FBS)

- Sigma Aldrich, 500 ml
- Cat No; F7678
- Heat inactivated, Sterile filtered, insect cell culture tested
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklanır.

3) Sodyum Pirüvat 100 mM, 100 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Cat No; 03042-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklanır.

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

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

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

- Sigma-Aldrich, 100ml

- Cat No; P0781
- 15'lik falcon tüplere 5'er ml olacak şekilde aliqoutlanarak -70 °C'ye kaldırılır.

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

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

7) Hücre Kültür Komplek Medyum Hazırlığı

- FCS, -70°C'den 37 °C'ye alınarak çözülmesi sağlanır.
- Penisilin/streptomisin 100X, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlanır.
- Sodyum Pirüvat 100 mM, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlanır.
- 100 ml komplek RPMI 1640 medyum hazırlanması için tablo 1'deki miktarlardaki solüsyonlar lamina flow' da steril şartlara dikkat edilerek karıştırılır.

Tablo 1 Komplek RPMI 1640 Komplek Medyum Hazırlığı, 100 ml

	Volüm	Final konst.
FBS	10 ml	%10
Penisilin/Strep	1 ml	1x
Sodyum Pirüvat	1 ml	1x
RPMI 1640	88 ml	

0,22 µm'lik fitre ile steril cam şişeye filtre edilir. 2-8 °C'de saklanır.

8) RPMI 1640 Freeze-Medyum Hazırlığı, 10 ml

- RPMI 1640 komplek medyum benmaride 37 °C'ye getirilir.
- Kültür şartlarında, hücreler dondurulmadan önce %10 DMSO olacak şekilde DMSO eklenir.

- Freeze-Medyum sadece dondurulacak hücreler için kullanılır.
- Taze hazırlanmalıdır.

Tablo II Freeze Medyum, 10ml

	Volüm	Final konst.
RPMI 1640 Komplet Medyum	9 ml	% 90
DMSO	1 ml	% 10

3.3.2 Hücre Kültür Protokolleri

3.3.2.1 -70 °C’de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi

- -70 °C’den çıkarılan hücreler hızla çözülür
- 800 xg’de, 37 °C’de , 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır. Üzerine RPMI 1640 komplet medyum eklenir, karıştırılır.
- Hücreler pasteur pipeti ile flask’a pipetlenir ve üzerine RPMI 1640 komplet medyum eklenerek 5 ml’ye tamamlanır
- CO2 inkübatöre kaldırılır.

3.3.2.2 HEp2 hücrelerinin pasajlanması

- Flasktaki hücreler confluent olduğunda pasajlama yapılır.
- Flasktaki komplet medyum uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve yıkanır.
- PBS uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 1ml Tripsin-EDTA flaska ilave edilir ve 3-5 dk süreyle CO2 inkübatörde bekletilir.
- Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra Pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA’nın üzerine ~ 3-4 ml komplet medyum ilave edilir ve karıştırılır.
- Komplet medyum ve hücreler 15’lik falcon tüpte toplanır.
- 800 xg’de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılarak 5 ml komplet medyum ile resuspanse edilir.
- 4 flaska ~1’er ml dağıtılır ve RPMI 1640 komplet ile 5 ml’ye tamamlanır.

- CO2 inkübatöre alınır.
- Medium 2-3 gün aralıklarla değiştirilir.

3.3.2.3 HEp2 hücrelerinin dondurulması

- Flask'ın mediumu uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml PBS eklenerek yıkanır.
- Pasteur pipeti ile ~ 1 ml Tripsin-EDTA eklenerek 5 dk CO2 inkübatörde bekletilir.
- Mikroskopta hücre ayrılması izlendikten sonra ~ 2-3 ml RPMI 1640 komplet medyum eklenerek hücreler 15'lik falconda toplanır.
- 800 xg'de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır. Üzerine 5 ml freeze medium eklenir.
- 1'er ml aliqoutlanarak -70 °C'de saklanır.

3.3.3 Hücre Kültür Gruplarının Medyum Hazırlığı (Çalışma grup medyumları)

3.3.3.1 Dekametazone içeren hücre kültür Grubu

DEXAMETAZONE

Sigma Aldrich , MW; 392,46 g

100 mg, cell culture tested, powder, ≥ 97%

Stok Solüsyon;

- 5 mg dexametazone tartılarak 1 ml DMSO içinde çözünmesi sağlanır.
- 5 mg/ml Dexametazone stok solüsyonu elde edilmiştir.
- Stok solüsyon 100 µl'lik alikotlara bölünerek -70'e kaldırılır.

1 µM/ 10 ml Dexamethasone komplet medyum içinde;

- Hazırlanan stok solüsyondan 10 µl alınır ve 990 µl RPMI 1640 medyum eklenerek 100 kat dilüe edilir. (RPMI 1640 Biological Industries)
- Elde edilen son solüsyondan 78 ul alınarak komplet medyum ile 10 ml' ye tamamlanır.

0.1 um Dmx 10 ml komplet medyum içinde hazırlamak için ise 100 kat dilüe edilen stok solüsyondan 7.8 µl alınarak 10 ml komplet medyuma eklenir.

Hesaplama

- 5 mg Dmx / 1 ml DMSO içinde hazırlandığında elde edilen solüsyon 12.7 mM olur.

$$12700 \text{ uM stok } *? \text{ ul} = 10000 \text{ ul} * 0.1 \text{ uM}$$

? 0.078 ul alınması zor olduğundan stok solüsyon 100 kat dilüe edilmelidir

3.3.3.2 4- PHENYLBUTYRİC ACİD (PBA) içeren hücre kültür grubu

F luka, MW; 164,20 g

100 g, ≥ 99.0% (HPLC) purum

10 mM PBA hazırlanması (stok solüsyon)

- 8,21 mg PBA tartılarak 5 ml RPMI 1640 içinde 37 C° de çözdürülür.

1 mM PBA 10 ml komplet medyum içinde ;

- 1 ml 10 mM'lık PBA solüsyonundan alınarak komplet medyum ile 10 ml' ye tamamlanır.

3.3.3.3 BREFELDİN A içeren hücre kültür grubu

Sigma Aldrich, MW; 280,36 g

5 mg, ≥ 99.0%,(HPLC and ,TLC), for molecular biology

Stok solüsyon Hazırlanması;

- Stok solüsyon 5mg/ ml olacak şekilde 1 ml DMSO içinde hazırlanır. 5 mg brefeldin A içeren şişenin içine 1 ml DMSO eklenerek elde edilir.
- Stok solüsyon 100 µl'lik alikotlara bölünerek -70'e kaldırılır.
- Stok solüsyondan 10 µl alınarak 90 µl RPMI medyum eklenerek 10 kat dilüsyon sağlanır.

100 ng/ ml Brefeldin A 10 ml komplet medyum içinde;

- 10 kat dilüe edilen stok solüsyondan 2 µl alınarak 10 ml komplet medyum içine eklenir.

3.3.3.4 LİPOPOLYSACCHARİDES içeren hücre kültür grubu

Sigma Aldrich, L4391-1 MG

Cell Culture Tested, γ -irradiated, from Escherichia Coli 0111:B4 Powder

Stok Solüsyon;

- 1 mg LPS 1 ml distile su içinde çözündürülür.
- Stok solüsyon 100 μ l'lik alikotlara bölünerek -70'e kaldırılır

100 ng / ml LPS 10 ml komplet medyum içinde;

- Stok solüsyondan 1ul alınarak 10 ml komplet medyuma eklenir.

3.3.3.5 Çalışma Gruplarının İçerikleri

Kontrol grubu

0.1 μ M Lipopolisakkarit

0.1 μ M Brefeldin A

0.1 μ M Lipopolisakkarit ve 0.1 μ M Brefeldin A

0.1 μ M Lipopolisakkarit ve 1 μ M Deksametazon

0.1 μ M Lipopolisakkarit ve 0.1 μ M Deksametazon

1 μ M Deksametazon

0.1 μ M Deksametazon

0.1 μ M Deksametazon ve 1 mM PBA

1 μ M Deksametazon ve 1 mM PBA

0.1 μ M Deksametazon ve 1 mM PBA ve 0.1 μ M L.P.S

1 μ M Deksametazon ve 1 mM PBA ve 0.1 μ M L.P.S

3.3.4 HEp2 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması

3.3.4.1 Hücrelerin 96 kuyucuklu pleyte ekilmesi

- Confluent olan HEp2 kültür hücrelerine ait flastaki medium boşatılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve yıkanır. PBS uzaklaştırılır.
- Flaska ~ 1 ml tripsin-EDTA (%0,25-%0.02) koyulur.
- 5 dakika CO2 inkübatörde bekletilir.
- Üzerine yaklaşık 5,5 ml RPMI 1640 komplet medyum koyulur.
- Pastör pipet ile bir-kaç kez al/ver yapılır. Hücre sayımı yapılır.
- 96'lık pleyte her bir kuyucuğa 10^4 hücre/200 μ l olacak şekilde hücreler dağıtılır.

- 37 °C’de CO₂ inkübatöründe inkübe edilir. Hücrelerin confluent olması beklenir.

3.3.4.2 HEp2 hücre RNA izolatları için hücre ekimi

Yukarıda anlatılan hücre ekimi sonucu konfluent olması sağlanan hücrelerin medyumları alınarak her bir kuyucuk pleyt dizaynında gösterildiği gibi 200 µl uygun çalışma medyumları ile muamele edilir. Çalışmada numuneler çift kullanılmıştır. RNA izolatları için pleyt dizaynı aşağıda gösterilmiştir.

RT-PCR GEN EKSPRESYONU İÇİN PLATE DİZAYNI

Tablo III 1. pleyt

6.1.1	6.2.1	6.3.1	6.4.1	6.5.1	6.6.1	6.7.1	6.8.1	6.9.1	6.10.1	6.11.1	6.12.1
6.1.2	6.2.2	6.3.2	6.4.2	6.5.2	6.6.2	6.7.2	6.8.2	6.9.2	6.10.2	6.11.2	6.12.2
12.1.1	12.2.1	12.3.1	12.4.1	12.5.1	12.6.1	12.7.1	12.8.1	12.9.1	12.10.1	12.11.1	12.12.1
12.1.2	12.2.2	12.3.2	12.4.2	12.5.2	12.6.2	12.7.2	12.8.2	12.9.2	12.10.2	12.11.2	12.12.2
24.1.1	24.2.1	24.3.1	24.4.1	24.5.1	24.6.1	24.7.1	24.8.1	24.9.1	24.10.1	24.11.1	24.12.1
24.1.2	24.2.2	24.3.2	24.4.2	24.5.2	24.6.2	24.7.2	24.8.2	24.9.2	24.10.2	24.11.2	24.12.2
48.1.1	48.2.1	48.3.1	48.4.1	48.5.1	48.6.1	48.7.1	48.8.1	48.9.1	48.10.1	48.11.1	48.12.1
48.1.2	48.2.2	48.3.2	48.4.2	48.5.2	48.6.2	48.7.2	48.8.2	48.9.2	48.10.2	48.11.2	48.12.2

Tablo IV 2. pleyt

72.1.1	72.2.1	72.3.1	72.4.1	72.5.1	72.6.1	72.7.1	72.8.1	72.9.1	72.10.1	72.11.1	72.12.1
72.1.2	72.2.2	72.3.2	72.4.2	72.5.2	72.6.2	72.7.2	72.8.2	72.9.2	72.10.2	72.11.2	72.12.2

1. Sütun Kontrol
2. Sütun 0.1 µM Lipopolisakkarit
3. Sütun 0.1 µM Brefeldin A
4. Sütun 0.1 µM Lipopolisakkarit ve 0.1 µM Brefeldin A
5. Sütun 0.1 µM Lipopolisakkarit ve 1 µM Deksametazon
6. Sütun 0.1 µM Lipopolisakkarit ve 0.1 µM Deksametazon
7. Sütun 1 µM Deksame
8. Sütun 0.1 µM Deksametazon
9. Sütun 0.1 µM Deksametazon ve 1 mM PBA
10. Sütun 1 µM Deksametazon ve 1 mM PBA
11. Sütun 0.1 µM Deksametazon ve 1 mM PBA ve 0.1 µM L.P.S
12. Sütun 1 µM Deksametazon ve 1 mM PBA ve 0.1 µM L.P.S

6.1.2 : 6=saat,
1= sütun ve gruplar,
2= örnek numarası

3.4 RT-PCR İLE GEN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI

3.4.1 RNA İzolasyon Protokolü

Tablo V

	High Pure RNA izolasyon protokolü
	Protokol HEp2 hücre kültüründen elde edilen örneklere uygulanmıştır.
1.	Hücreler, 200 µl PBS ile resüspanse edilir.
2.	Lizis/Binding Buffer' dan 400 µl (green cap) eklenir ve 15 s. vortekslenir.
3.	Numuneyi Filtreli tüpe transfer etmek için: <ul style="list-style-type: none">• Filtreli tüp, toplayıcı tüpe yerleştirilir.• Numunenin tamamı filtreli tüpe pipetlenir (max. 700 µl)
4.	<ul style="list-style-type: none">• Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika, 14000 rpm' de santrifüj edilir.
5.	Santrifüj sonrası: <ul style="list-style-type: none">• Toplayıcı tüpten artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp tekrar yerleştirilir.
6.	Fitler tüp yerleştirildikten sonra: <ul style="list-style-type: none">• Steril bir reaksiyon tüpüne her numune için 90 µl DNase Incubation Buffer (white cap) pipetlenir, üzerine 10 µl DNase I eklenerek karıştırılır. Solüsyon filtreli tüpe transfer edilir.• 15 dakika, +15 to +25°C' inkübe edilir.
7.	<ul style="list-style-type: none">• Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer I pipelenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilir.• Artık uzaklaştırılır ve Filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
8.	<ul style="list-style-type: none">• Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer II (blue cap) pipetlenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilir.• Artık uzaklaştırılır ve Fiiltreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
9.	<ul style="list-style-type: none">• Filtreli tüpe 200 µl Wash Buffer II (blue cap) pipetlenir ve oda sıcaklığında 2 dakika maksimum hızda (approx. 14000 rpm) gerideki Wash buffer'ın uzaklaşması sağlanır.
10.	<ul style="list-style-type: none">• Toplayıcı tüp atılarak filtreli tüp temiz, steril 1,5 ml'lik mikro-santrifüj tüpe yerleştirilir.
11.	RNA'yı elüe etmek için: <ul style="list-style-type: none">• Filtreli tüpe 100 µl Elution Buffer pipetlenir.

	<ul style="list-style-type: none"> Oda sıcaklığında 1 dakika, 14000 rpm’de santrifüj edilir.
12.	<ul style="list-style-type: none"> Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe RNA’dır. Elüe RNA direk RT-PCR için kullanılır ya da –80°C’de daha sonra analiz edilmek üzere saklanır.

Numune materyali

- 10⁶ kültüre HEp2 hücreleri

Çalışma solüsyonlarının hazırlığı

Tablo 6

İçerik	Rekonstitüsyon/Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase 1(Vial 2)	DNase I 0.55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır ve –15–25 ° C’de saklanır. 12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır.
Wash Buffer 1 (Vial 4;blackcap)	20 ml absolü etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15–25 °C’de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için Kullanılır.
Wash Buffer II (Vial 5; blue cap)	40 ml absolü etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15–25 °C’de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için Kullanılır.

3.4.2 RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü

Tablo 7

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) ile Thermal Cycler'da																					
PROTOKOL																					
1.	<ul style="list-style-type: none">• Kullanmadan önce tüm reaktifler çözülmelidir.• Protokol uygulamadan önce tüm reaktifler kısa süreli santrifüj edilmelidir.• Reaksiyon düzenlenirken tüm reaktifler buz üzerinde tutulmalıdır.																				
2.	<ul style="list-style-type: none">• Buz üzerinde ya da soğuk kolon üzerinde tutulan Steril, nucleaz-free, PCR tüpte, aşağıdaki sırada pipetleme yapılarak template-primer karışımı reaksiyon başına 50 µl olacak şekilde hazırlanır.<ul style="list-style-type: none">➤ RNA numunesine daima eldivenle temas edilmelidir. <p>Template-primer karışımı (1 reaksiyon için)</p> <table border="1"><thead><tr><th></th><th>İçerik</th><th>vol</th><th>Final kons.</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Water, PCR-grade (vial 8)</td><td>-----</td><td>32,5 µl'ye tamamlayacak şekilde</td></tr><tr><td>2</td><td>total RNA</td><td>30 µl</td><td>1 µg total RNA</td></tr><tr><td>3</td><td>Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl (vial 5)</td><td>2,5 µl</td><td>2.5 µM</td></tr><tr><td></td><td>Total volume</td><td>32,5 µl</td><td></td></tr></tbody></table>		İçerik	vol	Final kons.	1	Water, PCR-grade (vial 8)	-----	32,5 µl'ye tamamlayacak şekilde	2	total RNA	30 µl	1 µg total RNA	3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl (vial 5)	2,5 µl	2.5 µM		Total volume	32,5 µl	
	İçerik	vol	Final kons.																		
1	Water, PCR-grade (vial 8)	-----	32,5 µl'ye tamamlayacak şekilde																		
2	total RNA	30 µl	1 µg total RNA																		
3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl (vial 5)	2,5 µl	2.5 µM																		
	Total volume	32,5 µl																			
3.	<ul style="list-style-type: none">• Template-primer karışımı içeren tüp 10 dakika 65°C'de termal cycler cihazında tutularak denatürasyon sağlanır. (evaporasyonu minimize etmek için)• Bu basamak RNA sekonder yapısının denatürasyonunu sağlar.• Bu amaçla Gene Amp 9700 Thermal Cycler, 'cdna1' program kullanılmıştır.• Tüp daha sonra acele olarak soğuk ortama alınır.																				
4.	<p>Template-primer karışımını içeren tüpe sırasıyla aşağıdaki maddeler pipetlenir.</p> <table border="1"><thead><tr><th>İçerik</th><th>Vol (1 reaksiyonluk)</th><th>Final kons.</th></tr></thead><tbody><tr><td>Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc. (vial 2)</td><td>10 µl</td><td>1× (8 mM MgCl₂)</td></tr><tr><td>Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl (vial 3)</td><td>1,25 µl</td><td>20 U</td></tr><tr><td>Deoxynucleotide Mix, 10 mM each (vial 4)</td><td>5 µl</td><td>1 mM each</td></tr><tr><td>Transcriptor Reverse Transcriptase 20 U/µl (vial 1)</td><td>1,25 µl</td><td>10 U (per reax)</td></tr></tbody></table>	İçerik	Vol (1 reaksiyonluk)	Final kons.	Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc. (vial 2)	10 µl	1× (8 mM MgCl ₂)	Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl (vial 3)	1,25 µl	20 U	Deoxynucleotide Mix, 10 mM each (vial 4)	5 µl	1 mM each	Transcriptor Reverse Transcriptase 20 U/µl (vial 1)	1,25 µl	10 U (per reax)					
İçerik	Vol (1 reaksiyonluk)	Final kons.																			
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc. (vial 2)	10 µl	1× (8 mM MgCl ₂)																			
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl (vial 3)	1,25 µl	20 U																			
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each (vial 4)	5 µl	1 mM each																			
Transcriptor Reverse Transcriptase 20 U/µl (vial 1)	1,25 µl	10 U (per reax)																			

		Total volüm	17,5 µl		
		Final volume	50 µl		
5.	<ul style="list-style-type: none"> • Tüpteki reaktifleri iyice karıştırılır. • Vorteks yapılmamalıdır! • Tüp termal Cycler cihazına yerleştirilir. 				
6.	<ul style="list-style-type: none"> • 60 dakika, 50°C’de inkübasyona bırakılır. • Transcriptor Reverse Transcriptase inaktivasyonu için tüpü, 85°C’de 5 dakika bekletilir. • Gene Amp 9700 Thermal Cycler, ‘cdna-oligo-trans’ program kullanılmıştır. 				
7.	<ul style="list-style-type: none"> • Tüpü buz üzerine alarak reaksiyonu durdurulur. • Bu noktada reaksiyon tüpü +2 to +8°C’de 1-2 saat ya da 15 to -25°C’de daha uzun süre saklanabilir. 				
8.	<ul style="list-style-type: none"> • cDNA purifikasyona gerek olmadan PCR için kullanılabilir. • PCR için bir LightCycler® instrument için 20 µl reaksiyon hacmi içinde 2 – 5 µl cDNA kullanılmalıdır. 				

