T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Elvan BAKAR

İNSAN NÖROBLASTOM HÜCRE HATTINDA GLİKOZİLTRANSFERAZLAR'IN PROGNOSTİK ROLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Dilara BENİM

Referans no: 10326847

EDİRNE – 2023

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Elvan BAKAR

İNSAN NÖROBLASTOM HÜCRE HATTINDA GLİKOZİLTRANSFERAZLAR'IN PROGNOSTİK ROLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi)

Dilara BENİM

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2021/44 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

EDİRNE – 2023

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Elvan BAKAR danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Dilara BENİM tarafından tez başlığı "İnsan Nöroblastom Hücre Hattında Glikoziltransferazlar'ın Prognostik Rollerinin Değerlendirilmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **…./…./…...** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Unvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Unvanı Adı Soyadı

İmza
Unvanı Adı Soyadı

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Nejdet SÜT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren tez çalışmamda çok değerli katkıları olan danışmanım Sayın Prof.Dr. Elvan BAKAR başta olmak üzere, tez çalışmasının deneysel kısımlarının TÜTAGEM'de gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı TÜTAGEM yönetimine ve Öğr. Gör. Nebiye Pelin TÜRKER'e teşekkür ederim. Çalışmanın yürütülmesinde sağladıkları maddi destekten dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **KANSER** 3
- **GLİKOBİYOLOJİ** 7
- **KANSERDE GLİKOZİLASYON** 12
- **GLİKOZİLTRANSFERAZLAR** 17
- **ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ve KANSER** 21
- **TUNİKAMİSİN** 23

GEREÇ VE YÖNTEMLER 25

BULGULAR 30

TARTIŞMA 39

SONUÇLAR 50

ÖZET 53

SUMMARY 55

KAYNAKLAR 57

ŞEKİLLER LİSTESİ 69

TABLOLAR LİSTESİ 70

ÖZGEÇMİŞ 71

SİMGE ve KISALTMALAR

ATCC: American Type Culture Collection

B3GNT: UDP-GlcNAcBetaGal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase

cDNA: Komplementer DNA

CO_2: Karbondioksit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilen-Diamin Tetra Asetik Asit

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

ER: Endoplazmik Redikulum

ERK: Hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz

FBS/FCS: Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum

GALNACT3: *N*-Asetilgalaktozaminiltransferaz 3

GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz

GlcNAc-1-P-transferaz (GPT): *N* -asetilglukosaminfosfotransferaz

GnT-V: β1,6-*N*-asetilglukozaminiltransferaz V

GPT: UDP-*N*-asetilglukosamin-dolikil fosfat N-asetilglukozamin-fosfotransferaz

H-RAS: HRAS Proto-Oncogen

IC_{50}: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon

K-RAS: KRAS Proto-Oncogen

MEK: Mitojen Aktifleştiren Kinaz

MraY: Fosfo-*N*-Asetilmuramil-Pentapeptit Transferaz

MTT: 3-(4,5-Dimetiliazol–2-Yl)-2,5 Difenil Tetrozolyum Bromid

NLG: N-Bağlı Glikosilasyon

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PNPT: Poliprenil-Fosfat-N-Asetilheksozamin-1-Fosfat-Transferaz