3.5 Grp-78 Cell ELISA Protokol

- 1) Confluent HEP-2 hücreleri flasktan Tripsin (0,25 %)-EDTA (0,02 %) ile kaldırılır
- 2) 10000-20000 aderant hücre/well/ 200 µl olacak şekilde hücre 96'lık plate'e ekilir, bir gece 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübe edilir
- 3) 70-80 % confluent olmalıdır
- 4) Plate içine tüm ilave ve aspirasyonlar hücreyi kaldırmayacak şekilde kuyu kenarından multikanal pipettörle nazikçe yapılmalıdır
- 5) Büyüme medymu uzaklaştırılıp 200 µl 1x PBS ile 20 saniye nazikçe vurarak yıkanır, sonra sıvı aspire edilir
- 6) 100 µl 3.7 % formaldehit (1xPBS içinde) ile hücreler fikse edilir, plate kapatılır, oda ısısında 20 dk inkübe edilir, plate'e nazikçe vurulur
Maksimum sensitivite için fiksasyondan sonra yöntem hemen uygulanmalıdır
(Alternatif olarak fikse hücreleri içeren plate, fiksasyon sıvısı uzaklaştırılıp 2-8 °C'de 2 hafta saklanabilir)
- 7) Otomatik washer ile sıvı aspire edilir, 3 kez 5'er dk nazikçe shaking yaparak 300 µl 1x wash buffer ile formaldehit uzaklaştırılır
- 8) Wash buffer uzaklaştırılıp 100 µl blocking buffer eklenir, plate kapatılır, 20-25 °C de orta hızda shaking platformda 1 saat inkübe edilir
- 9) Otomatik washer ile 3 kez 5'er dk nazikçe shaking yaparak 300 µl 1x wash buffer ile yıkanır ve blocking buffer uzaklaştırılır
- 10) Kontrol kuyucuğu primer antikor içermez, bu kuyucuğun absorbans değeri tüm kuyulardan çıkartılır.
- 11) PBS ile 1/1000 dilüe primer antikor 100 µl/well eklenir, plate kapatılır, 20-25 °C de orta hızda shaking platformda 90 dakika inkübasyon yapılır
(2 plate için 20 ml PBS içinde 20 µl primer antikor hazırlandı)
Primer antikor kültür odası 2-8 dolabında kapakta bulunmaktadır
- 12) Otomatik washer ile 3 kez 5'er dk nazikçe shaking yaparak 300 µl 1x wash buffer ile yıkanır
- 13) Barbiton buffer ile 1/10000 dilüe sekonder antikor 100 µl/well eklenir, plate kapatılır, 20-25 °C 'de orta hızda shaking platformda 90 dakika inkübasyon yapılır
(2 plate için 18 ml Barbiton buffer + 2 ml 1/1000 dilüe sekonder antikor hazırlandı)

Barbiton buffer ile 1/1000 dilüe edilmiş sekonder antikor -70 C'de 1. rafta bulunmaktadır

- 14) Otomatik washer ile 4 kez 5'er dk nazikçe shaking yaparak 300 µl/well 1x wash buffer ile yıkanır
- 15) Son yıkamadan sonra plate ters çevrilip nazikçe vurularak kuyucuklarda kalan sıvı tamamen uzaklaştırılır
- 16) 100 µl TMB substrat solüsyonu eklenir, plate ışıktan korunur, 5 dakikada bir 40 dk boyunca 655 nm' de okutulur.

Janus Green ile boyama:

- 1) Otomatik washer ile plate içeriği boşaltılır, plate 2 kez 300 µl ultrapure su ile yıkanır
- 2) Su uzaklaştırılır ve 100 µl Janus Green B solüsyonu eklenir, 5 dk 20-25 °C'de inkübe edilir, ışıktan korunur
- 3) Otomatik washer ile boya uzaklaştırılır ve 3 kez 300 µl/well ultrapure su ile boya uzaklaşınca kadar yıkanır
- 4) Su uzaklaştırılır ve 200 µl/well elüsyon buffer eklenir, 10 dk 20-25 °C de inkübe edilir, 615 nm'de absorbans ölçülür
- 5) Net A₆₃₀ değeri A₆₁₅ değerine bölünerek normalizasyon yapılır
- 6) Sonuçlar kontrolün katı şeklinde verilir

Not: Janus Green boyama protokolü mitokondrial disfonksiyon bulunan durumlar dışında kullanılmalıdır.

Solüsyonlar:

Wash Buffer (1xPBS):

10x PBS: 1 L hazırlamak için 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na₂HPO₄, 13.6 g KH₂PO₄ dH₂O ile 1 litreye tamamlanır, pH 7.4

Blocking Buffer: 4 °C de saklanır.

1 % BSA içeren PBS, sonikasyon yapılır.

2 plate için 0,2 g BSA tartılıp PBS ile 20 ml'ye tamamlandı, sonikasyon yapıldı.

Fixing Buffer:

1x PBS içinde 3.7 % Formaldehit

0.5 ml 37 % formaldehit ile 4.5 ml PBS karıştırılırsa 3.7 % Formaldehit elde edilmiş olur.

Formaldehit toksiktir, eldiven ve göz koruyucu kullanılmalıdır, çeker ocakta çalışılır, taze olarak hazırlanır.

2 plate için 2 ml Formaldehit + 18 ml PBS hazırlandı.

Elüsyon Buffer:

0.5 N HCl 100 ml hazırlamak için;

0.5 N= 0.5 M 0.5= n/ 0.1 n= 0.05 mol

0.05= m/ 36.46 m= 1.82 g

1.19 g 1.19x0.37 g

X 1.82 g

X= 4.92 g HCl tartılır, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Janus Green B solüsyonu:

PBS içinde 0.2 % purifiye Janus Green B (pH 7.1-7.2)

Taze hazırlanır, ışıktan korunur.

5 ml hazırlamak için 0,001 g Janus Green B tartılır, PBS ile 5 ml'ye tamamlanır.

2 plate için 0,004 g Janus Green B tartıldı PBS ile 20 ml'ye tamamlandı.

Barbiton Buffer: 0.06 M, pH: 8.6, 100 ml

0.06 M 5'5 dietil barbitürik asid ile 1 mM CaCl₂

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.5.1 Grp78 Cell ELISA için pleyt dizaynı

Tablo 8

0.1.1	BLK	BLK	0.4.	0.5.	0.6.	0.7.	0.8.	0.9.	0.10	0.11.	0.12.
6.1.2	6.2.	6.3.	6.4.	6.5.	6.6.	6.7.	6.8.	6.9.	6.10.	6.11.	6.12.
6.1.1	6.2.	6.3.	6.4.	6.5.	6.6.	6.7.	6.8.	6.9.	6.10.	6.11.	6.12.
6.1.1	6.2.	6.3.	6.4.	6.5.	6.6.	6.7.	6.8.	6.9.	6.10.	6.11.	6.12.
12.1.2	12.2.	12.3.	12.4,	12.5.	12.6.	12.7.	12.8.	12.9.	12.10.	12.11.	12.12.
12.1.1	12.2.	12.3.	12.4,	12.5.	12.6.	12.7.	12.8.	12.9.	12.10.	12.11.	12.12.
12.1.1	12.2.	12.3.	12,4.	12.5.	12.6.	12.7.	12.8.	12.9.	12.10.	12.11.	12.12.
24.1.1	24.2.	24.3.	24.4.	24.5.	24.6.	24.7.	24.8.	24.9.	24.10.	24.11.	24.12.

Tablo 9

24.1.2	24.2.	24.3.	24.4.	24.5.	24.6.	24.7.	24.8.	24.9.	24.10.	24.11.	24.12.
BLK	24.2.	24.3.	24.4.	24.5.	24.6.	24.7.	24.8.	24.9.	24.10.	24.11.	24.12.
BLK	48.2.	48.3.	48.4.	48.5.	48.6.	48.7.	48.8.	48.9.	48.10.	48.11.	48.12.
48,1,1	48.2.	48.3.	48.4.	48.5.	48.6.	48.7.	48.8.	48.9.	48.10.	48.11.	48.12.
48,1,2	48.2.	48.3.	48.4.	48.5.	48.6.	48.7.	48.8.	48.9.	48.10.	48.11.	48.12.
72,1,1	72.2.	72.3.	72.4.	72.5.	72.6.	72.7.	72.8.	72.9.	72.10.	72.11.	72.12.
72,1,2	72.2.	72.3.	72.4.	72.5.	72.6.	72.7.	72.8.	72.9.	72.10.	72.11.	72.12.
72,1,2	72.2.	72.3.	72.4.	72.5.	72.6.	72.7.	72.8.	72.9.	72.10.	72.11.	72.12.

3.6 Biyoinformatik Analiz

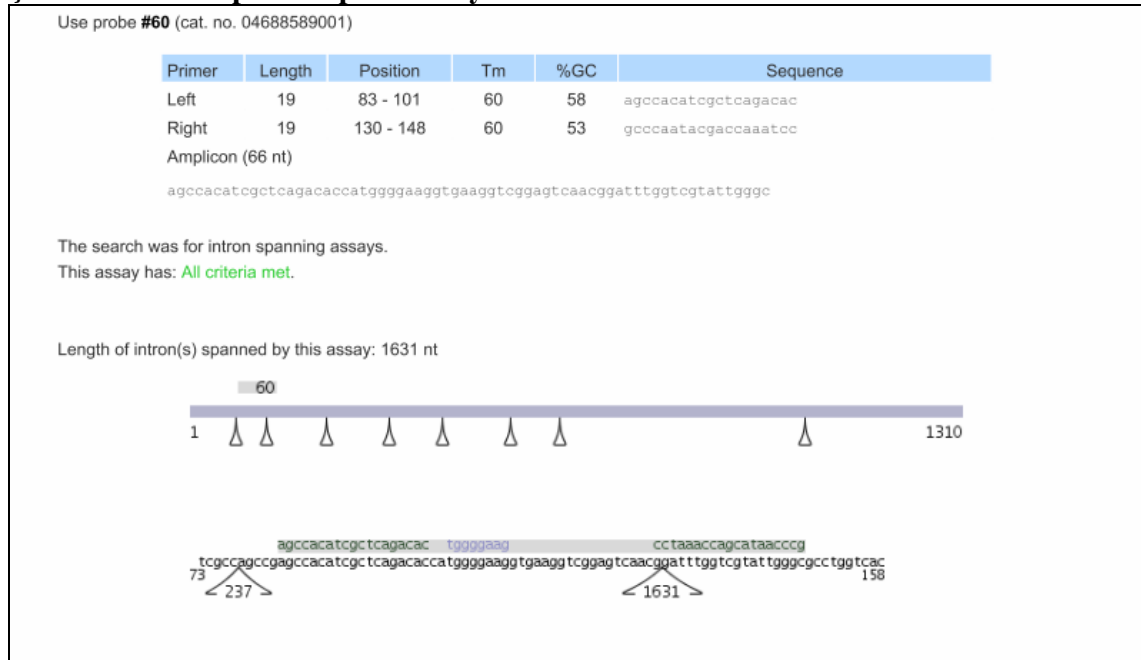
3.6.1 Primer prob Dizaynı

İyi düzenlenmiş primerler ve probalar doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon ya da genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilir. Bu nedenle primer ve probaların düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

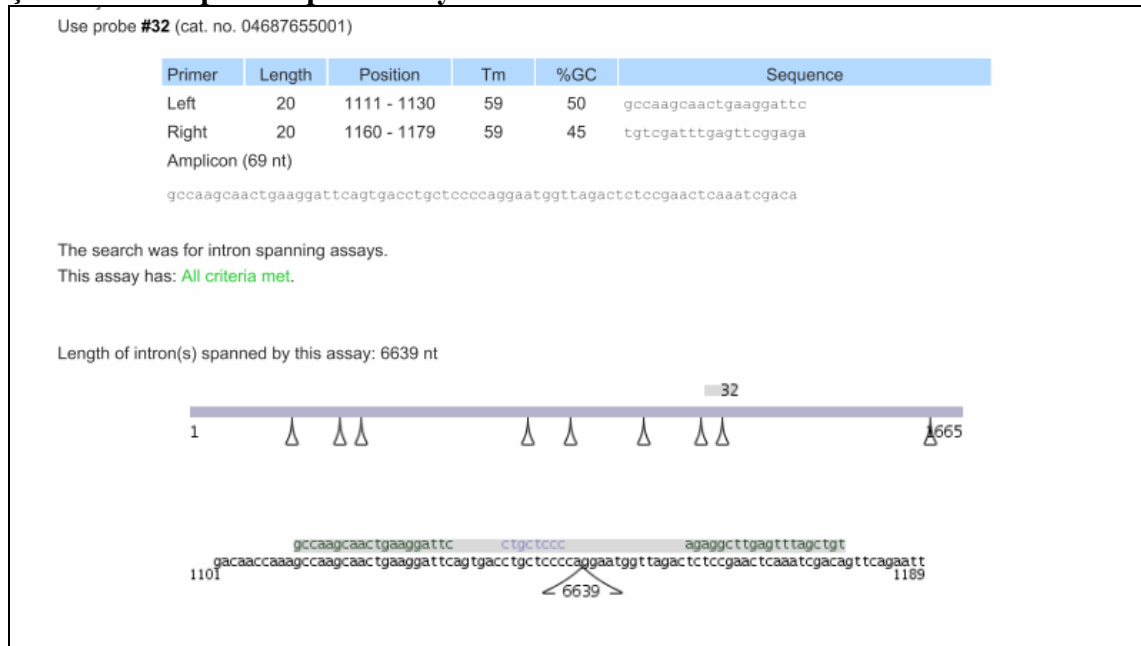
1. Tm dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalı
2. G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı
3. Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı
4. Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
5. Maksimum ampikon büyüklüğü 400 bp'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
6. Problar ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G),
7. Problardaki % 30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı,
8. Probların 5' ucunda G olmamalı (40).

Çalışmada kullanılan hoese-keeping gen olan GAPDH ve UPR genlerinin primer-prob dizaynları Roche Universal Probe Library (UPL) kullanılarak yapılmış ve BLAT, Blast Analizleri ile doğruluğu teyit edilmiştir. Aşağıdaki tablolarda dizayn şekilleri görülmektedir.

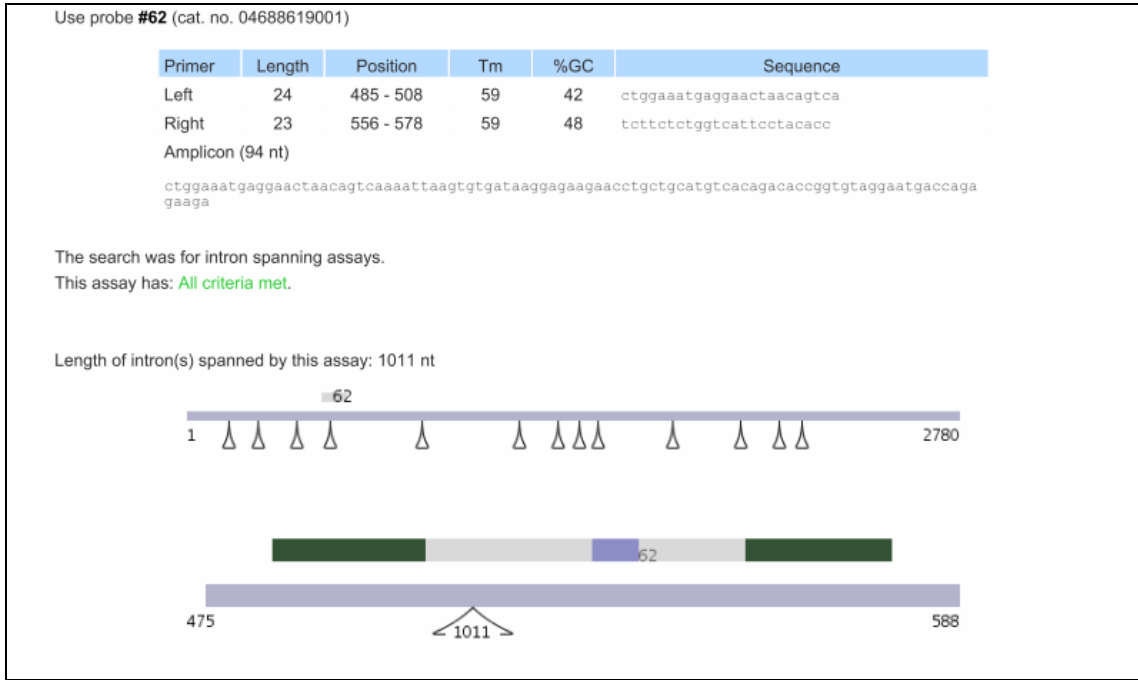
Şekil 8 GAPDH primer-prob dizaynı



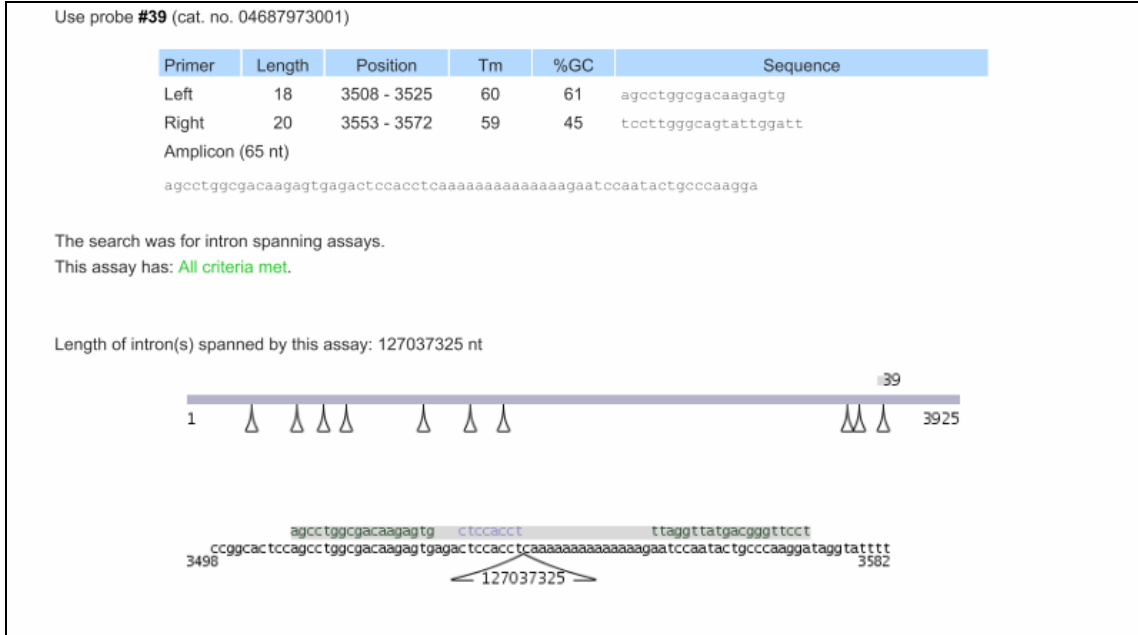
Şekil 9 MTJ1 primer-prob dizaynı



Şekil 10 Grp94 primer-prob dizaynı



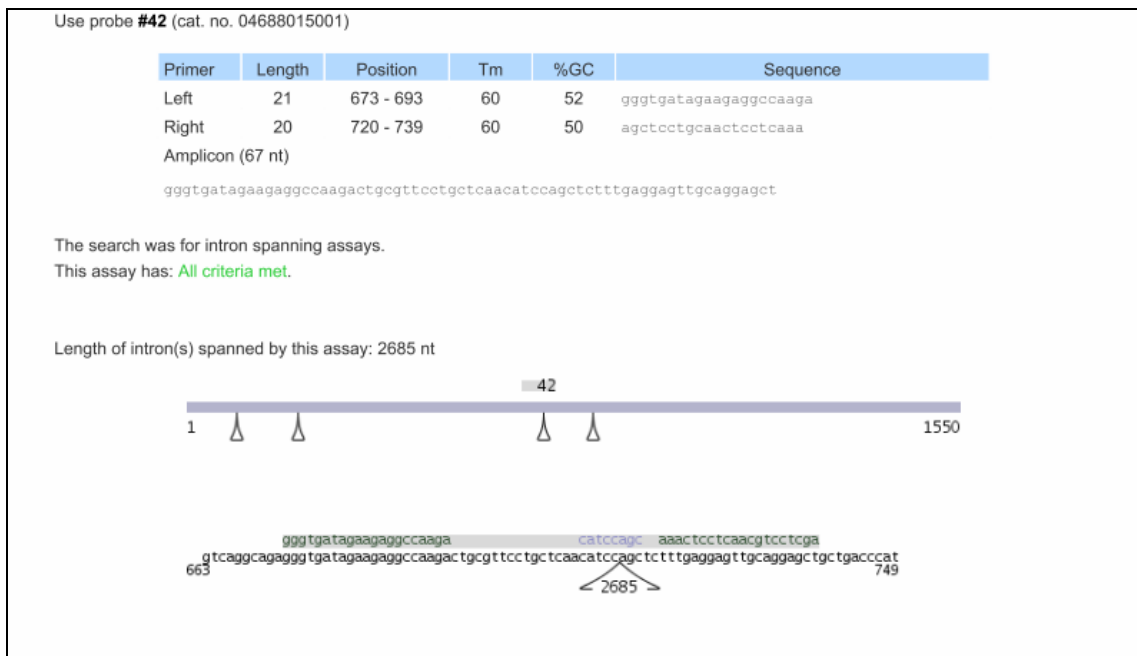
Şekil 11 Grp78 primer-prob dizaynı



Şekil 12 CHOP primer-prob dizaynı



Şekil 13 HMOX1 primer-prob dizaynı



3.6.2 UPR gen ekspresyonları için RT-PCR protokolü

Tablo 10

Items	Volume	Initial concent	Final concent	x100
Water, PCR-grade (vial 2)	5,8 µL			580 µL
GAPDH -Prim _{forw} (60)	1 µL	10 µM	0,5 µM	100 µL
GAPDH -Prim _{rev} (60)	1 µL	10 µM	0,5 µM	100 µL
LNA Hydrolysis Probe (LNA 60)	0,2 µL	10 µM	0,1 µM	20 µL
LC 480 Probe Master (vial 1)	10 µL	2X	1X	1000 µL
Total Master volüm				1800 µL
Total Master volüm/100				18 µL
cDNA Template	2 µL			
Total Volume	20 µL			

- ❖ Pleyt pipetlemeler bittikten sonra sealing ile kapatılarak 2 dakika oda sıcaklığında 500xG'de uygun adaptör kullanılarak santrifüj edilmelidir.

UPR gen ekspresyonları için program:

Program name	Cycles	Analysis mode
Pre-incubation	1	None
Amplification	50	Quantification
Cooling	1	None

Temperature Targets:

Pre-incubation

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
95	None	00:10:00	4.4

Amplification

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
95	None	00:00:10	4.4
55	None	00:00:15	2.2*
72	Single	00:00:01	4.4

Cooling:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
40	None	00:00:10	1.5

4. BULGULAR

4.1 RNA Kantitasyonu

Aşağıdaki tablolarda HEp2 hücrelerinden elde edilen RNA izolatlarının saat ve gruplara göre kantitasyonu verilmiştir.

TABLO XI

RNA 6. SAAT KANTİTASYON SONUÇLARI							
	A 230	A 260	A 280	A 320	A260/280	A 260/230	µg/ml
RNA 6.1.1	0,04	0,028	0,016	0,002	1,750	0,7	11,2
RNA 6.1.2	0,037	0,034	0,021	0,0003	1,619	0,919	13,6
RNA 6.2.1	0,052	0,049	0,028	0,0005	1,750	0,942	19,6
RNA 6.2.2	0,138	0,071	0,042	0,012	1,69	0,514	28,4
RNA 6.3.1	0,032	0,03	0,016	0,003	1,875	0,938	12
RNA 6.3.2	0,056	0,053	0,031	0,007	1,71	0,946	21,2
RNA 6.4.1	0,046	0,037	0,021	0,005	1,762	0,804	14,8
RNA 6.4.2	0,065	0,053	0,034	0,009	1,559	0,815	21,2
RNA 6.5.1	0,04	0,041	0,023	0,004	1,783	1,025	16,4
RNA 6.5.2	0,034	0,037	0,019	0,001	1,947	1,088	14,8
RNA 6.6.1	0,065	0,056	0,034	0,008	1,647	0,862	22,4
RNA 6.6.2	0,069	0,06	0,036	0,008	1,667	0,87	24
RNA 6.7.1	0,05	0,038	0,021	0,004	1,81	0,76	15,2
RNA 6.7.2	0,06	0,045	0,029	0,007	1,552	0,75	18
RNA 6.8.1	0,056	0,031	0,021	0,008	1,476	0,554	12,4
RNA 6.8.2	0,044	0,037	0,021	0,003	1,762	0,841	14,8
RNA 6.9.1	0,048	0,045	0,027	0,004	1,667	0,938	18
RNA 6.9.2	0,04	0,04	0,022	0,003	1,818	1	16
RNA 6.10.1	0,041	0,035	0,02	0,002	1,75	0,854	14
RNA 6.10.2	0,074	0,064	0,04	0,008	1,6	0,865	25,6
RNA 6.11.1	0,048	0,048	0,027	0,003	1,778	1	19,2
RNA 6.11.2	0,059	0,05	0,029	0,006	1,724	0,847	20
RNA 6.12.1	0,035	0,035	0,019	0	1,842	1	14
RNA 6.12.2	0,041	0,047	0,025	0,001	1,88	1,146	18,8

Tablo XII

RNA 12. SAAT KANTİTASYON SONUÇLARI							
	A 230	A 260	A 280	A 320	A260/280	A 260/230	µg/ml
RNA 12.1.1	0,047	0,053	0,03	0,007	1,767	1,128	21,2
RNA 12.1.2	0,036	0,057	0,031	0,004	1,839	1,583	22,8
RNA 12.2.1	0,06	0,071	0,041	0,009	1,732	1,183	28,4
RNA 12.2.2	0,047	0,064	0,036	0,006	1,778	1,362	25,6
RNA 12.3.1	0,043	0,049	0,028	0,005	1,750	1,140	19,6
RNA 12.3.2	0,024	0,037	0,020	0,003	1,850	1,542	14,8
RNA 12.4.1	0,032	0,047	0,026	0,004	1,808	1,469	18,8
RNA 12.4.2	0,029	0,052	0,027	0,002	1,926	1,793	20,8
RNA 12.5.1	0,037	0,029	0,017	0,006	1,706	1,784	11,6
RNA 12.5.2	0,037	0,057	0,03	0,003	1,900	1,541	22,8
RNA 12.6.1	0,033	0,034	0,021	0,005	1,619	1,03	13,6
RNA 12.6.2	0,032	0,051	0,027	0,003	1,889	1,594	20,4
RNA 12.7.1	0,046	0,069	0,039	0,005	1,769	1,5	27,6
RNA 12.7.2	0,043	0,068	0,037	0,002	1,838	1,581	27,2
RNA 12.8.1	0,093	0,092	0,057	0,015	1,614	0,989	36,8
RNA 12.8.2	0,028	0,034	0,017	0,001	2	1,214	13,6
RNA 12.9.1	0,041	0,055	0,032	0,005	1,719	1,341	22
RNA 12.9.2	0,076	0,064	0,039	0,006	1,641	1,842	25,6
RNA 12.10.1	0,037	0,056	0,03	0,002	1,867	1,514	22,4
RNA 12.10.2	0,044	0,065	0,036	0,004	1,806	1,477	26
RNA 12.11.1	0,027	0,026	0,015	0,003	1,733	0,963	10,4
RNA 12.11.2	0,031	0,042	0,023	0,002	1,826	1,355	16,8
RNA 12.12.1	0,033	0,043	0,023	0,001	1,870	1,303	17,2
RNA 12.12.2	0,049	0,052	0,03	0,005	1,733	1,061	20,8

Tablo XIII

RNA 24. SAAT KANTİTASYON SONUÇLARI							
	A 230	A 260	A 280	A 320	A260/280	A 260/230	µg/ml
RNA 24.1.1	0,03	0,036	0,021	0,006	1,714	1,2	14,4
RNA 24.1.2	0,032	0,055	0,03	0,003	1,833	1,719	22
RNA 24.2.1	0,014	0,033	0,017	0,001	1,941	2,357	13,2
RNA 24.2.2	0,031	0,064	0,034	0,002	1,882	2,065	25,6
RNA 24.3.1	0,015	0,028	0,015	0,002	1,867	1,867	11,2
RNA 24.3.2	0,031	0,04	0,022	0,004	1,818	1,290	16
RNA 24.4.1	0,068	0,042	0,03	0,007	1,4	0,618	16,8
RNA 24.4.2	0,035	0,041	0,025	0,006	1,640	1,171	16,4
RNA 24.5.1	0,023	0,043	0,023	0,003	1,870	1,870	17,2
RNA 24.5.2	0,024	0,051	0,026	0,002	1,962	2,125	20,4
RNA 24.6.1	0,017	0,045	0,023	0	1,957	2,647	18
RNA 24.6.2	0,022	0,052	0,026	0,001	2	2,364	20,8
RNA 24.7.1	0,042	0,054	0,033	0,009	1,636	1,286	21,6
RNA 24.7.2	0,014	0,031	0,014	0	2,214	2,214	12,4
RNA 24.8.1	0,025	0,048	0,025	0,002	1,920	1,920	19,2
RNA 24.8.2	0,024	0,057	0,028	0	2,036	2,375	22,8
RNA 24.9.1	0,091	0,076	0,051	0,018	1,490	0,835	30,4
RNA 24.9.2	0,025	0,047	0,025	0,001	1,880	1,880	18,8
RNA24.10.1	0,019	0,031	0,018	0,003	1,722	1,632	12,4
RNA24.10.2	0,047	0,05	0,032	0,008	1,562	1,064	20
RNA24.11.1	0,06	0,056	0,034	0,009	1,647	0,933	22,4
RNA24.11.2	0,034	0,047	0,027	0,005	1,741	1,382	18,8
RNA24.12.1	0,014	0,037	0,019	0,002	1,947	2,643	14,8
RNA24.12.2	0,017	0,032	0,017	0,003	1,882	1,882	12,8

Tablo XIV

RNA 48. SAAT KANTİTASYON SONUÇLARI							
	A 230	A 260	A 280	A 320	A260/280	A 260/230	µg/ml
RNA48.1.1	0,045	0,043	0,027	0,008	1,593	0,956	17,2
RNA 48.1.2	0,054	0,077	0,041	0,003	1878	1,426	30,8
RNA 48.2.1	0,036	0,043	0,022	0,001	1,955	1,194	17,2
RNA 48.2.2	0,091	0,089	0,054	0,009	1,648	0,978	35,6
RNA 48.3.1	0,055	0,059	0,037	0,01	1,595	1,073	23,6
RNA 48.3.2	0,052	0,057	0,033	0,006	1,727	1,096	22,8
RNA 48.4.1	0,032	0,036	0,021	0,004	1,714	1,125	14,4
RNA 48.4.2	0,039	0,046	0,027	0,005	1,704	1,179	18,4
RNA 48.5.1	0,053	0,067	0,036	0,001	1,861	1,264	26,8
RNA 48.5.2	0,068	0,073	0,043	0,004	1,698	1,074	29,2
RNA 48.6.1	0,047	0,073	0,039	0,001	1,872	1,553	29,2
RNA 48.6.2	0,076	0,085	0,047	0,006	1,809	1,118	34
RNA 48.7.1	0,064	0,063	0,038	0,006	1,658	0,984	25,2
RNA 48.7.2	0,047	0,059	0,032	0,001	1,844	1,255	23,6
RNA 48.8.1	0,041	0,062	0,032	0,002	1,938	1,512	24,8
RNA 48.8.2	0,041	0,068	0,034	0,001	2	1,659	27,2
RNA 48.9.1	0,037	0,060	0,032	0,002	1,875	1,622	24
RNA 48.9.2	0,035	0,062	0,032	0,002	1,938	1,771	24,8
RNA48.10.1	0,031	0,047	0,024	0,002	1,958	1,516	18,8
RNA48.10.2	0,041	0,053	0,029	0,004	1,828	1,293	21,2
RNA48.11.1	0,033	0,051	0,027	0,002	1,889	1,545	20,4
RNA48.11.2	0,030	0,059	0,031	0,002	1,903	1,967	23,6
RNA48.12.1	0,024	0,048	0,023	0	2,087	2	19,2
RNA48.12.2	0,026	0,052	0,028	0,002	1,857	2	20,8

4.2 Kantitatif RT-PCR ile UPR gen ekspresyon çalışması



GAPDH 10 02 2010 ER Stres

Experiment

Creation Date	02/10/2010 9:00:54	Last Modified Date	02/10/2010 12:15:51
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	02/10/2010 9:58:55	End Time	02/10/2010 11:06:07
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	18 01 2010 UPL probes	Plate ID	01086055
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name	Pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0
Program Name	Amplification						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
55	None	00:00:15	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0
Program Name	Cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:10	1.50		0	0	0

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
1	02/10/2010 9:58:54	admin	Created
2	02/10/2010 11:06:10	admin	Run finished
3	02/10/2010 11:06:12	admin	Pre-calculations complete.

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
4	02/10/2010 12:41:22	admin	GAPDH report 10 02 2010

Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Settings

Channel	465-510		
Color Compensation	Off		
Program	Amplification	Units	
Mode	High Confidence		

Subset Name	All Samples
-------------	-------------

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	NTC	Negative Control				
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	6.2.1	Unknown	24.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	6.3.1	Unknown	25.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	6.4.1	Unknown	26.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	6.5.1	Unknown	25.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	6.6.1	Unknown	24.46			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	6.7.1	Unknown	26.64			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	6.8.1	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	6.9.1	Unknown	25.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	6.10.1	Unknown	26.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	6.11.1	Unknown	24.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	6.12.1	Unknown	26.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	6.1.2	Unknown	26.59			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	6.2.2	Unknown	24.81			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	6.3.2	Unknown	25.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	6.4.2	Unknown	26.67			
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	6.5.2	Unknown	25.64			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	6.6.2	Unknown	25.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	6.7.2	Unknown	26.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	6.8.2	Unknown	25.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	6.9.2	Unknown	25.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	6.10.2	Unknown	24.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	6.11.2	Unknown	26.69			
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	6.12.2	Unknown	25.40			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12.1.1	Unknown	23.96			

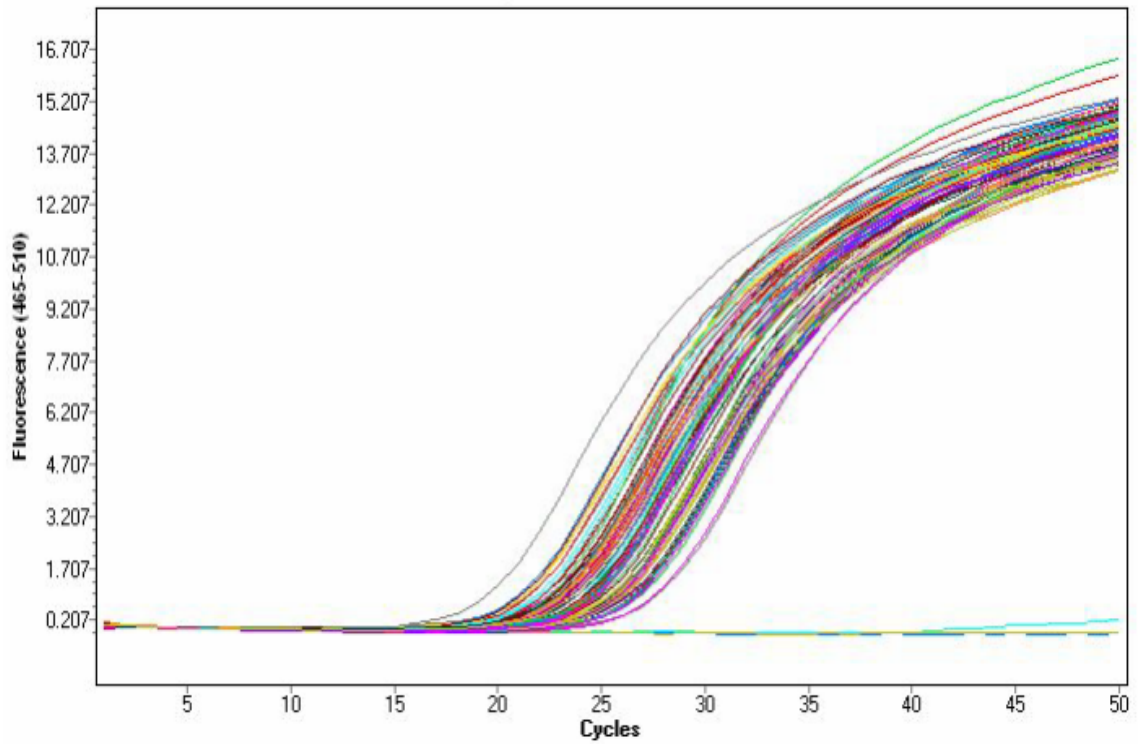
Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	12.2.1	Unknown	23.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	12.3.1	Unknown	24.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	12.4.1	Unknown	24.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	12.5.1	Unknown	28.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	12.6.1	Unknown	25.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	12.7.1	Unknown	22.53			
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	12.8.1	Unknown	23.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	12.9.1	Unknown	24.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	12.10.1	Unknown	23.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	12.11.1	Unknown	26.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	12.12.1	Unknown	26.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	12.1.2	Unknown	23.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	12.2.2	Unknown	23.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	12.3.2	Unknown	24.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	12.4.2	Unknown	23.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	12.5.2	Unknown	23.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	12.6.2	Unknown	23.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	12.7.2	Unknown	22.87			
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	12.8.2	Unknown	24.39			
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	12.9.2	Unknown	24.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	12.10.2	Unknown	23.76			
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	12.11.2	Unknown	24.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	D12	12.12.2	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	24.1.1	Unknown	26.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	24.2.1	Unknown	25.04			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	24.3.1	Unknown	27.20			
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	24.4.1	Unknown	27.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	24.5.1	Unknown	24.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	24.6.1	Unknown	23.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	24.7.1	Unknown	25.39			
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	24.8.1	Unknown	24.18			
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	24.9.1	Unknown	26.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	24.10.1	Unknown	26.22			
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	24.11.1	Unknown	25.84			
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	24.12.1	Unknown	25.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	24.1.2	Unknown	24.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	24.2.2	Unknown	23.60			

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	24.3.2	Unknown	26.66			
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	24.4.2	Unknown	26.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	24.5.2	Unknown	24.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	24.6.2	Unknown	23.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	24.7.2	Unknown	24.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	24.8.2	Unknown	23.34			
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	24.9.2	Unknown	24.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	24.10.2	Unknown	25.97			
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	24.11.2	Unknown	25.86			
<input checked="" type="checkbox"/>	F12	24.12.2	Unknown	26.12			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	48.1.1	Unknown	24.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	48.2.1	Unknown	22.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	48.3.1	Unknown	25.12			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	48.4.1	Unknown	25.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	48.5.1	Unknown	21.97			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	48.6.1	Unknown	21.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	48.7.1	Unknown	22.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	48.8.1	Unknown	22.30			
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	48.9.1	Unknown	23.59			
<input checked="" type="checkbox"/>	G10	48.10.1	Unknown	23.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	G11	48.11.1	Unknown	23.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	48.12.1	Unknown	23.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	48.1.2	Unknown	21.21			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	48.2.2	Unknown	21.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	48.3.2	Unknown	22.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	48.4.2	Unknown	25.01			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	48.5.2	Unknown	19.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	48.6.2	Unknown	21.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	48.7.2	Unknown	21.40			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	48.8.2	Unknown	22.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	H9	48.9.2	Unknown	23.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	H10	48.10.2	Unknown	23.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	H11	48.11.2	Unknown	23.47			
<input checked="" type="checkbox"/>	H12	48.12.2	Unknown	23.77			

Amplification Curves





LightCycler® 480 Software

Report

Grp78 10 02 2010 ER Stres

Experiment

Creation Date	02/10/2010 13:05:25	Last Modified Date	02/10/2010 15:01:48
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	02/10/2010 13:49:58	End Time	02/10/2010 14:57:08
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	18 01 2010 UPL probes	Plate ID	01086054
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name	Pre-incubation		
Cycles	1	Analysis Mode	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	Amplification		
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
55	None	00:00:15	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0

Program Name	Cooling		
Cycles	1	Analysis Mode	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:10	1.50		0	0	0

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
1	02/10/2010 13:49:57	admin	Created
2	02/10/2010 14:57:11	admin	Run finished
3	02/10/2010 14:57:13	admin	Pre-calculations complete.

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
4	02/10/2010 15:02:47	admin	GRP78 10 02 2010 ER Stres

Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (Abs Quant/2nd Derivative Max)**Settings**

Channel	465-510		
Color Compensation	Off		
Program	Amplification		Units
Mode	High Confidence		

Subset Name	All Samples
-------------	-------------

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	NTC	Negative Control				
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	6.2.1	Unknown	30.70			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	6.3.1	Unknown	29.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	6.4.1	Unknown	30.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	6.5.1	Unknown	31.12			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	6.6.1	Unknown	30.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	6.7.1	Unknown	31.70			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	6.8.1	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	6.9.1	Unknown	30.87			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	6.10.1	Unknown	31.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	6.11.1	Unknown	30.80			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	6.12.1	Unknown	31.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	6.1.2	Unknown	31.77			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	6.2.2	Unknown	30.70			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	6.3.2	Unknown	29.27			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	6.4.2	Unknown	30.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	6.5.2	Unknown	31.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	6.6.2	Unknown	30.84			
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	6.7.2	Unknown	31.77			
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	6.8.2	Unknown	31.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	6.9.2	Unknown	31.01			
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	6.10.2	Unknown	30.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	6.11.2	Unknown	31.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	6.12.2	Unknown	30.55			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12.1.1	Unknown	30.15			

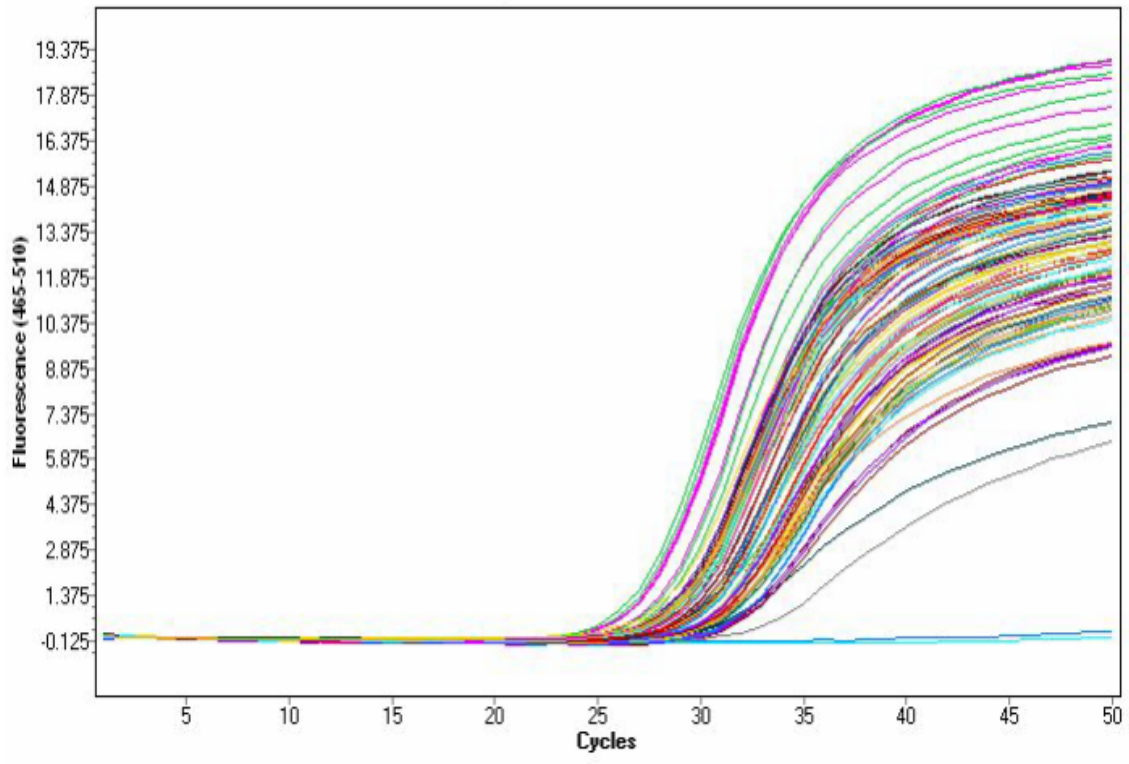
Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	12.2.1	Unknown	29.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	12.3.1	Unknown	28.49			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	12.4.1	Unknown	28.12			
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	12.5.1	Unknown	32.84			
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	12.6.1	Unknown	31.21			
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	12.7.1	Unknown	29.20			
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	12.8.1	Unknown	29.59			
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	12.9.1	Unknown	29.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	12.10.1	Unknown	29.49			
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	12.11.1	Unknown	31.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	12.12.1	Unknown	29.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	12.1.2	Unknown	29.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	12.2.2	Unknown	29.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	12.3.2	Unknown	28.32			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	12.4.2	Unknown	27.53			
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	12.5.2	Unknown	29.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	12.6.2	Unknown	29.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	12.7.2	Unknown	28.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	12.8.2	Unknown	30.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	12.9.2	Unknown	29.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	12.10.2	Unknown	29.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	12.11.2	Unknown	30.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	D12	12.12.2	Unknown	30.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	24.1.1	Unknown	31.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	24.2.1	Unknown	31.14			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	24.3.1	Unknown	29.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	24.4.1	Unknown	29.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	24.5.1	Unknown	30.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	24.6.1	Unknown	30.45			
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	24.7.1	Unknown	31.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	24.8.1	Unknown	30.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	24.9.1	Unknown	31.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	24.10.1	Unknown	31.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	24.11.1	Unknown	30.67			
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	24.12.1	Unknown	30.05			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	24.1.2	Unknown	30.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	24.2.2	Unknown	29.88			

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	24.3.2	Unknown	28.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	24.4.2	Unknown	28.88			
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	24.5.2	Unknown	30.26			
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	24.6.2	Unknown	30.14			
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	24.7.2	Unknown	30.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	24.8.2	Unknown	30.27			
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	24.9.2	Unknown	30.14			
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	24.10.2	Unknown	31.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	24.11.2	Unknown	30.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	F12	24.12.2	Unknown	31.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	48.1.1	Unknown	30.55			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	48.2.1	Unknown	30.34			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	48.3.1	Unknown	27.23			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	48.4.1	Unknown	27.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	48.5.1	Unknown	29.10			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	48.6.1	Unknown	28.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	48.7.1	Unknown	29.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	48.8.1	Unknown	29.32			
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	48.9.1	Unknown	28.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	G10	48.10.1	Unknown	29.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	G11	48.11.1	Unknown	29.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	48.12.1	Unknown	28.86			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	48.1.2	Unknown	29.28			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	48.2.2	Unknown	29.25			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	48.3.2	Unknown	26.97			
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	48.4.2	Unknown	27.45			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	48.5.2	Unknown	29.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	48.6.2	Unknown	29.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	48.7.2	Unknown	29.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	48.8.2	Unknown	29.23			
<input checked="" type="checkbox"/>	H9	48.9.2	Unknown	28.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	H10	48.10.2	Unknown	29.21			
<input checked="" type="checkbox"/>	H11	48.11.2	Unknown	28.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	H12	48.12.2	Unknown	28.81			

Amplification Curves





LightCycler® 480 Software

Report

Grp94 11 02 2010 ER Stres

Experiment

Creation Date	02/11/2010 8:07:09	Last Modified Date	02/11/2010 10:37:52
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	02/11/2010 9:29:32	End Time	02/11/2010 10:36:43
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	UPL Probes ER Stress	Plate ID	01086053
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name	Pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	Amplification						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
55	None	00:00:15	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0

Program Name	Cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:10	1.50		0	0	0

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
1	02/11/2010 9:29:31	admin	Created
2	02/11/2010 10:36:47	admin	Run finished
3	02/11/2010 10:36:49	admin	Pre-calculations complete.