qRT-PCR: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

RAF: Raf-1 Proto-Oncogen, Serin/Treonin Kinase

RNA: Ribonükleik Asit

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

SH-SY5Y: İnsan Nöroblastom Hücresi

Sia: Sialik Asit

ST: Sialiltransferaz

ST8SIA2: Alfa-2,8-sialiltransferaz 8B

TM: Tunikamisin

TUTAGEM: Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi

UV: Ultraviyole

WecA: A-*N*-Asetilglukosaminil 1-Fosfat Transferaz

GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, organizmada bulunan normalin dışındaki bir hücrenin kontrolsüz biçimde çoğalarak, yakın veya uzak dokulara göç edebildiği neoplastik bir hastalık grubudur. Çocukluk dönemi kanserleri içerisinde dördüncü sırada yer alan nöroblastoma, sinir sisteminin en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür (1). Genetik faktörlerden bazıları hastalığın ilerlemesinde büyük öneme sahiptir. Bu faktörler arasında onkogenlerin aktive edilmesi, allelik fazlalılığı, alleliklerde meydana gelen kayıplar ve tümör supresör genlerin azalması sayılabilir. Ayrıca, bazı genlerde meydana gelen değişimler bu kanser prognozundan sorumludur (2-4). Nöroblastoma birçok farklı genetik ve epigenetik faktörün birlikteliğinden kaynaklanan heterojen özelliklere sahip bir hastalık olup embriyogenez sürecinde nöral krest hücrelerinde ortaya çıkan mutasyonundan köken alan 'nöroblastom kök hücreleri' tarafından oluşturulan malign bir kanser türüdür. Çocukluk çağı kanserlerinin önemli bir kısmını oluşturan nöroblastoma, anormal hücre yüzeyi glikozilasyon modelleri sergilemektedir (5-9). Kanserde gözlenen anormal glikozilasyon, glikoziltransferaz ve glikozidaz gibi enzimler ile bağdaştırılmaktadır. Bu enzimler, kanser biyobelirteçleri olarak önem taşımaktadır. Spesifik glikosilasyon inhibitörleri, protein katlanması ve konformasyonu, oligomerizasyon, sınıflandırma, hücre-hücre etkileşimleri ve proteinlerin hücre içi veya hücre dışı bölgelere hedeflenmesi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde glikosilasyonun rolünü aydınlatmak amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu anlamda çalışmamızda N- bağlı glikozilasyon inhibitörü olduğu bilinen tunikamisin (TM)'in insan nöroblastoma hücre hattında (SHSY5Y) post tranlasyonel modifikasyonlar olarak bilinen glikozilasyon sürecini nasıl etkilediği ve SHSY5Y hücrelerinin mitojenik aktiviteleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

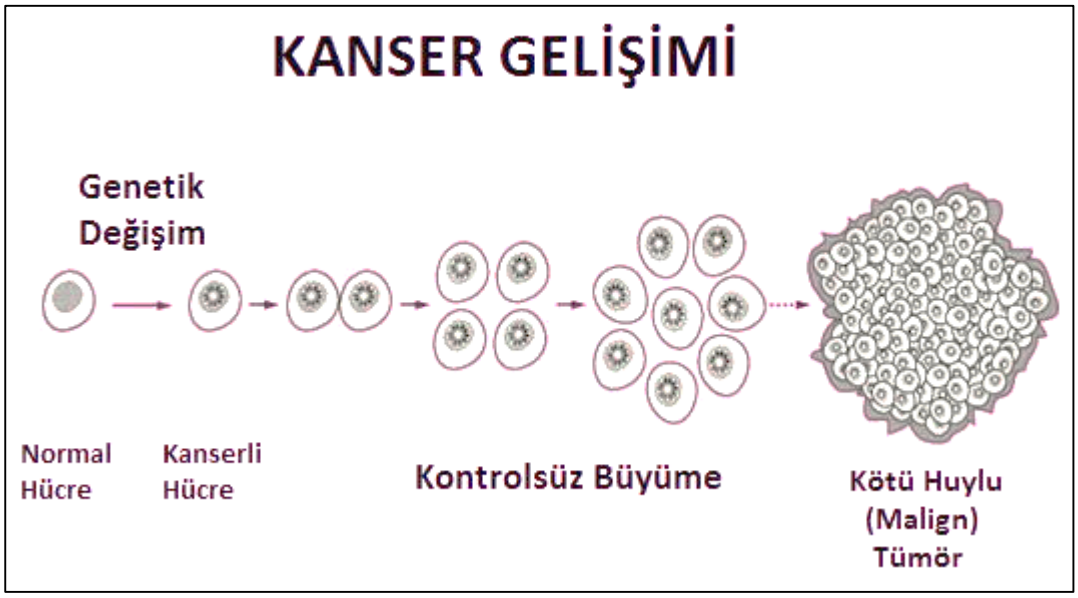
Hücre yüzeyi glikosilasyon profillerinin, inhibitör moleküller aracılığıyla değiştirilmesi ve bu moleküllerin etkin rollerinin birçok hastalıkta önem arz eden glikozilasyon mekanizmaları üzerindeki etkilerinin aydınlatılması büyük bir öneme sahiptir. Çocukluk döneminde görülen ekstrakraniyal solid bir tümör olan nöroblastoma farklı hücre yüzeyi glikozilasyon motifleri ile karakterizedir (10-13). Sağlıklı hücre yüzeyi ve kanser hücre yüzeyleri, birbirlerinden sahip oldukları karbohidratların çeşidi, oligosakkarit zincirlerinin uzunluğu ve dallanmaları açısından farklılıklar içermektedir. Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerden çok daha uzun ve dallanmış yüzey oligosakkaritlerine sahiptirler. Bu durum kanser hücrelerinin davranışını ve metastaz yeteneğini etkilemektedir. Glikozilasyonun düzenlenmesinde glikozilasyon reaksiyonlarında rol oynayan enzimlerin kontrol altına alınması oldukça önemlidir. Spesifik glikozilasyon inhibitörleri, protein katlanması ve konformasyonu, oligomerizasyon, sınıflandırma, hücre-hücre etkileşimleri ve proteinlerin hücre içi veya hücre dışı bölgelere hedeflenmesi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde glikozilasyonun rolünü aydınlatmak ve düzenlemek amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadırlar (14). Tez kapsamında N- bağlı glikozilasyon inhibitörü olan TM'in, insan SHSY5Y hücre hattında tranlasyon sonrası glikozilasyon süreçleri üzerindeki etkisinin, gen ekspresyonları düzeyinde değerlendirilmesi planlanmıştır. Bununla birlikte, glikozilasyon süreçlerinde meydana gelen değişikliklerin, SHSY5Y hücrelerinin mitojenik aktivitelerini üzerindeki etkisinin de değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