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
4	02/11/2010 10:39:16	admin	GRP94 11 02 2010 ER Stres

Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (Abs Quant/2nd Derivative Max)**Settings**

Channel	465-510		
Color Compensation	Off		
Program	Amplification	Units	
Mode	High Confidence		

Subset Name	All Samples
-------------	-------------

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	NTC	Negative Control				
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	6.2.1	Unknown	22.45			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	6.3.1	Unknown	22.05			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	6.4.1	Unknown	22.25			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	6.5.1	Unknown	23.05			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	6.6.1	Unknown	22.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	6.7.1	Unknown	24.22			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	6.8.1	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	6.9.1	Unknown	22.32			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	6.10.1	Unknown	23.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	6.11.1	Unknown	22.59			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	6.12.1	Unknown	23.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	6.1.2	Unknown	23.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	6.2.2	Unknown	22.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	6.3.2	Unknown	21.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	6.4.2	Unknown	22.28			
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	6.5.2	Unknown	22.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	6.6.2	Unknown	22.67			
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	6.7.2	Unknown	23.95			
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	6.8.2	Unknown	23.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	6.9.2	Unknown	22.84			
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	6.10.2	Unknown	21.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	6.11.2	Unknown	23.81			
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	6.12.2	Unknown	22.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12.1.1	Unknown	21.30			

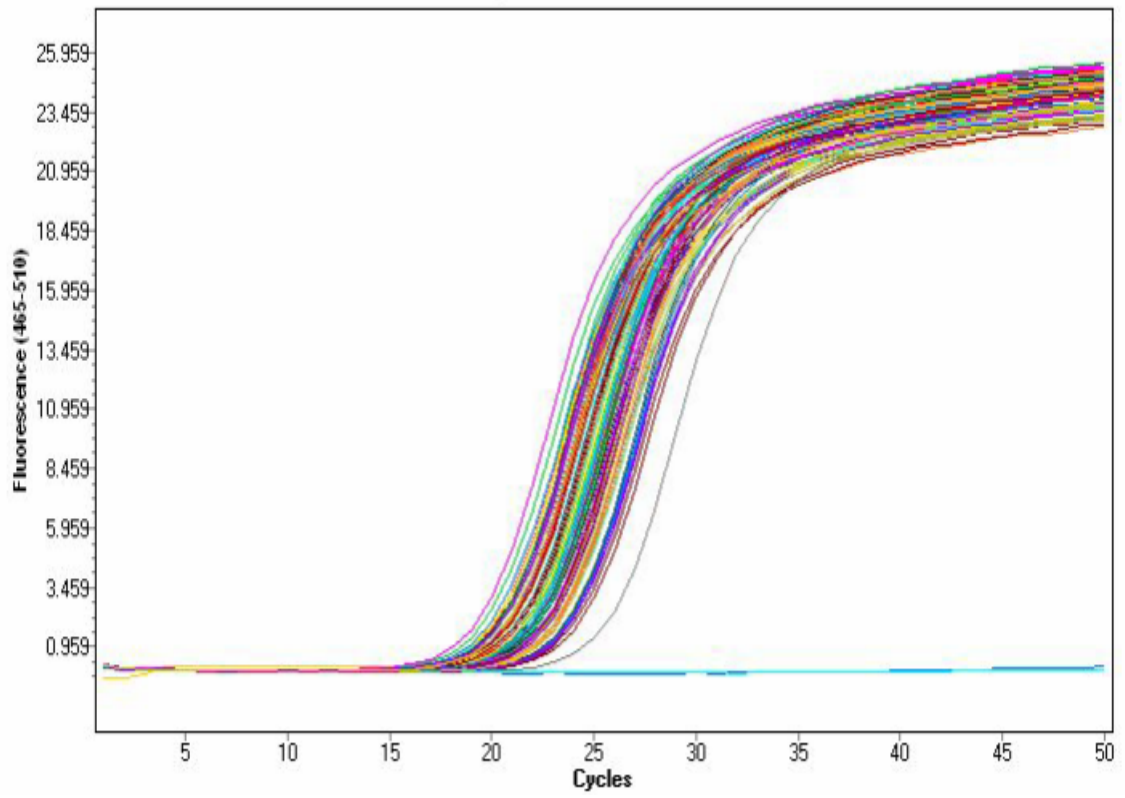
Results

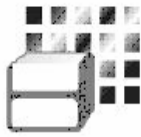
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	12.2.1	Unknown	20.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	12.3.1	Unknown	20.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	12.4.1	Unknown	20.10			
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	12.5.1	Unknown	25.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	12.6.1	Unknown	23.10			
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	12.7.1	Unknown	20.77			
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	12.8.1	Unknown	21.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	12.9.1	Unknown	21.47			
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	12.10.1	Unknown	21.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	12.11.1	Unknown	23.87			
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	12.12.1	Unknown	21.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	12.1.2	Unknown	20.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	12.2.2	Unknown	20.80			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	12.3.2	Unknown	20.18			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	12.4.2	Unknown	19.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	12.5.2	Unknown	20.87			
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	12.6.2	Unknown	21.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	12.7.2	Unknown	20.66			
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	12.8.2	Unknown	22.11			
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	12.9.2	Unknown	21.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	12.10.2	Unknown	20.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	12.11.2	Unknown	21.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	D12	12.12.2	Unknown	22.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	24.1.1	Unknown	23.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	24.2.1	Unknown	22.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	24.3.1	Unknown	22.45			
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	24.4.1	Unknown	22.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	24.5.1	Unknown	22.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	24.6.1	Unknown	21.84			
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	24.7.1	Unknown	22.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	24.8.1	Unknown	22.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	24.9.1	Unknown	23.69			
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	24.10.1	Unknown	23.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	24.11.1	Unknown	22.81			
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	24.12.1	Unknown	22.95			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	24.1.2	Unknown	21.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	24.2.2	Unknown	21.51			

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	24.3.2	Unknown	21.80			
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	24.4.2	Unknown	22.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	24.5.2	Unknown	22.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	24.6.2	Unknown	21.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	24.7.2	Unknown	22.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	24.8.2	Unknown	21.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	24.9.2	Unknown	22.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	24.10.2	Unknown	23.14			
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	24.11.2	Unknown	22.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	F12	24.12.2	Unknown	23.21			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	48.1.1	Unknown	21.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	48.2.1	Unknown	20.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	48.3.1	Unknown	20.50			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	48.4.1	Unknown	20.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	48.5.1	Unknown	20.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	48.6.1	Unknown	20.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	48.7.1	Unknown	21.26			
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	48.8.1	Unknown	20.76			
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	48.9.1	Unknown	20.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	G10	48.10.1	Unknown	20.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	G11	48.11.1	Unknown	20.77			
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	48.12.1	Unknown	20.66			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	48.1.2	Unknown	19.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	48.2.2	Unknown	20.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	48.3.2	Unknown	19.67			
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	48.4.2	Unknown	20.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	48.5.2	Unknown	20.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	48.6.2	Unknown	20.21			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	48.7.2	Unknown	20.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	48.8.2	Unknown	20.46			
<input checked="" type="checkbox"/>	H9	48.9.2	Unknown	20.42			
<input checked="" type="checkbox"/>	H10	48.10.2	Unknown	20.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	H11	48.11.2	Unknown	20.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	H12	48.12.2	Unknown	20.71			

Amplification Curves





LightCycler® 480 Software

Report

MTJ1 11 02 2010 ER Stres

Experiment

Creation Date	02/11/2010 14:10:38	Last Modified Date	02/11/2010 15:57:56
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	02/11/2010 14:50:15	End Time	02/11/2010 15:57:20
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	UPL Probes ER Stress	Plate ID	01086051
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name	Pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0
Program Name	Amplification						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
55	None	00:00:15	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0
Program Name	Cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:10	1.50		0	0	0

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
1	02/11/2010 14:50:15	admin	Created
2	02/11/2010 15:57:23	admin	Run finished
3	02/11/2010 15:57:25	admin	Pre-calculations complete.

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
4	02/11/2010 16:01:27	admin	MTJ1 11 02 2010 ER Stres

Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Settings

Channel	465-510	
Color Compensation	Off	
Program	Amplification	Units
Mode	High Confidence	

Subset Name	All Samples
-------------	-------------

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	NTC	Negative Control				
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	6.2.1	Unknown	31.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	6.3.1	Unknown	32.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	6.4.1	Unknown	32.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	6.5.1	Unknown	32.64			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	6.6.1	Unknown	31.71			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	6.7.1	Unknown	33.38			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	6.8.1	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	6.9.1	Unknown	31.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	6.10.1	Unknown	32.46			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	6.11.1	Unknown	30.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	6.12.1	Unknown	32.10			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	6.1.2	Unknown	33.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	6.2.2	Unknown	31.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	6.3.2	Unknown	31.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	6.4.2	Unknown	32.87			
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	6.5.2	Unknown	32.23			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	6.6.2	Unknown	32.14			
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	6.7.2	Unknown	33.70			
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	6.8.2	Unknown	32.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	6.9.2	Unknown	32.31			
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	6.10.2	Unknown	31.25			
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	6.11.2	Unknown	32.59			
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	6.12.2	Unknown	31.69			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12.1.1	Unknown	30.57			

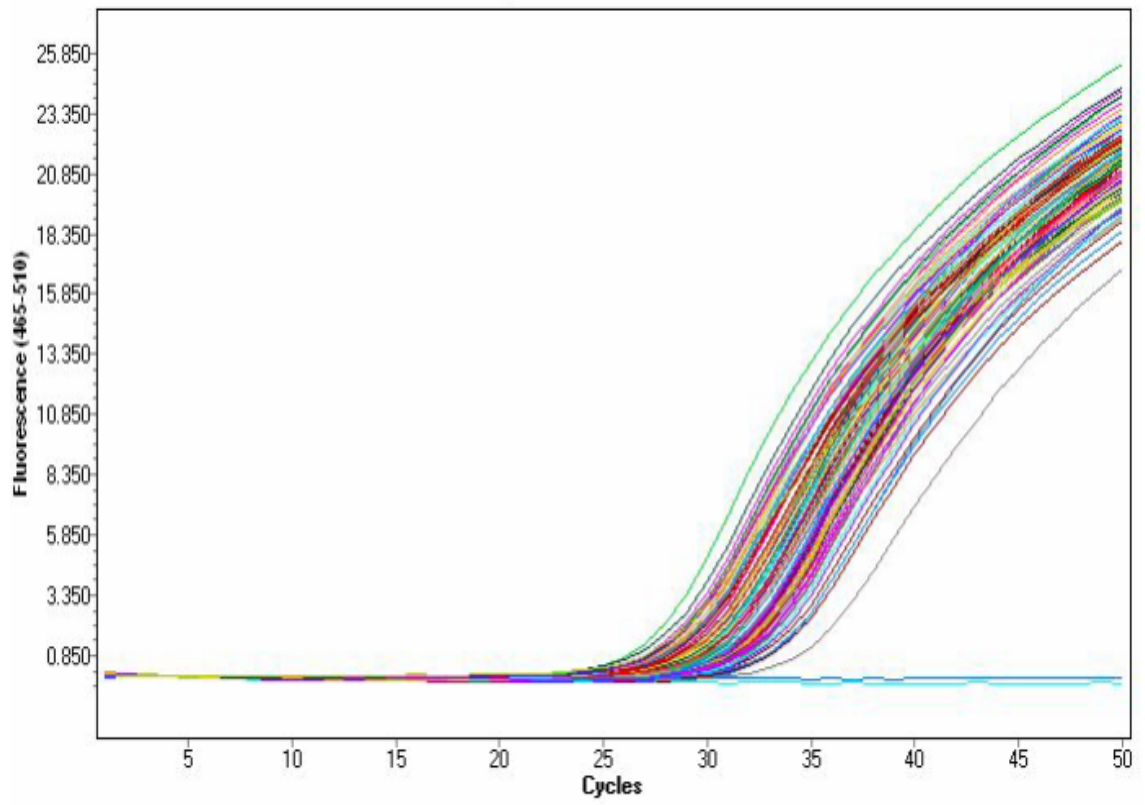
Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	12.2.1	Unknown	30.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	12.3.1	Unknown	30.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	12.4.1	Unknown	29.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	12.5.1	Unknown	35.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	12.6.1	Unknown	32.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	12.7.1	Unknown	29.34			
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	12.8.1	Unknown	30.55			
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	12.9.1	Unknown	30.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	12.10.1	Unknown	29.87			
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	12.11.1	Unknown	33.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	12.12.1	Unknown	29.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	12.1.2	Unknown	30.18			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	12.2.2	Unknown	30.25			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	12.3.2	Unknown	30.20			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	12.4.2	Unknown	29.28			
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	12.5.2	Unknown	30.05			
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	12.6.2	Unknown	30.50			
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	12.7.2	Unknown	29.81			
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	12.8.2	Unknown	31.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	12.9.2	Unknown	30.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	12.10.2	Unknown	29.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	12.11.2	Unknown	30.76			
<input checked="" type="checkbox"/>	D12	12.12.2	Unknown	29.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	24.1.1	Unknown	33.71			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	24.2.1	Unknown	32.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	24.3.1	Unknown	31.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	24.4.1	Unknown	32.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	24.5.1	Unknown	31.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	24.6.1	Unknown	30.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	24.7.1	Unknown	31.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	24.8.1	Unknown	31.28			
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	24.9.1	Unknown	32.46			
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	24.10.1	Unknown	32.34			
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	24.11.1	Unknown	31.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	24.12.1	Unknown	31.88			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	24.1.2	Unknown	31.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	24.2.2	Unknown	31.00			

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	24.3.2	Unknown	31.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	24.4.2	Unknown	31.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	24.5.2	Unknown	31.30			
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	24.6.2	Unknown	30.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	24.7.2	Unknown	31.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	24.8.2	Unknown	30.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	24.9.2	Unknown	30.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	24.10.2	Unknown	32.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	24.11.2	Unknown	31.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	F12	24.12.2	Unknown	32.10			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	48.1.1	Unknown	31.50			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	48.2.1	Unknown	30.95			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	48.3.1	Unknown	28.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	48.4.1	Unknown	28.45			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	48.5.1	Unknown	29.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	48.6.1	Unknown	28.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	48.7.1	Unknown	29.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	48.8.1	Unknown	29.26			
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	48.9.1	Unknown	28.71			
<input checked="" type="checkbox"/>	G10	48.10.1	Unknown	28.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	G11	48.11.1	Unknown	29.37			
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	48.12.1	Unknown	28.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	48.1.2	Unknown	29.10			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	48.2.2	Unknown	29.53			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	48.3.2	Unknown	27.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	48.4.2	Unknown	28.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	48.5.2	Unknown	29.18			
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	48.6.2	Unknown	28.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	48.7.2	Unknown	29.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	48.8.2	Unknown	29.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	H9	48.9.2	Unknown	28.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	H10	48.10.2	Unknown	29.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	H11	48.11.2	Unknown	28.66			
<input checked="" type="checkbox"/>	H12	48.12.2	Unknown	28.10			

Amplification Curves





LightCycler® 480 Software

Report

HMOX1 12 02 2010 ER Stres

Experiment

Creation Date	02/12/2010 10:58:33	Last Modified Date	02/12/2010 12:24:01
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	02/12/2010 11:14:46	End Time	02/12/2010 12:21:50
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	UPL Probes ER Stress	Plate ID	01086099
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name	Pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	Amplification						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
55	None	00:00:15	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0

Program Name	Cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:10	1.50		0	0	0

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
1	02/12/2010 11:14:46	admin	Created
2	02/12/2010 12:21:53	admin	Run finished
3	02/12/2010 12:21:55	admin	Pre-calculations complete.