KANSER

Kanser, dünya genelinde oldukça önemli bir halk sağlığı sorunudur ve ikinci önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. 2020 yılında, kanserin tanı ve tedavisi, 2019 yılında ortaya çıkan koronavirüs hastalığı (COVID-19) pandemisinden olumsuz etkilenmiştir. Sağlık tesislerinin kapanması ve COVID-19'a maruz kalma korkusu nedeniyle teşhis ve tedavide gecikmelere neden olarak kanser insidansında kısa süreli bir düşüşe, ardından ileri evre hastalıkta bir artışa ve nihayetinde artan mortaliteye neden olmuştur. Bildirilen kanser insidansı ve ölüm oranı şu anda yalnızca sırasıyla 2020 ve 2021'e kadar mevcuttur.

Kanser, tedavi seçeneklerinin çoğalmasına rağmen hastalığa bağlı ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir. 20 yıl içinde kanser hastalarının sayısında önemli bir artış ön görülmektedir. Ülkemizde yıl bazında yaklaşık olarak 150.000 yeni kanser vakası tespit edilmektedir. Kanser, hücreler ve moleküller açısından kişiden kişiye değişir. Hücreler, kontrolsüz büyüme ve dokulara ve organlara metastaz açısından kanser son derece karmaşık bir hastalıktır. Genetik, çevresel ve kimyasal faktörlerin bir kombinasyonu kanserin gelişmesine neden olabilir (1) (Şekil 1).



Şekil 1. Kanser Gelişimi (2)