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
4	02/12/2010 12:26:00	admin	HMOX1 12 02 2010 ER Stres

Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (Abs Quant/2nd Derivative Max)**Settings**

Channel	465-510		
Color Compensation	Off		
Program	Amplification	Units	
Mode	High Confidence		

Subset Name	All Samples
-------------	-------------

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	NTC	Negative Control				
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	6.2.1	Unknown	26.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	6.3.1	Unknown	27.31			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	6.4.1	Unknown	27.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	6.5.1	Unknown	26.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	6.6.1	Unknown	26.80			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	6.7.1	Unknown	27.69			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	6.8.1	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	6.9.1	Unknown	26.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	6.10.1	Unknown	26.71			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	6.11.1	Unknown	26.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	6.12.1	Unknown	26.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	6.1.2	Unknown	27.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	6.2.2	Unknown	26.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	6.3.2	Unknown	26.95			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	6.4.2	Unknown	27.30			
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	6.5.2	Unknown	27.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	6.6.2	Unknown	26.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	6.7.2	Unknown	27.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	6.8.2	Unknown	27.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	6.9.2	Unknown	26.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	6.10.2	Unknown	26.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	6.11.2	Unknown	27.25			
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	6.12.2	Unknown	26.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12.1.1	Unknown	25.76			

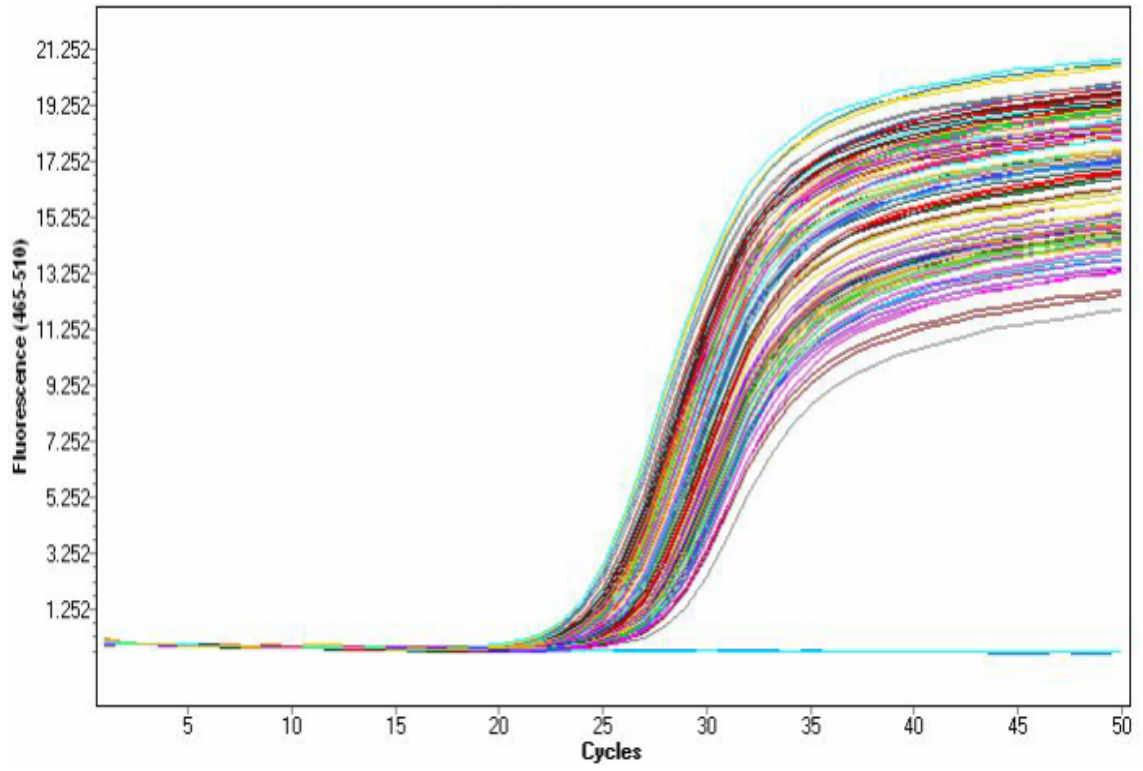
Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	12.2.1	Unknown	25.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	12.3.1	Unknown	26.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	12.4.1	Unknown	25.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	12.5.1	Unknown	28.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	12.6.1	Unknown	26.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	12.7.1	Unknown	24.93			
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	12.8.1	Unknown	25.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	12.9.1	Unknown	25.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	12.10.1	Unknown	25.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	12.11.1	Unknown	27.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	12.12.1	Unknown	26.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	12.1.2	Unknown	25.05			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	12.2.2	Unknown	25.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	12.3.2	Unknown	26.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	12.4.2	Unknown	25.47			
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	12.5.2	Unknown	25.01			
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	12.6.2	Unknown	25.43			
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	12.7.2	Unknown	24.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	12.8.2	Unknown	26.04			
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	12.9.2	Unknown	26.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	12.10.2	Unknown	25.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	12.11.2	Unknown	26.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	D12	12.12.2	Unknown	26.11			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	24.1.1	Unknown	27.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	24.2.1	Unknown	26.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	24.3.1	Unknown	27.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	24.4.1	Unknown	27.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	24.5.1	Unknown	26.18			
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	24.6.1	Unknown	25.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	24.7.1	Unknown	26.54			
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	24.8.1	Unknown	26.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	24.9.1	Unknown	27.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	24.10.1	Unknown	26.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	24.11.1	Unknown	26.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	24.12.1	Unknown	26.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	24.1.2	Unknown	25.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	24.2.2	Unknown	25.78			

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	24.3.2	Unknown	27.28			
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	24.4.2	Unknown	27.49			
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	24.5.2	Unknown	26.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	24.6.2	Unknown	25.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	24.7.2	Unknown	26.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	24.8.2	Unknown	25.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	24.9.2	Unknown	26.26			
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	24.10.2	Unknown	26.81			
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	24.11.2	Unknown	26.77			
<input checked="" type="checkbox"/>	F12	24.12.2	Unknown	26.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	48.1.1	Unknown	26.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	48.2.1	Unknown	25.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	48.3.1	Unknown	25.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	48.4.1	Unknown	26.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	48.5.1	Unknown	24.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	48.6.1	Unknown	24.12			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	48.7.1	Unknown	25.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	48.8.1	Unknown	24.67			
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	48.9.1	Unknown	24.97			
<input checked="" type="checkbox"/>	G10	48.10.1	Unknown	25.22			
<input checked="" type="checkbox"/>	G11	48.11.1	Unknown	25.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	48.12.1	Unknown	25.11			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	48.1.2	Unknown	24.26			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	48.2.2	Unknown	24.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	48.3.2	Unknown	25.47			
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	48.4.2	Unknown	25.66			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	48.5.2	Unknown	24.37			
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	48.6.2	Unknown	24.12			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	48.7.2	Unknown	24.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	48.8.2	Unknown	24.12			
<input checked="" type="checkbox"/>	H9	48.9.2	Unknown	24.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	H10	48.10.2	Unknown	25.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	H11	48.11.2	Unknown	25.04			
<input checked="" type="checkbox"/>	H12	48.12.2	Unknown	24.97			

Amplification Curves





LightCycler® 480 Software

Report

CHOP 11 02 2010 ER Stres

Experiment

Creation Date	02/11/2010 10:57:59	Last Modified Date	02/11/2010 12:23:12
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	02/11/2010 11:12:46	End Time	02/11/2010 12:20:06
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	UPL Probes ER Stress	Plate ID	01086052
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name	Pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0
Program Name	Amplification						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
55	None	00:00:15	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0
Program Name	Cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:10	1.50		0	0	0

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
1	02/11/2010 11:12:46	admin	Created
2	02/11/2010 12:20:10	admin	Run finished
3	02/11/2010 12:20:12	admin	Pre-calculations complete.

Revision History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
4	02/11/2010 12:23:44	admin	CHOP report

Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (Abs Quant/2nd Derivative Max)**Settings**

Channel	465-510		
Color Compensation	Off		
Program	Amplification	Units	
Mode	High Confidence		

Subset Name	All Samples
-------------	-------------

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	NTC	Negative Control				
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	6.2.1	Unknown	27.70			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	6.3.1	Unknown	26.22			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	6.4.1	Unknown	26.27			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	6.5.1	Unknown	28.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	6.6.1	Unknown	28.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	6.7.1	Unknown	28.36			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	6.8.1	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	6.9.1	Unknown	27.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	6.10.1	Unknown	27.23			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	6.11.1	Unknown	27.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	6.12.1	Unknown	27.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	6.1.2	Unknown	28.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	6.2.2	Unknown	28.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	6.3.2	Unknown	25.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	6.4.2	Unknown	26.31			
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	6.5.2	Unknown	28.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	6.6.2	Unknown	27.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	6.7.2	Unknown	29.42			
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	6.8.2	Unknown	28.19			
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	6.9.2	Unknown	28.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	6.10.2	Unknown	27.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	6.11.2	Unknown	28.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	6.12.2	Unknown	27.71			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12.1.1	Unknown	27.44			

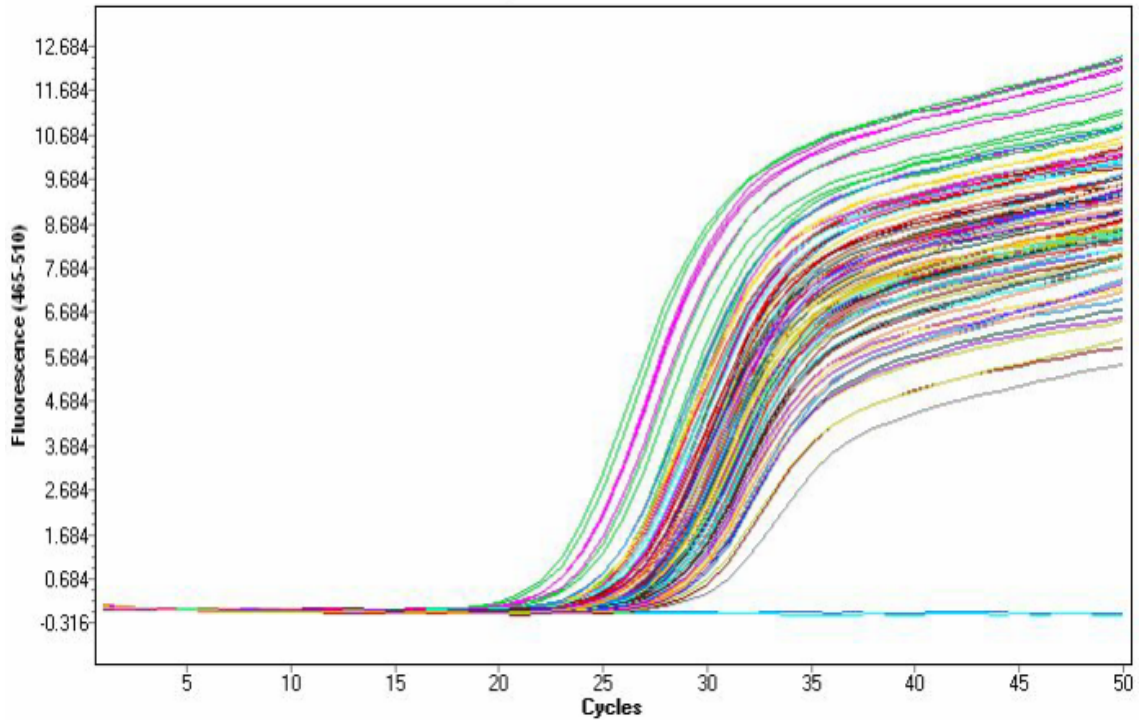
Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	12.2.1	Unknown	26.86			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	12.3.1	Unknown	24.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	12.4.1	Unknown	24.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	12.5.1	Unknown	30.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	12.6.1	Unknown	28.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	12.7.1	Unknown	26.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	12.8.1	Unknown	27.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	12.9.1	Unknown	27.33			
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	12.10.1	Unknown	27.23			
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	12.11.1	Unknown	27.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	12.12.1	Unknown	27.43			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	12.1.2	Unknown	26.81			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	12.2.2	Unknown	26.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	12.3.2	Unknown	24.28			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	12.4.2	Unknown	23.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	12.5.2	Unknown	27.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	12.6.2	Unknown	26.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	12.7.2	Unknown	26.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	12.8.2	Unknown	28.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	12.9.2	Unknown	27.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	12.10.2	Unknown	27.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	12.11.2	Unknown	27.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	D12	12.12.2	Unknown	27.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	24.1.1	Unknown	29.25			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	24.2.1	Unknown	28.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	24.3.1	Unknown	25.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	24.4.1	Unknown	25.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	24.5.1	Unknown	28.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	24.6.1	Unknown	27.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	24.7.1	Unknown	28.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	24.8.1	Unknown	28.32			
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	24.9.1	Unknown	29.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	24.10.1	Unknown	28.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	24.11.1	Unknown	28.59			
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	24.12.1	Unknown	28.70			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	24.1.2	Unknown	27.53			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	24.2.2	Unknown	27.35			

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	24.3.2	Unknown	25.20			
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	24.4.2	Unknown	25.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	24.5.2	Unknown	27.71			
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	24.6.2	Unknown	27.64			
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	24.7.2	Unknown	28.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	24.8.2	Unknown	27.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	24.9.2	Unknown	27.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	24.10.2	Unknown	28.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	24.11.2	Unknown	28.88			
<input checked="" type="checkbox"/>	F12	24.12.2	Unknown	29.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	48.1.1	Unknown	27.46			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	48.2.1	Unknown	26.53			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	48.3.1	Unknown	23.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	48.4.1	Unknown	23.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	48.5.1	Unknown	25.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	48.6.1	Unknown	25.55			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	48.7.1	Unknown	26.20			
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	48.8.1	Unknown	26.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	48.9.1	Unknown	26.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	G10	48.10.1	Unknown	26.65			
<input checked="" type="checkbox"/>	G11	48.11.1	Unknown	26.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	48.12.1	Unknown	26.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	48.1.2	Unknown	25.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	48.2.2	Unknown	25.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	48.3.2	Unknown	22.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	48.4.2	Unknown	23.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	48.5.2	Unknown	25.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	48.6.2	Unknown	25.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	48.7.2	Unknown	26.27			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	48.8.2	Unknown	25.95			
<input checked="" type="checkbox"/>	H9	48.9.2	Unknown	26.67			
<input checked="" type="checkbox"/>	H10	48.10.2	Unknown	26.88			
<input checked="" type="checkbox"/>	H11	48.11.2	Unknown	26.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	H12	48.12.2	Unknown	26.84			

Amplification Curves



4.3 Komparatif Ct metodu ile UPR gen ekspresyon analizi

4.3.1 Relatif kantitasyon

Gen ekspresyonunun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absölu kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değil, n-katı şeklinde ifade edilir.

Real-time PCR kantifikasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki küçük farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bu relatif kantitasyonda yanlış sonuçlara sebep olur. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek ve elde edilen sonucun normalizasyonu bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol tüm dokulardan ekspresse olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), β actin, Asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) ve rRNA kullanılmaktadır (145). Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir.

4.3.1.1 Komparatif C_T (Threshold Siklus) Metodu

$\Delta\Delta C_T$ metodu olarak da isimlendirilen bu metod da, standart eğri metoduna benzer ama konsantrasyonların yerine C_T değerleri kullanılır. Hedef genin C_T değeri bir referans genin C_T değerine oran olarak normalize edilir. Daha sonra standart eğri metodunda olduğu gibi normalize C_T değerleri seçilen bir kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir. C_T'nin doğru hesaplanabilmesi için,

Komparatif C_T metodu, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{hedef})} - \Delta C_{T(\text{kalibratör})}$$

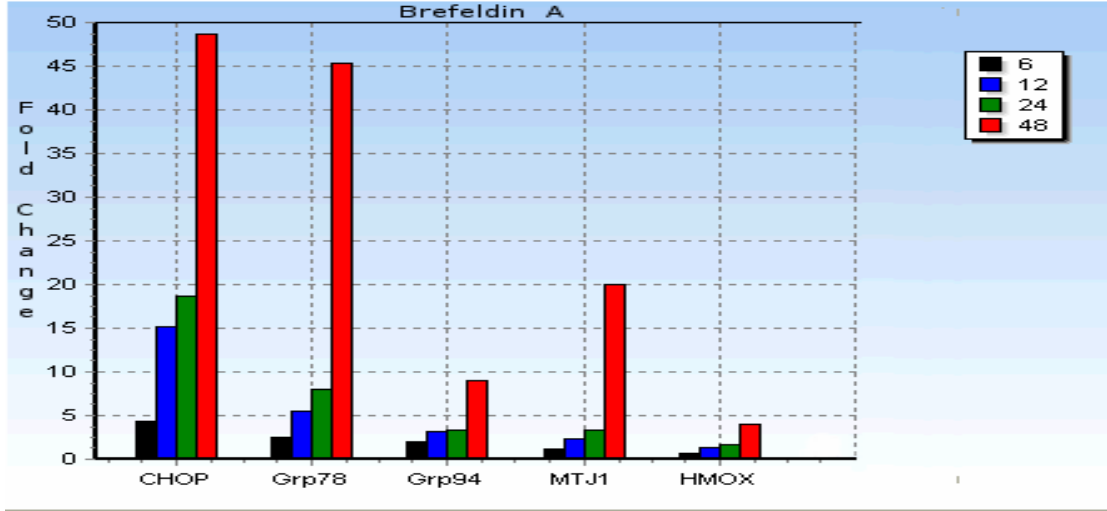
$$\Delta C_{T(\text{hedef})} = C_{T(\text{hedef})} - C_{T(\text{referans})}$$

$$\Delta C_{T(\text{kalibratör})} = C_{T(\text{kalibratör})} - C_{T(\text{referans})} \text{ ' göstermektedir.}$$

Karşılařtırılmalđ C_T metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir. Birincisi, hedef gen amplikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve % 100'e yakın olması gerekir. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarda ΔC_T değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı ΔC_T grafiğinde slope değerinin sđfıra yakın (< 0,1) olmasıdır (134). Çalışmamızda kalibratör olarak kontrol grubumuz seçilmiştir. Aşağıdaki grafiklerde saatlere göre çalışma gruplarının 'GENEX' software ile $\Delta\Delta C_T$ metodu kullanılarak elde edilen UPR gen analizleri verilmiştir.

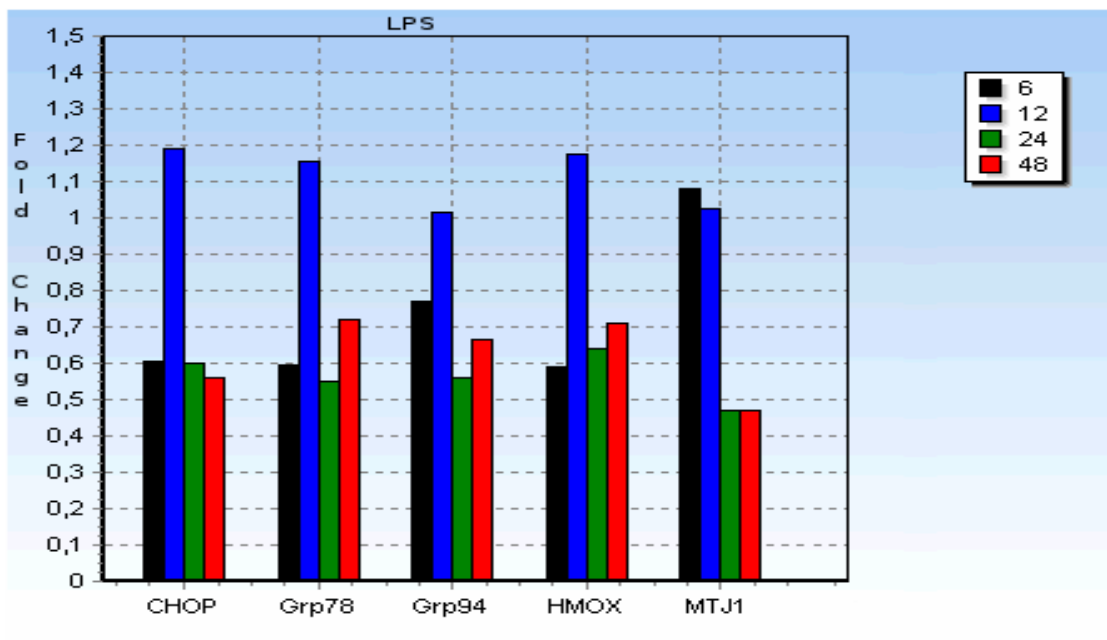
Şekil 14’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 0.1 μ M Brefeldin A uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. Bütün gen ekspresyonlarında zamanla doğru orantılı olarak artış dikkati çekmektedir. Bu tablo Brefeldin A’nın ER stres ajanı olduğunu ve UPR’yi pozitif yönde aktive ettiğini teyit etmektedir.

Şekil 14



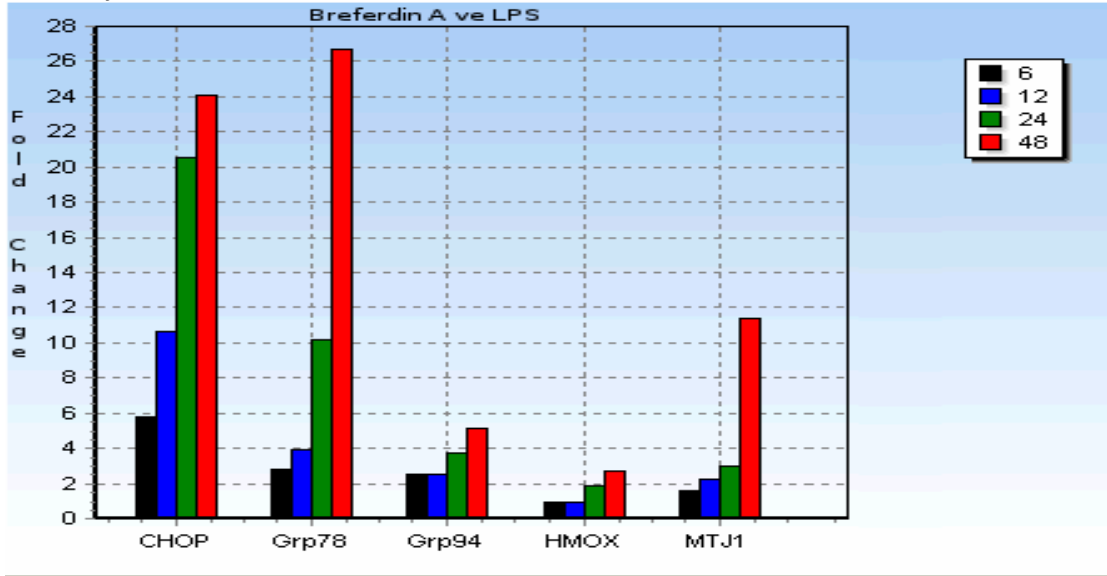
Şekil 15’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 0.1 μ M LPS uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. LPS, HEp2 hücrelerinde gen ekspresyonlarını azaltıcı yönde etki göstermektedir.

Şekil 15



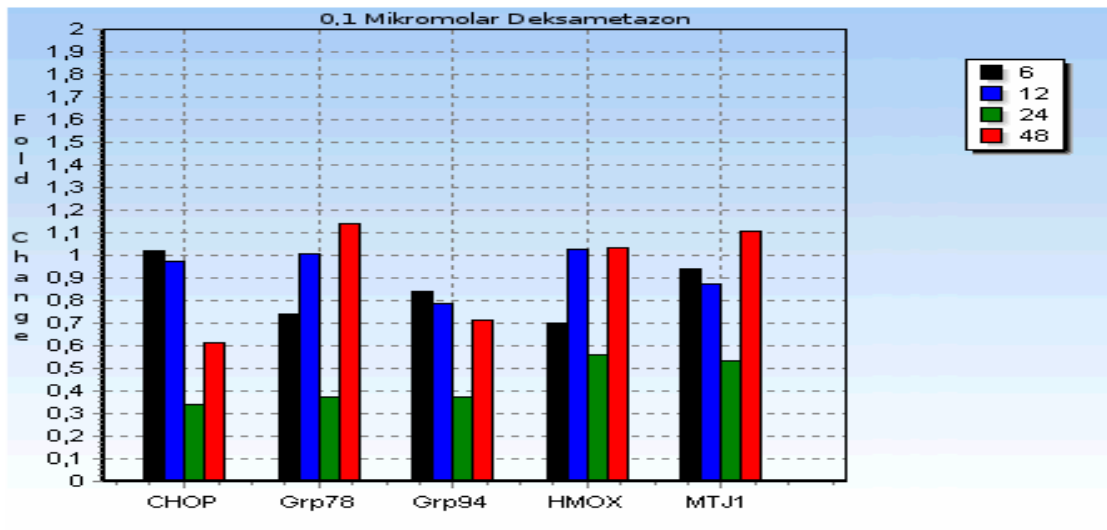
Şekil 16'de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 0.1 μM LPS ve 0.1 μM uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. BrefeldinA'nın tek başına artırdığı gen ekspresyonları LPS ilave edilince yarı yarıya azalmaktadır. Bu durumda LPS'nin Brefeldin A'nın neden olduğu stresi azaltıcı yönde etki yaptığı söylenebilir.

Şekil 16



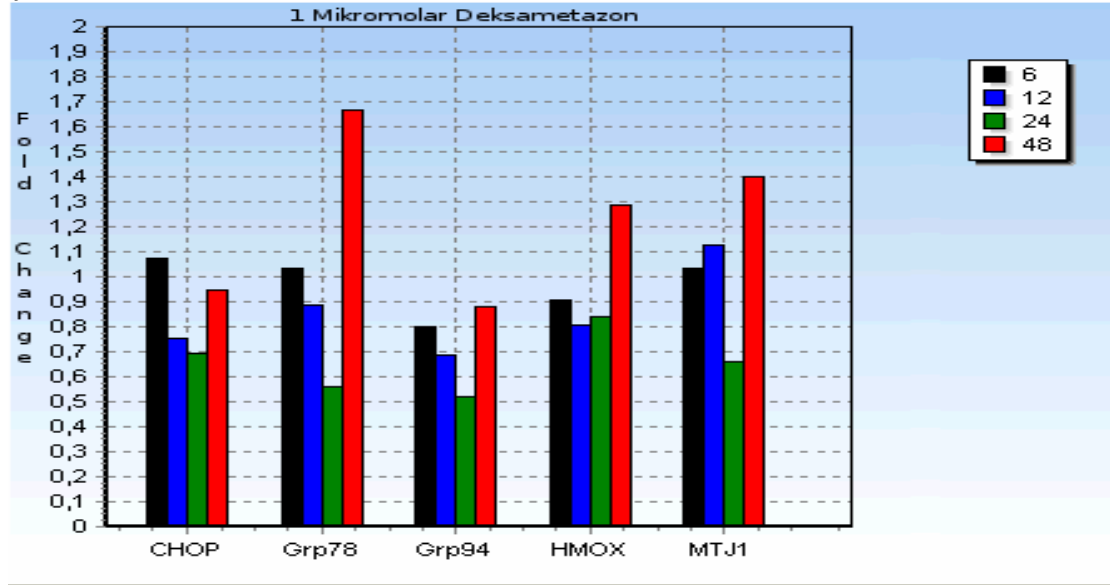
Şekil 17'de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 0.1 μM Deksametazon uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. Bütün gen ekspresyonlarında 24. saatte belirgin azalma mevcuttur. Çalışmaya başlarken apoptotik olduğu varsayılan ilacın HEp2 hücrelerinde anti-apoptotik olduğu söylenebilir.

Şekil 17



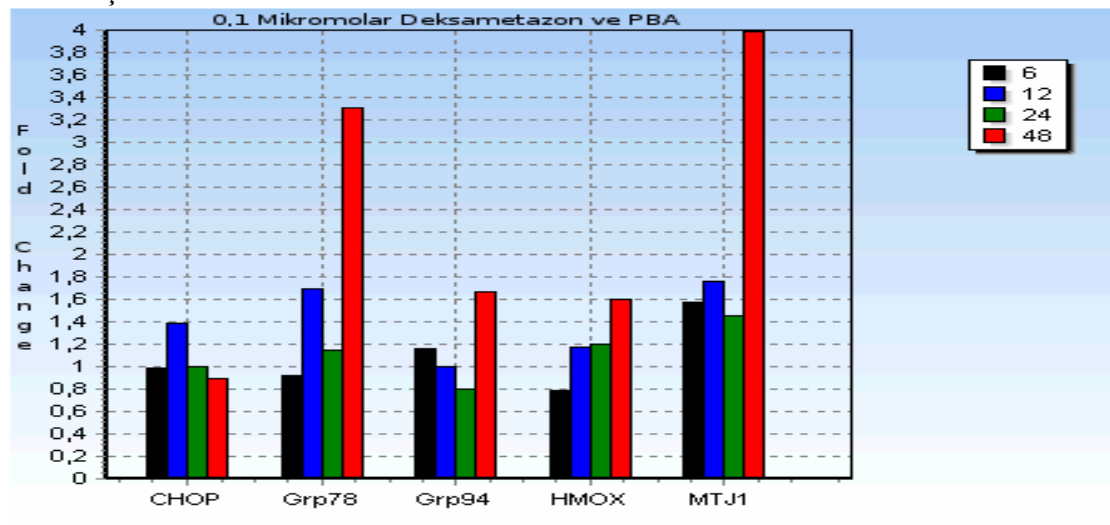
Şekil 18’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 1µM Deksametazon uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. 24. saat bütün genlerin ekspresyonları kontrolün altında tespit edilmiştir. 48. saatte ise MTJ1 ve Grp78 gen ekspresyonları kontrole göre anlamlı artış göstermektedir.

Şekil 18



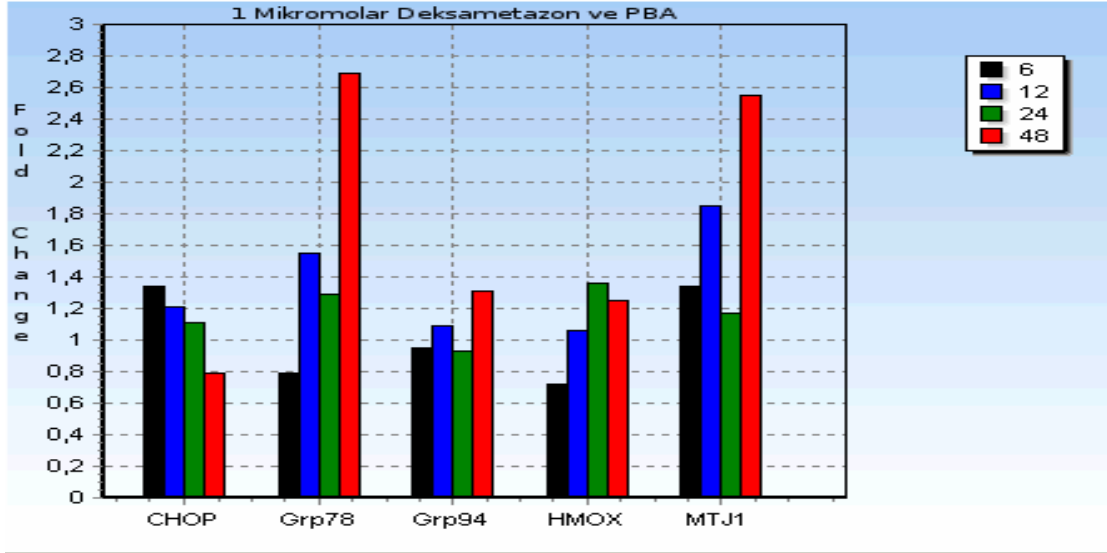
Şekil 19’da 6, 12, 24, 48 saat boyunca 0.1µM Deksametazon ve 1 mM PBA uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. PBA, Grp78 ve MTJ1 gen ekspresyonlarını 48. saatte belirgin olmak üzere artırmaktadır. Yine diğer gen ekspresyonlarını da tek başına 0.1 deksametazona artırmaktadır. Bu halilke PBA’nın kimyasal şaperon olarak etkisini gösterdiği söylenebilir.

Şekil 19



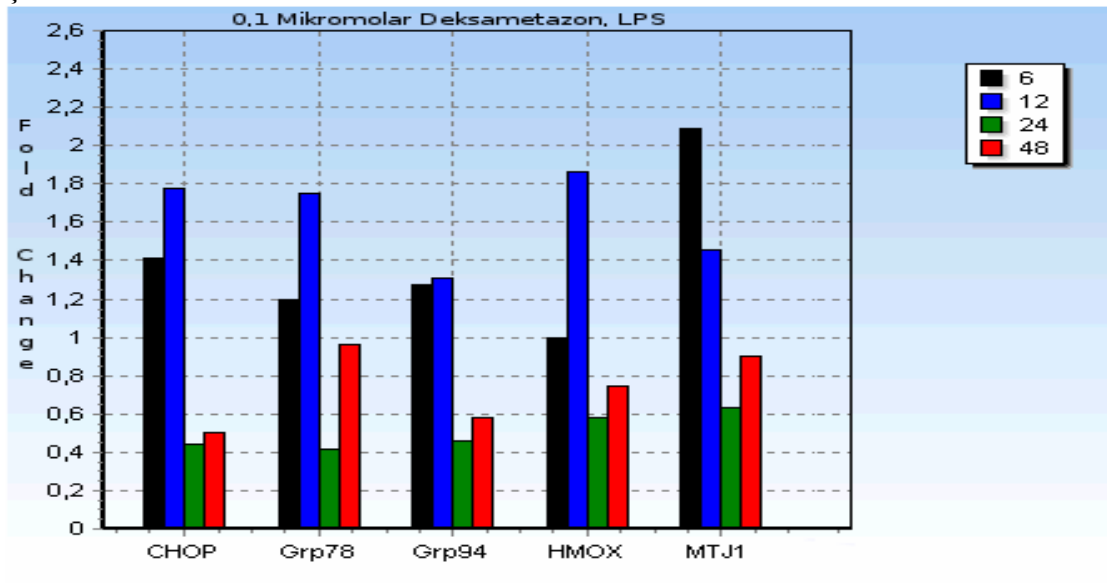
Şekil 20’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 1 μ M Dekametazon ve 1 mM PBA uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. Bu çalışma bir önceki ile benzerlik göstermektedir ve PBA yine kimyasal şaperon olarak görev yapmaktadır.

Şekil 20



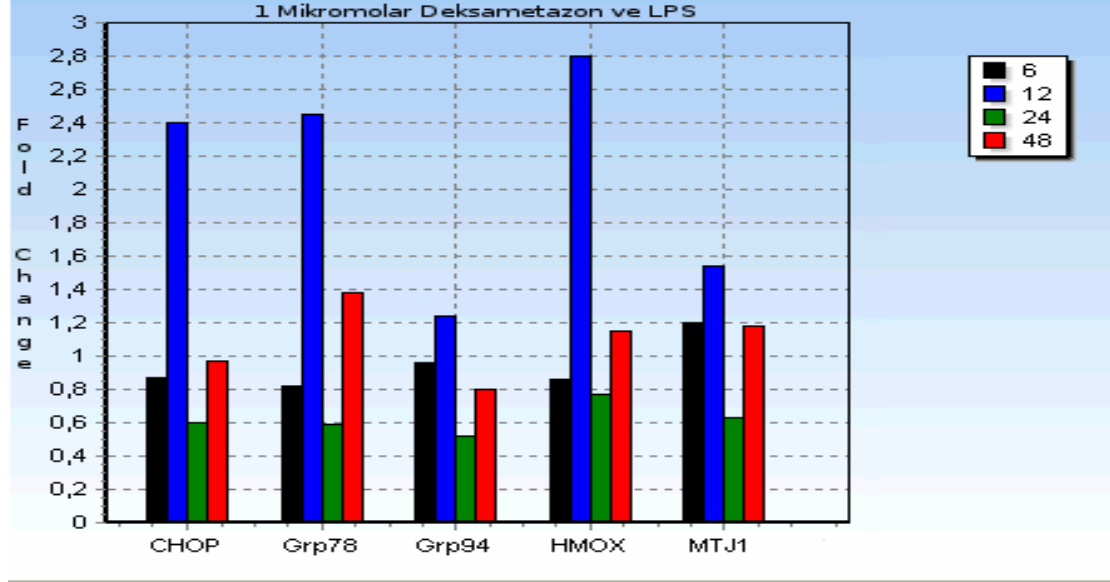
Şekil 21’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 0.1 μ M Dekametazon ve 0.1 μ M LPS uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. Tek başına 0.1 μ M Dekametazon uygulanan gruba göre LPS ilavesi ile 6 ve 12. saatlerde gen ekspresyonları artış göstermektedir. LPS’nin bu etkisi daha sonraki saatlerde ortadan kalkmaktadır.

Şekil 21



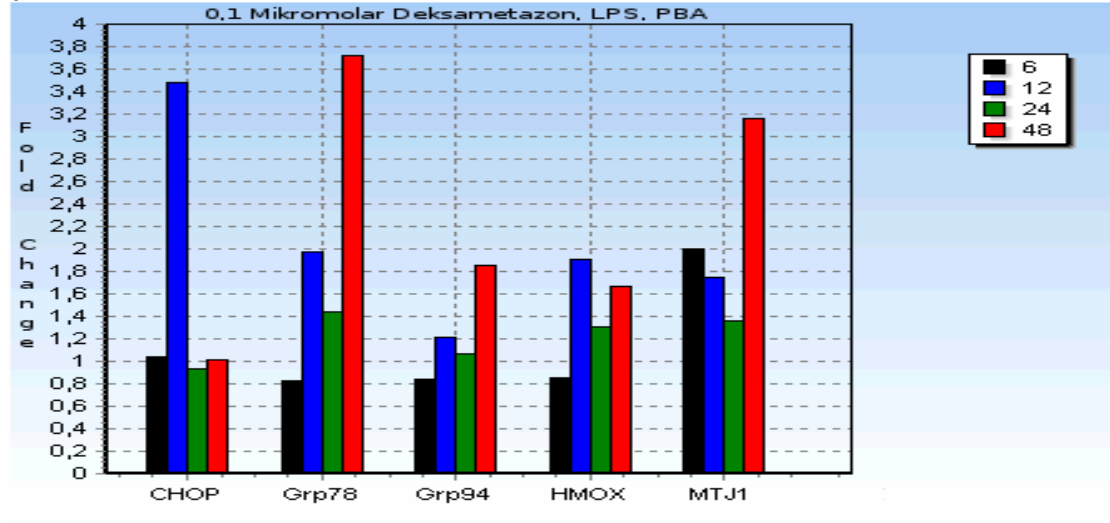
Şekil 22’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 1 μ M Deksetazon ve 0.1 μ M LPS uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. LPS ilavesi ile 12. saatde Grp94 hariç diğer genlerde belirgin ekspresyon artışı mevcuttur.

Şekil 22



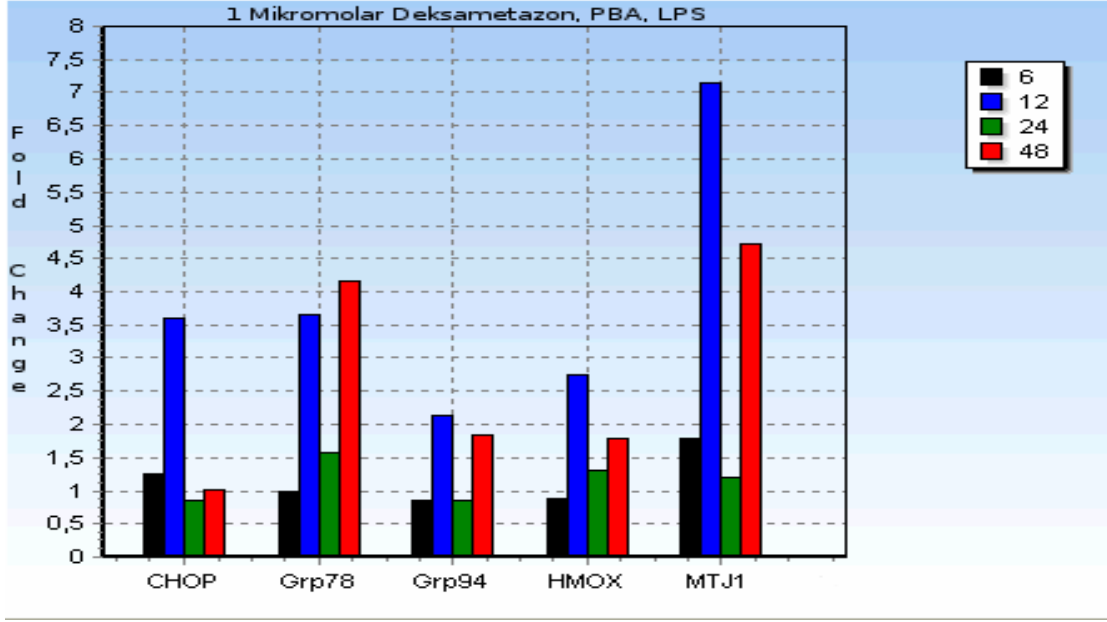
Şekil 23’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 0.1 μ M Deksetazon ve 0.1 μ M LPS ve 1 mM uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. Grp78 ve MTJ1 gen ekspresyonları 48. saatde belirgin artış göstermektedir. CHOP gen ekspresyonu ise 12. saatte artmaktadır.

Şekil 23



Şekil 24’de 6, 12, 24, 48 saat boyunca 1 µM Dekstametazon ve 0.1 µM LPS ve 1 mM uygulanan HEp2 hücrelerinde çalışılan UPR gen ekspresyonlarının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. CHOP ekspresyonunda bir önceki çalışmaya göre değişiklik görülmemektedir. Ancak Grp78 ve MTJ1 gen ekspresyonlarında 12 saatteki artış dikkat çekmektedir.

Şekil 24



4.4 Yüzey Grp78 Cell ELISA sonuçları

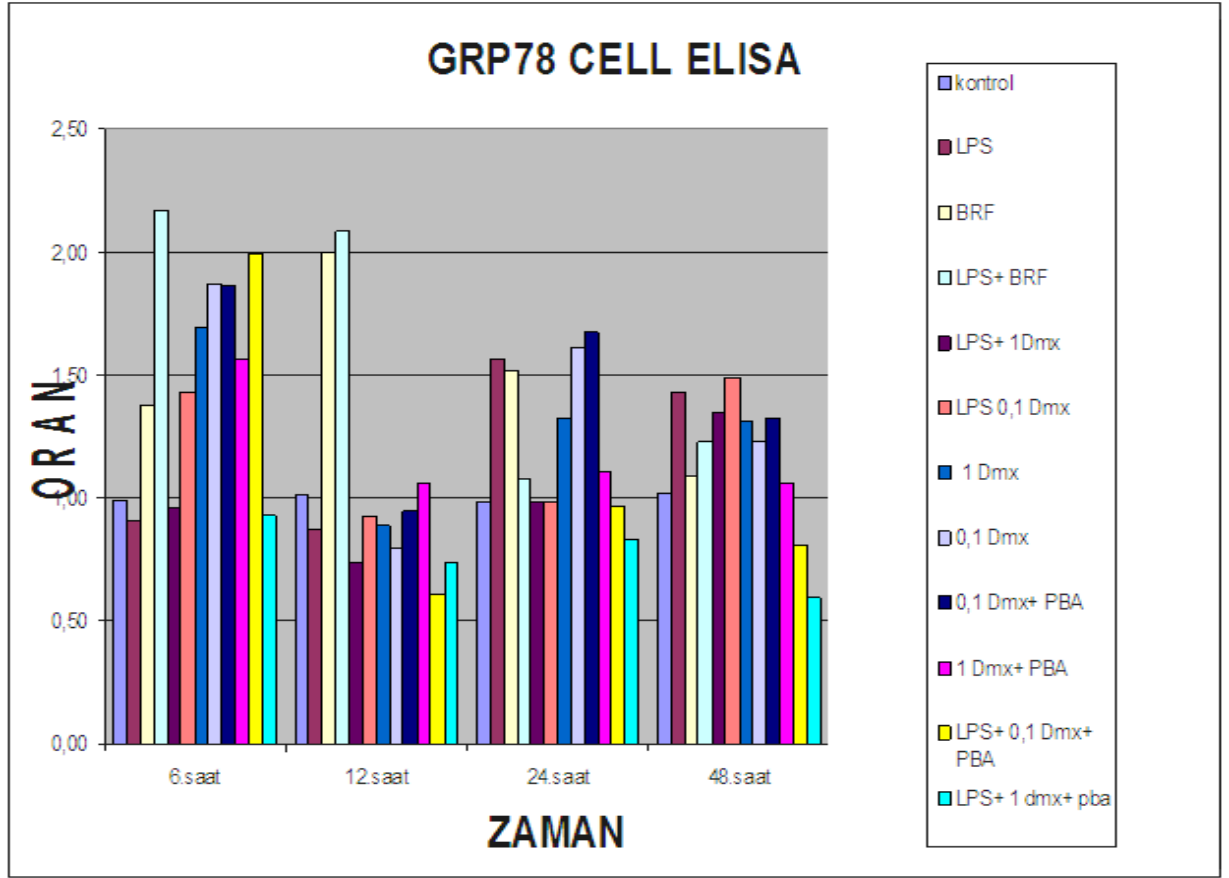
Tablo XV

Grup ismi	Well	plate1 40.dk 655	plate1 janus 615	plate1 655/615	Grup ismi	Well	plate2 40.dk 655	plate2 janus 615	plate2 655/615
kontrol	A1	0,062	0,3	0,21	kontrol	A1	0,068	0,3	0,23
kontrol	B1	0,081	0,42	0,19	kontrol	D1	0,077	0,42	0,18
kontrol	C1	0,069	0,461	0,15	kontrol	E1	0,169	0,461	0,37
kontrol	D1	0,081	0,322	0,25	kontrol	F1	0,063	0,322	0,20
kontrol	E1	0,097	0,287	0,34	kontrol	G1	0,063	0,287	0,22
kontrol	F1	0,087	0,269	0,32	kontrol	H1	0,059	0,269	0,22
kontrol	G1	0,08	0,321	0,25	kontrol	A2	0,107	0,321	0,33
kontrol	H1	0,092	0,347	0,27	kontrol	B2	0,204	0,347	0,59
LPS 6	A2	0,077	0,552	0,14	LPS	C2	0,203	0,552	0,37
LPS 6	B2	0,1	0,617	0,16	LPS	D2	0,184	0,617	0,30
LPS 6	C2	0,1	0,478	0,21	LPS	E2	0,234	0,478	0,49
LPS 12	D2	0,088	0,516	0,17	LPS	F2	0,163	0,516	0,32
LPS 12	E2	0,105	0,597	0,18	LPS	G2	0,184	0,597	0,31
LPS 12	F2	0,094	0,508	0,19	LPS	H2	0,09	0,508	0,18
LPS 24	G2	0,097	0,229	0,42	LPS	A3	0,084	0,229	0,37
LPS 24	H2	0,089	0,355	0,25	LPS	B3	0,193	0,355	0,54
BRF	A3	0,081	0,321	0,25	BRF	C3	0,113	0,321	0,35
BRF	B3	0,095	0,498	0,19	BRF	D3	0,136	0,498	0,27
BRF	C3	0,095	0,455	0,21	BRF	E3	0,117	0,455	0,26
BRF	D3	0,096	0,226	0,42	BRF	F3	0,058	0,226	0,26
BRF	E3	0,105	0,123	0,85	BRF	G3	0,069	0,123	0,56
BRF	F3	0,105	0,149	0,70	BRF	H3	0,065	0,149	0,44
BRF	G3	0,115	0,475	0,24	BRF	A4	0,087	0,475	0,18
BRF	H3	0,078	0,341	0,23	BRF	B4	0,153	0,341	0,45
LPS+BRF	A4	0,07	0,443	0,16	LPS+BRF	C4	0,138	0,443	0,31
LPS+BRF	B4	0,105	0,391	0,27	LPS+BRF	D4	0,121	0,391	0,31
LPS+BRF	C4	0,098	0,367	0,27	LPS+BRF	E4	0,137	0,367	0,37
LPS+BRF	D4	0,094	0,123	0,76	LPS+BRF	F4	0,061	0,123	0,50
LPS+BRF	E4	0,107	0,105	1,02	LPS+BRF	G4	0,062	0,105	0,59
LPS+BRF	F4	0,11	0,191	0,58	LPS+BRF	H4	0,06	0,191	0,31
LPS+BRF	G4	0,114	0,406	0,28	LPS+BRF	A5	0,086	0,406	0,21
LPS+BRF	H4	0,081	0,465	0,17	LPS+BRF	B5	0,143	0,465	0,31
lps+1dmx	A5	0,073	0,504	0,14	lps+1dmx	C5	0,152	0,504	0,30
lps+1dmx	B5	0,091	0,4	0,23	lps+1dmx	D5	0,195	0,4	0,49
lps+1dmx	C5	0,091	0,515	0,18	lps+1dmx	E5	0,156	0,515	0,30
lps+1dmx	D5	0,087	0,509	0,17	lps+1dmx	F5	0,182	0,509	0,36
lps+1dmx	E5	0,1	0,627	0,16	lps+1dmx	G5	0,16	0,627	0,26
lps+1dmx	F5	0,098	0,408	0,24	lps+1dmx	H5	0,095	0,408	0,23
lps+1dmx	G5	0,095	0,358	0,27	lps+1dmx	A6	0,085	0,358	0,24