Karsinomlar, lösemiler ve sarkomlar, kanserlerin sıklıkla bölündüğü üç kategoridir. Malignitelerin %90'ı epitel hücrelerinden gelişen karsinomlardır. Bağ dokusundan kaynaklanan karsinomlarla karşılaştırıldığında, sarkomlar, daha az sıklıkla görülen katı tümörlerdir. Öte yandan, insanlardaki tüm malignitelerin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar, bağışıklık sisteminden veya kan hücrelerinden gelişirler (3). Tümörlerin gelişimi, genetik sorunlara neden olan kimyasallar ve hormonlar tarafından başlatılan kanserleşme sürecinin ilk adımıdır. Kanserler genetik hastalık olarak kabul edilmelerine rağmen sadece %10-15'i kalıtsaldır ve %85-90'ı DNA eşleştirmesindeki hatalar sonucu oluşmaktadır (4,5). Birçok somatik hücre mutasyonu, sonraki nesillere aktarımı ele almaz. Ancak bazı kalıtsal mutasyonlar, insanları kansere yakalanma olasılığını artırabilir (6). Bakteriler, virüsler, kimyasal ajanlar ve belki de en önemlisi beslenme uygulamaları, sigara ve alkol kullanımı gibi maddelerin kanser gelişiminde önemli rolleri vardır (4,5). Ayrıca hastalığı yaş faktörü dikkate alarak incelersek, kanserin ileri yaş gruplarında daha yaygın olduğu ve somatik hücrelerdeki mutasyonlarla bağlantılı olduğu varsayılabilir (7). Sağlıklı hücrelerden kanser hücrelerinin gelişmesiyle sonuçlanan bir hücresel dönüşüm olan karsinojenezin altı temel aşaması vardır. Bunlar, azalan sırayla, proliferasyonu teşvik eden sinyallerde kendi kendine yeterlilik, proliferasyonu engelleyen sinyallere duyarsızlık, apoptoza, invazyona ve metastaza karşı direnç, anjiyogenezin sürekliliği ve sınırsız proliferasyon kapasitesidir. Kanser hücrelerinde DNA onarımı yoktur. DNA hataları, onları onarma yeteneğini kaybetmiş hücrelerde tam olarak onarılamaz çünkü bu onarımdaki kusurlar hücre çoğalmasını doğrudan engellemez (6). Büyüyen ve gelişen mutant hücrenin anormal büyümesi ile başlayan kanserleşme süreci başlar.

Kanser hücreleri, genetik istikrarsızlıklarının bir sonucu olarak hücre büyümesi, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve çok sayıda gende mutasyonlar üretir (8).

Beyin Tümörleri ve Nöroblastoma

Birincil beyin tümörleri, beyin dokusunda başlayan tümörlerdir, ikincil beyin tümörleri ise başka bir yere metastaz yaptıktan sonra beyne yayılanlardır. Beyin tümörleri geliştikleri hücrelere göre sınıflandırılırlar. Nöroblastoma ve glioma iyi bilinen iki beyin kanseridir. Nöral hücreler, nöroblastomun kaynağıdır. Glial destek hücreleri, gliomaların kaynağını oluşturmaktadır. Gliomalar çeşitli biçimlerde gelişir. "Astrositom" en önemlisidir. Astrositler olarak bilinen küçük, yıldız şeklindeki hücreler, astrositomların kaynağıdır.

Beyin tümörlerinin nedenine ilişkin belirsizlikler devam etmektedir. 0–10 ve 40–70 yaş gruplarında daha sık görülür. İyi huylu beyin tümörleri beynin diğer bölümlerine yayılmazlar ve kanser hücreleri içermezler. Kötü huylu beyin tümörlerinde kanserli hücreler görülür. Ve birkaç beyin hücresi üzerinde etkileri vardır. Kötü huylu beyin tümörleri hızla yayılır, beynin sağlıklı bileşenlerinin yapısını değiştirir ve hızlı gelişir. Çocukluk çağı nöroblastomu adrenal bezlerden veya omurganın her iki tarafından köken alan solid malign bir tümördür (9,10).

Solid tümörler malign tümörlerin 2/3'ünü oluşturur. Nöroblastom çocukluk çağında en sık görülen tümörlerden biridir ve primer tümörlerin %80-85'ini oluşturur. Nöroblastomlar embriyonik hücrelerden köken aldığından küçük çocuklarda görülme olasılığı daha yüksektir. Nöroblastom insidansı erkeklerde daha fazladır (11). Çocuk maligniteleri için kemoterapi, immünoterapi ve radyasyon mevcut tedaviler olmasına rağmen, hasta sağkalım oranı nispeten düşüktür. Hastalığın seyri, tümörün yerini belirlemeye de yardımcı olan tüm biyokimyasal ve genetik değişikliklerden etkilenir. MYCN (miyelotazoz) onkogeni amplifiye edilir, 1p ve 11q silinir, nörotrofin reseptörleri eksprese edilir, telomeraz aktivitesi yukarı doğru düzenlenir ve bazı genler ile tümör baskılayıcılar aşağı doğru düzenlenme görülür. Nöroblastom tedavi yöntemlerinin istenen sonuçları vermedeki yetersizliği nedeniyle bu tümörlerin gelişimi hakkında daha derinlemesine araştırma yapılması gerekmiştir (12,13).