lps+1dmx	H5	0,093	0,427	0,22	lps+1dmx	B6	0,1	0,427	0,23
lps+0.1 dmx	B6	0,134	0,439	0,31	lps+0.1 dmx	C6	0,161	0,439	0,37
lps+0.1 dmx	C6	0,142	0,457	0,31	lps+0.1 dmx	D6	0,244	0,457	0,53
lps+0.1 dmx	D6	0,136	0,56	0,24	lps+0.1 dmx	E6	0,17	0,56	0,30
lps+0.1 dmx	E6	0,1	0,581	0,17	lps+0.1 dmx	F6	0,159	0,581	0,27
lps+0.1 dmx	F6	0,102	0,452	0,23	lps+0.1 dmx	G6	0,169	0,452	0,37
lps+0.1 dmx	G6	0,154	0,356	0,43	lps+0.1 dmx	H6	0,112	0,356	0,31
lps+0.1 dmx	H6	0,085	0,323	0,26	lps+0.1 dmx	A7	0,103	0,323	0,32
1 dmx	B7	0,121	0,31	0,39	1 dmx	B7	0,089	0,31	0,29
1 dmx	C7	0,138	0,412	0,33	1 dmx	C7	0,127	0,412	0,31
1 dmx	D7	0,111	0,382	0,29	1 dmx	D7	0,135	0,382	0,35
1 dmx	E7	0,134	0,428	0,31	1 dmx	E7	0,171	0,428	0,40
1 dmx	F7	0,132	0,465	0,28	1 dmx	F7	0,148	0,465	0,32
1 dmx	G7	0,109	0,536	0,20	1 dmx	G7	0,148	0,536	0,28
1 dmx	H7	0,144	0,374	0,39	1 dmx	H7	0,101	0,374	0,27
0.1dmx	A8	0,084	0,278	0,30	0.1dmx	A8	0,123	0,278	0,44
0.1dmx	B8	0,109	0,261	0,42	0.1dmx	B8	0,138	0,261	0,53
0.1dmx	C8	0,138	0,406	0,34	0.1dmx	C8	0,149	0,406	0,37
0.1dmx	D8	0,162	0,446	0,36	0.1dmx	D8	0,106	0,446	0,24
0.1dmx	E8	0,102	0,424	0,24	0.1dmx	E8	0,165	0,424	0,39
0.1dmx	F8	0,117	0,501	0,23	0.1dmx	F8	0,147	0,501	0,29
0.1dmx	G8	0,094	0,384	0,24	0.1dmx	G8	0,13	0,384	0,34
0.1dmx	H8	0,084	0,349	0,24	0.1dmx	H8	0,126	0,349	0,36
0.1dmx+ PBA	A9	0,068	0,327	0,21	0.1dmx+ PBA	A9	0,14	0,327	0,43
0.1dmx+ PBA	B9	0,135	0,296	0,46	0.1dmx+ PBA	B9	0,135	0,296	0,46
0.1dmx+ PBA	C9	0,125	0,281	0,44	0.1dmx+ PBA	C9	0,132	0,281	0,47
0.1dmx+ PBA	D9	0,102	0,414	0,25	0.1dmx+ PBA	D9	0,149	0,414	0,36
0.1dmx+ PBA	E9	0,112	0,565	0,20	0.1dmx+ PBA	E9	0,137	0,565	0,24
0.1dmx+ PBA	F9	0,163	0,385	0,42	0.1dmx+ PBA	F9	0,138	0,385	0,36
0.1dmx+ PBA	G9	0,12	0,474	0,25	0.1dmx+ PBA	G9	0,117	0,474	0,25
0.1dmx+ PBA	H9	0,142	0,446	0,32	0.1dmx+ PBA	H9	0,109	0,446	0,24
1dmx+ PBA	A10	0,095	0,349	0,27	1dmx+ PBA	A10	0,102	0,349	0,29
1dmx+ PBA	B10	0,109	0,389	0,28	1dmx+ PBA	B10	0,126	0,389	0,32
1dmx+ PBA	C10	0,114	0,414	0,28	1dmx+ PBA	C10	0,136	0,414	0,33
1dmx+ PBA	D10	0,134	0,35	0,38	1dmx+ PBA	D10	0,101	0,35	0,29
1dmx+ PBA	E10	0,152	0,494	0,31	1dmx+ PBA	E10	0,119	0,494	0,24
1dmx+ PBA	F10	0,161	0,544	0,30	1dmx+ PBA	F10	0,133	0,544	0,24
1dmx+ PBA	G10	0,152	0,432	0,35	1dmx+ PBA	G10	0,089	0,432	0,21
1dmx+ PBA	H10	0,083	0,388	0,21	1dmx+ PBA	H10	0,066	0,388	0,17
lps+0.1dmx+PBA	A11	0,097	0,486	0,20	lps+0.1dmx+PBA	A11	0,068	0,486	0,14
lps+0.1dmx+PBA	B11	0,156	0,287	0,54	lps+0.1dmx+PBA	B11	0,092	0,287	0,32
lps+0.1dmx+PBA	C11	0,121	0,434	0,28	lps+0.1dmx+PBA	C11	0,108	0,434	0,25
lps+0.1dmx+PBA	D11	0,138	0,37	0,37	lps+0.1dmx+PBA	D11	0,074	0,37	0,20
lps+0.1dmx+PBA	E11	0,108	0,626	0,17	lps+0.1dmx+PBA	E11	0,128	0,626	0,20
lps+0.1dmx+PBA	F11	0,113	0,513	0,22	lps+0.1dmx+PBA	F11	0,101	0,513	0,20

lps+0.1dmx+PBA	G11	0,064	0,418	0,15	lps+0.1dmx+PBA	G11	0,063	0,418	0,15
lps+0.1dmx+PBA	H11	0,091	0,344	0,26	lps+0.1dmx+PBA	H11	0,054	0,344	0,16
lps+1dmx+PBA	A12	0,091	0,394	0,23	lps+1dmx+PBA	A12	0,074	0,394	0,19
lps+1dmx+PBA	B12	0,064	0,355	0,18	lps+1dmx+PBA	B12	0,087	0,355	0,25
lps+1dmx+PBA	C12	0,097	0,484	0,20	lps+1dmx+PBA	C12	0,071	0,484	0,15
lps+1dmx+PBA	D12	0,096	0,543	0,18	lps+1dmx+PBA	D12	0,075	0,543	0,14
lps+1dmx+PBA	E12	0,075	0,456	0,16	lps+1dmx+PBA	E12	0,091	0,456	0,20
lps+1dmx+PBA	F12	0,11	0,367	0,30	lps+1dmx+PBA	F12	0,058	0,367	0,16
lps+1dmx+PBA	G12	0,072	0,357	0,20	lps+1dmx+PBA	G12	0,062	0,357	0,17
lps+1dmx+PBA	H12	0,069	0,371	0,19	lps+1dmx+PBA	H12	0,075	0,371	0,20

Şekil 25 Kontrol grubuna göre Yüzey Grp78 ekspresyon



6, 12, 24, 48 saat boyunca HEp2 hücreleri kullanılarak çalışılan yüzey Grp78 ekspresyon analizi gruplara göre aşağıda değerlendirilmiştir.

0.1 uM Brefeldin A uygulanan grupta 6, 12, 24. saatlerde kontrole göre anlamlı artış bulunmaktadır.

0.1 uM LPS uygulanan grupta 24 ve 48.saatlerde yüzey Grp78 ekspresyonu kontrol grubuna göre artış göstermektedir.

0.1 uM Brefeldin A ve 0.1 uM LPS uygulanan grupta 6 ve 12. saatlerde yüzey Grp78 ekspresyon artışı mevcuttur.

0.1 µM ve 1 µM deksametazon uygulanan grupta 12. saat hariç diğer saatlerde yüzey Grp78 ekspresyon artışı gerçekleşmiştir.

0.1 μ M deksametazona LPS ilave edilen uygulanan grupta 6 ve 48. saatlerde yüzey Grp78 ekspresyon artışı mevcuttur. 1 μ M deksametazon ve LPS grubunda ise sadece 48.saatde anlamlı artış vardır.

0.1 μ M deksametazona PBA ilave edilen uygulanan grupta 6, 24 ve 48. saatlerde yüzey Grp78 ekspresyon artışı mevcuttur. 1 μ M deksametazon ve PBA grubunda ise sadece 48.saatde anlamlı artış vardır.

0.1 μ M deksametazona PBA ve LPS ilave edilen uygulanan grupta 6. saatde yüzey Grp78 ekspresyon artışı mevcuttur. 1 μ M deksametazona PBA ve LPS eklenen grupta ise sadece kontrol grubuna göre anlamlı artış tespit edilememiştir.

5. TARTIŞMA

UPR; hücre içinde çevresel veya fizyolojik durumlara karşı ER'nin adaptasyon için kullandığı yolaktır. Endoplazmik retikulum kapasitesinden fazla yükü karşılar ve baş edemezse UPR aktive olur. Asıl amaç hücre yaşamının devam ettirilmesi için koruyucu mekanizmaların kullanılmasıdır. UPR fizyolojik şartlarda olabildiği gibi patolojik durumlarda da ortaya çıkmaktadır (57, 106).

UPR üç farklı yoldan oluşmaktadır (81). Her bir yolağın aktiflenmesi beraberindeki GRP78'in ayrılmasıyla meydana gelir. Yolakların kullanılması sonucu elde edilen ilk cevap translasyonun durdurularak protein yükünün azaltılmasıdır (58). Bu arada şaperonların gen ekspresyonları da arttırılmaktadır (74). Katlanamayan proteinlerin ER'ye ek yük getirmemesi için proteinler yıkıma gönderilmektedir (ERAD) (63, 110).

Hücre karşılaştığı stresden kurtulamazsa çevre hücrelerin etkilenmemesi için apoptozise yönlendirilir. UPR sonucunda pro-apoptotik CHOP'un da rol oynadığı mekanizmalarla hücre ölümü gerçekleşir (110).

UPR'yi en iyi gösteren parametrelerin başında CHOP, Grp78, Grp94, MTJ1 ve HMOX1 gelmektedir. Bu genlerin ekspresyonlarının tesbiti ile hücredeki strese cevap monitorize edilebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda yüzey GRP78 ekspresyonunun kanser ile ilişkisine bakılmıştır (65, 67). Çoğu yayında bu molekülün aslında hücreyi koruyucu görevlere sahip olduğu tesbit edilmiştir (45, 64, 71, 96). Hücre yüzeyinde kompleks halinde bulunmakta ve çeşitli ligandlarla etkileşmektedir (3, 40, 136). Grp78, ER stresin dolayısı ile UPR'nin esas düzenleyicisidir (45). Tümör mikroçevresinde, tümör hücreleri hipoksi ve besin eksikliği nedeniyle ER strese maruz kalır. Kanser hücrelerinde ER stresin indüklediği Grp78, hücre yaşamının devamını sağlarken, tümör progresyonu, ilaç direnci gelişiminde de katkıda bulunur (65). Yüzey Grp78, spesifik bazı proteinlerle kompleksler oluşturarak hücre içi sinyal yollarında önemli roller oynamaktadır (40).

Kanser tedavisinde, tümör hücrelerinin yüzeyinde eksprese olan Grp78'in hedef alındığı yeni terapötikler geliştirilmesi durumunda normal hücreler etkilenmeden tedavi etkinliği artırılabilir (136).

Deksametazon glukokortikoiddir. Antiinflamatuvar, antiemetik, antiproliferatif etkileri olduğu bilinmektedir. Deksametazon kullanılan çalışmalarda farklı hücre tiplerinde farklı etkilere sahip olduğu izlenmiştir (70). UPR ile ilgili olarak da farklı çalışmalar yapılmıştır. Monositlerle yapılan çalışmalarda, deksametazonun farklı dozları kullanılarak elde edilen sonuçlarda apoptotik özelliğinden söz edilmektedir. Bu çalışmalarda LPS kullanılarak hücrelerin senkronizasyonu sağlanmaya çalışılmıştır. Öncesinde LPS kullanılarak farklı zamanlarda farklı dozlarda deksametazon uygulanmış ve hücrenin doza bağlı olarak apoptozise gittiği gözlemlenmiştir (33, 89, 105, 133).

ER stresör ajanlar kullanılarak UPR geliştirilebilmektedir. Bunlarda biri olan Brefeldin A, ER ile golgi arasındaki transportu önleyen kimyasaldır. Bir çok hücre hattında yapılan çalışmada ER strese yol açarak apoptozise gidişi sağladığı tespit edilmiştir (53, 99, 133).

Fenil bütirik asit kimyasal şaperon olarak bilinen histon deaçetilaz inhibitörüdür. Yapılan çalışmalarda var olan stresin geri döndürülmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (77, 137).

HEp 2 hücrelerinde deksametazonun UPR genlerine (Grp78, Grp94, MTJ1, HMOX1, CHOP) olan etkisini araştıran yayına rastlanmamıştır. Çalışmamız sırasında brefeldin A'nın ER stresör olarak kullanıldığı grup pozitif grup olarak değerlendirilmiştir. Farklı hücre modelleri ile yapılan çalışmalarda farklı doz ve zaman boyutunda kullanılan kimyasalın UPR yolağını aktiflediği tesbit edilmiştir. Doz miktarı literatür esas alınarak tesbit edilmiştir (53, 99). Lenfoma hücreleri ile yapılan çalışmada ER stresör ajanının apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (133).

LPS tek başına kullanıldığında UPR üzerinde pozitif yönde etki yapmamıştır. 24. saatten itibaren UPR gen ekspresyonlarında kontrole göre iki kata yakın azalma yapmıştır. Cell eliza sonuçlarına göre ise 24. saatten itibaren yüzey Grp78 ekspresyonlarında artış tesbit edilmiştir. Monosit hücrelerinde LPS antiapoptotik özellikte olduğu bilinmektedir. Ancak HEp 2 hücrelerindeki etkisi ile ilgili fazla bir yayın yoktur.

Bref A ile LPS beraber kullanıldığında Bref A'nın tek başına ekspresyonlarını stresör etkisi 12. saatten itibaren azalmaya başlamıştır. Ancak yüzey GRP 78 ekspresyonunda dikkate değer değişiklik meydana gelmemiştir.

Deksametazonun 0.1 mikromolar kullanılan dozunda 24. saatte UPR gen ekspresyonlarının azaldığı tesbit edilmiştir. Yüzey GRP78 ekspresyonları ise 6 ve 24. saatte kontrole göre anlamlı artmıştır. Deksametazonun 1 mikromolarlık dozu içinde durum geçerlidir.

LPS ile beraber kullanıldıklarında ise UPR gen ekspresyonları 0.1 mikromolarda 6. ve 12. saatlerde de yükselirken 1 mikromolar olan grupta 12. saatde yükselmiştir. Yüzey grp78 ekspresyonları ise 48. saatde yükselmiştir.

Kimyasal şaperon kullanıldığında ise deksametazonun tek başına yaptığı etki geri döndürülmeye çalışılmıştır. Bu durum her iki doz aralığı için de geçerlidir. Şöyle ki 0.1 μ M Deksametazon ve 1 mM PBA beraber kullanıldığında Grp78, Grp94, MTJ1 gen ekspresyonları artmıştır. Yine 1 μ M deksametazon ile PBA beraber kullanıldığında Grp78, Grp94, MTJ1 gen ekspresyonları artmıştır.

Çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak 0,1 μ M Brefeldin A'nın kullanıldığı grup seçilmiştir. ER stres ajanı olan molekülün farklı hücre hatları kullanılarak yapılan bir çok çalışmada stresör etkisi gösterilmiştir. İnsan foliküler lenfoma hücreleri olan HF1A3, HF4.9 ve HF28RA kullanılarak yapılan bir çalışmada 0.1-0.01 μ M Brefeldin A ile hücre proliferasyonunun 24 saatlik sürede doza bağımlı olarak azaldığı tesbit edilmiştir (133). Aynı çalışmada Grp78 up-regulasyonu da gösterilmiş ve bu durumun ER stres oluşumunun göstergesi olduğu iddia edilmiştir. İnsan monosit hücrelerinde yapılan çalışmalarda da Brefeldin A, ER stres ajanı olarak kullanılmıştır (8). Biz de HEP2 hücre modelimizde pozitif kontrol oluşturmak amacıyla Brefeldin A kullanmaya karar verdik. Çalışma sonucuna kanser hücresinde var olan ER stresi daha da artırdığı UPR gen ekspresyon oranlarındaki artış ile tesbit edilmiştir.

HEP2 hücrelerinde UPR'nin apoptotik sinyalizasyonu (CHOP) ile beraber adaptif sinyalizasyonunda da (Grp94, Grp78) aktif olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda Geç ER stres adaptive cevapda rol oynayan HMOX1 transkripsiyonu yüksek bulunmuştur. Bilindiği gibi Grp 78'in ko-şaperonu MTJ1'dir ve Brefeldin A ile muamele edilen HEP2 hücrelerinde ekspresyonu birbirine paralel seyretmiştir.

İlk 24 saat boyunca Yüzey Grp78 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu artış Grp78 ve MTJ1 gen ekspresyon artışı ile 24 saat boyunca paralel artmıştır. Ancak 48. saatde paralellik ortadan kalkmıştır.

PC-3 ve MCF-7 hücrelerinde 30 ng/ml dozda kullanılan Brefeldin A'nın apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. mRNA CHOP gen ekspresyonunun up-regüle olduğu aynı çalışmada RT-PCR analizleri ile rapor edilmiştir (60).

LPS hücreden hücreye farklı etki gösteren, çoğu zaman hücre senkronizasyonu için kullanılan bir ajandır. İnsan monosit hücre kültürlerinde membran glukokortikoid reseptör miktarının artırılması amacı ile kullanılmıştır (8). Murine makrofaj hücre hattı olan RAW 264.7, 24 saat boyunca 0,1 µM LPS ile muamele edilmiş daha sonra 0.5 µM Brefeldin A ile inkübe edilmiştir. Bu çalışma ile Brefeldin A'nın tek başına iken oluşturduğu apoptozisin LPS ile ön uygulama sonucu engellendiği gösterilmiştir (53). Ancak LPS'nin bütün hücrelerde ER stresi gidererek apoptozisi önleyeceği söylenememektedir. Bizim çalışmamızda LPS tek başına kullanıldığında HEp2 hücrelerinde kontrole göre UPR gen ekspresyonlarını azalttığı tesbit edilmiştir.

HEp2 hücre kültüründe Brefeldin A ve LPS'nin beraber kullanıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. 0.1 µM Brefeldin A ve 0,1 µM LPS ile muamele edilen hücre grubunda 48. saatde belirgin olmak üzere Brefeldin A'nın tek başına iken neden olduğu UPR gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçla HEp2 hücrelerinde LPS'nin, Brefeldin A'nın neden olduğu ER stresi azalttığı söylenebilir.

RAW 264.7 hücre hattında LPS ve CHOP arasındaki ilişki araştırılmıştır (53). LPS tek başına kullanıldığında UPR aktive olmakta ancak daha çok ER fonksiyonunu korumaya yönelik moleküllerin özellikle de Grp78'in miktarı artırılmaktadır. Aksine pro-apoptotik transkripsiyon faktörü olan CHOP'un düşük miktarda eksprese edildiği ancak apoptozise neden olmadığı aynı çalışmanın sonuçlarından biridir. Aynı çalışmada TG'nin, ER stresör, CHOP üzerinden apoptozise yol açtığı belirtilmiştir. LPS ile ön muamele edilen hücrelerde ise Grp78 miktarı CHOP'a göre daha önce artmaya başlamaktadır ve TG'nin indüklendiği apoptozisin LPS ile engellendiği çalışmanın diğer sonuçlarından biri olarak rapor edilmiştir (53).

1 µM Deksmetazon LPS PBA beraber kullanıldığında ise 1 µM Dex ve PBA'nın kullanıldığı gruba göre Grp78, Grp94, MTJ1 ekspresyonlarında artış gözlenmiştir.

HMOX1 ekspresyonu en fazla BRFA ve BRFA + LPS uygulanan gruplarda 24 ve 48 saatte tesbit edilmiştir.

Çalışılan bütün gruplarda Grp78 ve MTJ1 gen ekspresyonlarının birbirine paralel seyrettiği gözlenmiştir. Ancak bu paralellik yüzey Grp 78 ile her zaman paralel

gitmemiştir. Yüzey Grp78 ekspresyonları genel olarak çalışma boyunca kontrole yakın seyretmiştir. Muhtemelen transkripsiyonel düzeydeki artışların protein miktarına yansması eş zamanlı olmamaktadır.

Bu çalışma ile HEP2 hücre kültür ortamında farklı deksametazon dozlarının kullanılması sonucu UPR gen ekspresyonlarının negatif yönde etkilendiği gösterilmiştir. Bu durumda HEP2 hücre modelinde deksametazonun apoptotik etkili olmadığı anlaşılmıştır. Yüzey Grp78 ekspresyonları ise kontrole göre artmış bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda yüzey Grp78 varlığı ile apoptozis arasında ters ilişki olduğu rapor edilse bile etkileştiği ligand daha fazla önem arz etmektedir. Çalışma sonucunda deksametazonun etkisi kimyasal şaperon PBA ile geri çevrilmiştir. Ancak yüzey Grp78 ekspresyonu tek başına deksametazon kullanılan gruba göre anlamlı değişiklik göstermemiştir. Ayrıca brefeldin A'nın UPR gen ekspresyonu üzerine olan pozitif etkilerinin LPS ile azaltılabileceği anlaşılmıştır.

SONUÇLAR

- 1) Gen ekspresyon analizleri için uygun primer-prob dizaynı için biyoinformatik analizler tarafımızca gerçekleştirilmiştir.
- 2) Biyoinformatik analizi yapılan primer-problarla Kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılarak gen ekspresyonları başarı ile analiz edilmiştir.
- 3) Cell ELISA protokolü tarafımızca çalışmamıza uygun şekilde hazırlanarak yüzey Grp78 protein ekspresyonu değerlendirilmiştir.
- 4) Çalışmada apoptotik etkili olacağı ve UPR gen ekspresyonunu artıracığı düşünülen deksametazonun aksine UPR gen ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir.
- 5) BRFA ile LPS tek başına ve aynı anda HEP2 hücrelerinde çalışılmıştır.
- 6) Kimyasal şaperon olarak kullanılan PBA'nın deksametazonun oluşturduğu etkileri geri çevirebildiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR:

- 1) Anfinsen CB, Haber E, Sela M, White FH. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidative of the reduced polypeptide chain. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A 47: 1309-1314, 1961
- 2) Anken V, Romijn E, Maggioni EP, Mezghrani C, Sitia A et al. Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. Immunity 18: 243-253, 2003
- 3) Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A and Sarkis AS et all. Cell surface expression of the stres response chaperone Grp78 enables tumor targeting by circulating ligands. Cancer Cell 6:275-284, 2004
- 4) Argon Y, Simen BB. Grp94 an chaperone with protein and peptide binding properties. Cell and developmental biology 10: 495-505, 1999
- 5) Arruda MA, Rossi AG, Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappa B. J. Immunol. 17: 2023-2030, 2004
- 6) Balla G, Jacob HS, Rosenberg M, Nath K and et al. Ferriitin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. J Biol. Chem. 267: 18148-18153, 1992
- 7) Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular deterninants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. Endocrinol Rev 17: 245-261, 1996
- 8) Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and upregulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J. 18: 70-80, 2004
- 9) Brightman SE, Blatch , Zetter BR. Isolation of a Mouse cDNA encoding MTJ1; a new memberof the DnaJ family of proteins. Gene153:249, 1995
- 10) Binder RJ. et al. CD91 a receptor for heat shock protein gp96. Nat. Immunol.1: 151-155, 2000
- 11) Bodsch W, Takahashi K, Barbier A, Ophoff BG, Hossmann KA. Cerebral protein synthesis and ischemia. Prog. Brain. Res 63: 197-210, 1985

- 12) Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH and et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp. Med.* 192: 1015-1026, 2000
- 13) Buck TM, Wright CM, Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum (review). *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18: 751-61, 2007
- 14) Buttgerit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67: 529-534, 2002
- 15) Buttgerit F, Wehling M, Burmester GR. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions. Steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* 41: 761-767, 1998
- 16) Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415: 92-96, 2002
- 17) Chen HC, Farese RV. Steroid hormones: Interactions with-membrane bound receptors. *Curr Biol* 9: 478-481, 1999
- 18) Chevalier M, Rhee E, Elguindi J, Blond SY. Interaction of murine BiP/Grp78 with DnaJ homologue MTJ1. *J Biol Chem.* 275: 19620, 2000
- 19) Christ M, Gunther A, Heck M, Schmidt BM, Falkenstein E, Wehling A. Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 23: 1485-1491, 1999
- 20) Conn KJ, Gao WW, Ullman MD, McKeon-O'Malley C, Eisenhour PB, Fine RE and et al. *J Neurosci Res.* 68: 755-760, 2002
- 21) Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Tessier DC, Kay C and et al. Ca^{+2} regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J. Biol. Chem* 274: 6203-6211, 1999
- 22) Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription independent mechanism. *Brit. J Pharmacol* 130: 289-298, 2000

- 23) Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Mark Lathrop G, Julier J. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat. Genet.* 25: 406-409, 2000
- 24) Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature* 426: 884-890, 2003 50
- 25) Dobson CM, Sali A, Karplus M. Protein folding: a perspective from theory and experiment. *Angew Chem. Int. Ed. Eng* 7: 868-893, 1998
- 26) Doutheil J, Treiman M, Oschlies U, Paschen W. Recovery of neuronal protein synthesis after irreversible inhibition of the endoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium* 25: 419-428, 1999
- 27) Dudek J, Volkmer J, Bies C, Guth S, Müller A and et al. A novel type f co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaJ-like chaperone to ribosomes. *EMBO J.* 21: 2958, 2002
- 28) Eaton WA, Munoz V, Thompson PA, Henry ER, Hofrichter J. Kinetics and dynamics of loops, α -helices, β -hairpins, and fast-folding proteins. *Acc. Chem. Res.* 31: 745-753, 1998
- 29) Eberhardt NL. A shell programme for the design of PCR primers using genetic computer group (GCG) software (7.1) on VAX/VMS systems. *Biotechniques* 13: 914-917, 1992
- 30) Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankey G, Yusuf S. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann. Intern. Med* 131: 363-375, 1999
- 31) Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality controls in the secretory pathway. *Science* 286: 1882-1888, 1999
- 32) Frand AR, Kaiser CA. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 1: 161-170, 1998
- 33) Faustina N, Sackey A, Warson CS and Gametchu B. Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. *Am. J. Physiol.* 273: 571-583, 1997
- 34) Fernandes PM et al. Overexpression of the glucose regulated stress gene Grp78 in malignancy but not benign human breast lesions. *Breast cancer res.treat.* 59: 15-26, 2000

- 35) Freiden PJ, Gaut JR, Hendeshot. Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. *EMBO J* 11:63-70, 1992
- 36) Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 64: 107-119, 1999
- 37) Gass JN, Gifford NM, Brewer JW. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J. Biol. Chem.* 277: 49047-49054, 2002
- 38) Gerber J, Muhlenhoff U, Hofhaus G, Lill R, Lisowsky TYeast Erv2p is the microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/A1rp protein family. *J Biol. Chem.* 276: 23486-23491, 2001
- 39) Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection heme oxygenase-1 (review). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 50: 323-354, 2010
- 40) Gonzales Gronow M, Selim AM, Papalas J, Pizzo SV. Grp78: A multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxidants and redoks signaling* 11: 2299-2306, 2009
- 41) Hamamura RS, Ohyashiki JH, Kobayashi C, Zhang Y and Takaku T et all. Induction of heme oxygenase-1 by cobalt protoporphyrin enhances the antitumor effect of bortezomib in adult T-cell leukaemia cells. *British Journal of cancer* 97: 1099-1105, 2007
- 42) Hammond C, Helenius A. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER intermediate compartment and golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* 126: 41-52, 1994
- 43) Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stres and the development of diabetes (review). *Diabetes* 51: S455-S461, 2002
- 44) Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic reticulum resident kinase. *Nature* 397: 271-274, 1999
- 45) Henderson LM. The ER chaperone BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J med* 71: 289-297, 2004
- 46) High S, Lecomte FJ, Russel SJ, Abell BM, Oliver JD. Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett.* 476: 38-41, 2000

- 47) Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P et al. Diabetes Mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk^{-/-}* mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* 7: 1153-1163, 2001
- 48) Horndasch M, Lienkamp S, Springer E, Schnitt A, J Gloy and et al. The C/EBP homologous protein CHOP (GADD 153) is an inhibitor of Wnt/TCF signals. *Oncogene* 25: 3397-3407, 2006
- 49) Horwich A. Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J. Clin. Invest.* 110: 1221-1232, 2002
- 50) Hu BR, Janelidze S, Ginsberg MD, Busto R, Perez-Pinzon M and et al. Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 865-875, 2001
- 51) Huang RF, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci.* 68: 2799-2811, 2001
- 52) In-Ho Song, Frank Buttgerit Nongenomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Molecular and cellular Endocrinology* 246: 142-146, 2006
- 53) Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Ito H, Koide N, Mori I, et al. Lipopolysaccharide prevents apoptosis induced by brefeldin A, an endoplasmic reticulum stress agent in RAW 264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 589-596, 2006
- 54) Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K et al. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1 *Nat. Immunol.* 4: 321-329, 2003
- 55) Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1182-1184, 2000
- 56) Janetski S. et al. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations a pilot study. *Int. J. Cancer* 88: 232-238, 2000
- 57) Kapoor A, Sanyal AJ. ER Stress and the unfolded Protein Response. *Clin Liver Disease* 13: 581-590, 2009

- 58) Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translation controls. *Genes Dev.* 13:1211-1233, 1999
- 59) Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin Invest.* 110: 1389-1398, 2002
- 60) Kwok SC, Daskal I. Brefeldin A activates CHOP promoter at the AARE, ERSE and AP-1 elements. *Journal Molecular and Cellular Biochemistry* 319: 203-208, 2008
- 61) Kim DG, You KR, Liu MJ, Choi YK, Won YS. *J Biol. Chem.* 277: 38930-38938, 2002
- 62) Kuznetsov G, Chen LB, Nigam SK. Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *J Biol. Chem.* 272: 3057-3063, 1997
- 63) Lai Elida, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 22:193-201, 2007
- 64) Lee AS. The glucose regulated proteins: stress induction and clinical applications. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26: 504-509, 2001
- 65) Lee AS. Grp78 induction in cancer: Therapeutic and Prognostic Implications (review). *Cancer Research* 67: 3496-3499, 2007
- 66) Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor 2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 278: 12029-12038, 2003
- 67) Lee E, Nichols B, Spicer D, Groshen S, Yum C, Lee AS. Grp78 a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res.* 66: 7849-7853, 2006
- 68) Lentz SR, Sadler JE. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 81: 683-689, 1993
- 69) Lio CY, Schroder M, Kaufman RJ. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275: 24881-24885, 2000
- 70) Lipworth BJ. Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity. *The Lancet* 356: 87-88, 2000

- 71) Little E et al. The glucose regulated proteins Grp78/Grp94 functions, gene regulation and applications. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* 4:1-18, 1994
- 72) Lodish HF, Kong N, Wikstrom L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J Biol.Chem.* 267: 12753-12760, 1992
- 73) Lu Z, Cyr DM. Protein activity of Hsp70 is modified differentially by the Hsp40 co-chaperones sis1 and Ydj1. *J Biol. Chem.* 273: 27824, 1998
- 74) Ma Y and Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. (review) *Journal of Chemical Neuroanatomy* 28: 51-65, 2004
- 75) Major U, Guydosh NR, Johnson CM, Grossmann JG, Sato S and et al. The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds. *Nature* 421: 863-867, 2003
- 76) Maki RG, Eddy RL, Byers M, Shows TB, Srivastava PK. Mapping of genes for human endoplasmic reticulum heat shock protein gp94/grp94. *Somatic Cell Mol. Gen* 19: 73-81, 1993
- 77) Toru Hosoi, Miyako Sasaki, Tsuyoshi Miyahara, Chie Hashimoto, Suguru Matsuo, Michiko Yoshii and Koichiro Ozawa. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Leptin Resistance *Molecular Pharmacology* 74:610-1619, 2008
- 78) Misra UK, Gonsales-Gromow M, Gawdi G, Pizzo SV. The role of MTJ1 in cell surface translocation of Grp78, a receptor for alpha-2 macroglobin-dependent signaling. *The journal of immunology* 174: 2092-2097, 2005
- 79) Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Activation and cross talk between Akt, Nf- κ B and unfolded protein response signaling in L1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface associated Grp78. *J Biol Chem* 281: 13694-13707, 2006
- 80) Molinari M, Calanca V, Gali C, Lucca P, Paganetti P and et al. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299: 1397-1400, 2003
- 81) Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101: 452-454, 2000
- 82) Munro S, Pelham HR. C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907, 1987

- 83) Naidoo N. ER and Aging-Protein folding and ER stress response (review). Ageing Research Reviews. 8: 150-159, 2009
- 84) Ni M, Zhou H, Wey S, Baumeister P, Lee AS. PLoS ONE 4:6868
- 85) Orrenius S, Zhivotovsky P, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 552-565, 2003
- 86) Oyadomari S and Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell death and differentiation 11: 381-389, 2004
- 87) Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, Mengesdorf T. Transient cerebral ischemia activates processing of XBP-1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. J. Cereb. Blood Flow Metab. 23:449-461, 2003
- 88) Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. Curr. Opin. Cell Biol. 13: 349-355, 2001
- 89) Peterson A, Carlsson T, Jonhede S, Zetterberg M. Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture Molecular vision 14: 1344-1352, 2008
- 90) Pollard MG, Travers KJ, Weismann JS. ERO1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. Mol. Cell 1: 171-182, 1998
- 91) Pratt WB. The Hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc Soc Exp Biol Med 217: 420-434, 1998
- 92) Qiu X.-B, Shau Y.-M, Miao S and Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. Cell. Mol. Life Sci. 63: 2560-2570, 2006
- 93) Qutinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. Blood 94: 959-967, 1999
- 94) Ramakrishnan M, Tugizov S, Pereira L, Lee AS. Conformation defective herpes simplex virus 1 glycoprotein B activates the promoter of the Grp94 gene that codes for the 94 kD stress protein in the endoplasmic reticulum. DNA Cell Biol. 14: 373-384, 1995

- 95) Ranta F, Avram D, Berchtold S, Düfer M, Drews G, Lang F, Ullrich S. Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells on effect reversed by exendin 4. *Diabetes*, 55: 1380-1390, 2006
- 96) Reddy R, Mao C, Baumeister P, Austin R, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein Grp78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *J Biol Chem* 278: 20915-20924, 2003
- 97) Reeve VE, Tyrell RM. Heme oxygenase induction mediates the photoimmunoprotective activity of UVA radiation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 9317-9321, 1999
- 98) Reimold AM et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP1. *Nature* 412: 300-307, 2001
- 99) Ripley CR, Fant J, Bienkowski RS. Brefeldin A Inhibits Degradation as well as Production and secretion of collagen in human lung fibroblasts. *The journal of biological chemistry* 268: 3677-3682, 1993
- 100) Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* 110: 1383-1388, 2002
- 101) Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev. Cell Biol* 8:519-529, 2007
- 102) Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends In Cell Biology* 14: 20-28, 2004
- 103) Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Kaufman RJ. et al. Translation control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol. Cell.* 7: 1165-1176, 2001
- 104) Schmidt M, Pauels HG, Lügering N, Lügering A, Domschke W, Kucharzik T. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 β . *The journal of immunology* 163,3484-3450, 1999
- 105) Schmidt M, Lügering N, Lügering A, Pauls HG, Schulze-Osthoff K and et al. Role of CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *The Journal of Immunology* 166: 1344-1351, 2001
- 106) Schroder M and Kaufman RJ. The Mammalian unfolded protein response (review). *Mutat. Res.* 569: 29-63, 2005
- 107) Scott DW, Loo G. *Carcinogenesis* 25: 2155-2164, 2004

- 108) Sevier CS, Cuzzo JW, Vala A, Aslund F, Kaiser CA. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat. Cell Biol.* 3: 874-882, 2001
- 109) Shani G, Fischer WH, Justice NJ, Kelber JA, Vale W, Gray PC. *Mol. Cell Biol.* 28: 666-667, 2008
- 110) Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The Unfolded Protein Response- a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum (review). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 28: 79-92, 2004
- 111) Shen J. et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/Grp78 S1 S2 cleavage binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3: 99-111, 2002
- 112) Shi Y, Vattam KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell.* 18: 7499-7509, 1998
- 113) Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, Zhao R, Puravs E, Tra J, Michael CW, Misek DE and Hanash SM. *J Biol Chem* 278: 7607-7616, 2003
- 114) Soares MP, Marguti I, Cunha A, Larsen R. Immunoregulatory effects of HO-1: How does it work? *Current opinion in Pharmacology* 9: 482-489, 2009
- 115) Song I-H, Buttgerit. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Molecular and cellular Endocrinology* 246: 142-146, 2006
- 116) Snow CD, Nguyen H, Pande VS, Gruebele M. Absolute comparison of stimulated and experimental protein folding dynamics. *Nature* 420: 102-106, 2002
- 117) Stevensen FJ, Argon Y. Protein folding in the ER. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 443-454, 1999
- 118) Talukder AH, Wang R, Kumar R. *Oncogene* 21: 4289-4300, 2002
- 119) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 748, 1968
- 120) Thilmann R, Xie Y, Kleihues P, Kiessling M. Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol* 71: 88-93, 1986
- 121) Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weismann JS. Biochemical basis of oxidative protein folding in endoplasmic reticulum. *Science* 290: 1571-1574, 2000

- 122) Tu BP, Weismann JS. The FAD and O₂-dependent reaction cycle of ERO1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 10: 983-994, 2002
- 123) Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D. *Mol. Cell Biol.* 16: 1479-1489, 1996
- 124) Vile GF, Basumodak S, Waltner C, Tyrell RM. Heme oxygenase mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 2607-2610, 1994
- 125) Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. *Antioxid. Redox Signal* 11: 2307-2316, 2009
- 126) Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ. *Mol. Cell Biol.* 16: 4273-4280, 1996
- 127) Webb SE, Miller AL. Calcium signalling during embryonic development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 539-551, 2003
- 128) Welch GN, Luscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med* 338: 1042-1050, 1998
- 129) Wen XY et al. Identification of c-myc promoter-binding protein and X-box binding protein 1 as interleukin-6 target genes in human multiple myeloma cells. *Int. J. Oncol* 15: 173-178, 1999
- 130) Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK and et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* 107: 1263-1273, 2001
- 131) Wickner W, Schekman R. Protein translocation across biological membranes. *Science* 310(5753): 1452-1456, 2005
- 132) Wilks A. Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid. Redox Signal* 4: 603-614, 2002
- 133) Wlodkovic D, Skommer J, Pelkonen J. Brefeldin A triggers apoptosis associated with mitochondrial breach and enhances HA14-1 and anti-Fas-mediated cell killing in follicular lymphoma cells. *Leukemia Research* 31:1687-1700, 2007
- 134) Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85, 2005 komperatif

- 135) Wormald MR, Dwek RA. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Struct. Fold Des.* 7: 155-160, 1999
- 136) Wu Z, LI G, Wu L, Weng D, Li X ve Yao K. Cripto-1 overexpression is involved in the tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 9: 315-329, 2009
- 137) Yam GH, Gaplovska-kysela K, Zuber C and Roth J. Sodium 4-Phenylbutyrate acts as a chemical chaperone on misfolded myocilin to rescue cells from endoplasmic reticulum stres and apoptosis. *Investigative Ophthalmology and Visual science* 48: 1683-1690, 2006
- 138) Yang WY, Gruebele M. Folding at the speed limit. *Nature* 423: 193-197, 2003
- 139) Ye J. et al. Er stres induces cleavage of membrane-bound ATF-6by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6: 1355-1364, 2000
- 140) Yoneda T, Urano F, Ron D. Transmission of proteotoxicity across dcellular compartments. *Genes Dev* 16:1307-1313, 2002
- 141) Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Negishi M, Mori K. Endoplasmic reticulum stres-induced formation complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Molç Cel. Biol.* 21: 1239-1248, 2001
- 142)Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic reticulum to inflammatory response. *Nature* 454(7203): 455-462, 2008
- 143) Zhang C, Yong C, Adachi MT, Oshiro S, Aso T and et al. Homocysteine induces programmed cell death through activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 276: 35867-35874, 2001
- 144) Zhang X, Shan P, Alam J, Fu XY, Lee PJ. Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol. Chem.* 280: 8714-8721, 2005
- 145) Zhong H, Simons JW. Direct comparision of GADPH, beta-actin, cyclophilin, and 28rRNA as internal standarts for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 523-526, 1999 relatif kan
- 146) Zinster H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfood RT, Remotti H. *Genes Dev.* 12: 982-995, 1998