Nöroblastoma olarak bilinen kanserler, sempatik sinir sisteminin embriyonik sinir hücrelerinde veya nöroblastlarda başlar. Dolayısıyla bu sistemde herhangi bir yere yerleştirilebilir. Üst karın, alt karın, boyun, göğüs veya omurgaya yakın bölgelerdeki sempatik sinir ganglionları genellikle başladığı yerlerdir. Nöroblastoma çok agresif bir tümör olduğundan, belirli bir kökeni yoktur ve vücudun hemen hemen her bölgesine yayılabilir. Tümörlerin başladığı yer olan sempatik sinir sistemini anlamak, nöroblastomayı anlamak için çok önemlidir. Vücudun tüm kısımları sinirler, omurilik ve beyinden oluşan sinir sistemi

tarafından kaplanır (13). Sinir sistemi düşünce, duygu ve hareket için temel görevi görür. Kalp atışının, solunumun, kan basıncının, sindirim ve pek çok diğer vücut fonksiyonları otonom sinir sisteminin kontrolü altındadır. Otonom sinir sistemi, sempatik sinir sistemini de içerir. Sempatik sinir sistemi; böbreküstü bezlerinin medullasında bulunan ve sinirlere benzeyen sinir hücrelerinden ve omurilikten geçen sinir liflerinden oluşur. Nöronlar, sinir sistemini oluşturan birincil hücrelerdir. Vücudun kimyasal hormonların salınmasını sağlayan diğer hücre tipleri bu hücrelere bağlıdır. Bu semptomları üreten hormonlar nöroblastoma hücreleri tarafından salındığından bu oldukça önemlidir. Nöroblastoma dışındaki çevresel değişkenler, kanser türlerinin çoğunda önemli bir etkiye sahipken, nöroblastoma gibi çocuk maligniteleri için bir endişe kaynağı değildir. Nöroblastoma çevresel olmayan nedenlerle artar. Bunun nedeni, nöroblastomun embriyonal süreçteki gelişimidir (14).

Nöroblastomlar tipik olarak karaciğere, lenf düğümlerine, kemiklere ve kemik iliğine yayılır. Tüm pediatrik malignitelerin %8-10'unu oluşturur. Nöroblastomlar embriyonal hücrelerden geliştiği için, küçük çocukların bunları geliştirme olasılığı daha yüksektir. Nöroblastomda meydana gelen çok sayıda değişiklik, hastalığın seyri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. MYCN onkogeninin amplifikasyonu, "17q dengesiz fazlalık", telomeraz aktivitesi ve "1p veya 11q alel kaybı" bu modifikasyonlardan birkaçıdır (11-13).

Nöroblastom tedavisinin en önemli belirteçlerinden biri MYCN onkogenidir. 2. kromozomun kısa kolunun 2p24 bölgesinde yer alan bu onkogenin amplifiye olduğunu farklı moleküler yöntemler (FISH, kantitatif PCR, southern blot, immünohistokimya) ile gösterebilir. Günümüzde çoğu nöroblastomda, 17q bölgesinde alellik fazlalığı görülmektedir. Bu ekstra aleller (+17 q) veya t olarak kendini gösterir (1;17). Bu, hastalığın seyri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve kötü bir prognozun işaretidir. Tipik olarak tümör dokusunda görülen 1p delesyonu, MYCN onkogen amplifikasyonuna bağlıdır ve genellikle ilerlemiş nöroblastomlarda gözlenir. 1p bölgesindeki tümör baskılayıcı genin ifadesi, 1p36 alanındaki herhangi bir kayıpla azalır. 11q delesyonu olan birkaç nöroblastom örneği vardır. Bir 11q silme varsa, 1p silmenin aksine MYCN amplifikasyonundan söz edilmez. Bazı durumlarda (ileri evre, kötü prognoz) hastalığın seyrini önemli ölçüde etkileyebilir. Sempatik sinir sistemi nöroblastlarının nöroblastoma hücrelerine dönüştüğü kesin mekanizma bilinmemektedir. Nöroblastları uyaran nörotrofin reseptör yolunun olumsuz yönleri, nöroblastlardan nöroblastom gelişimine katkıda bulunur (13).

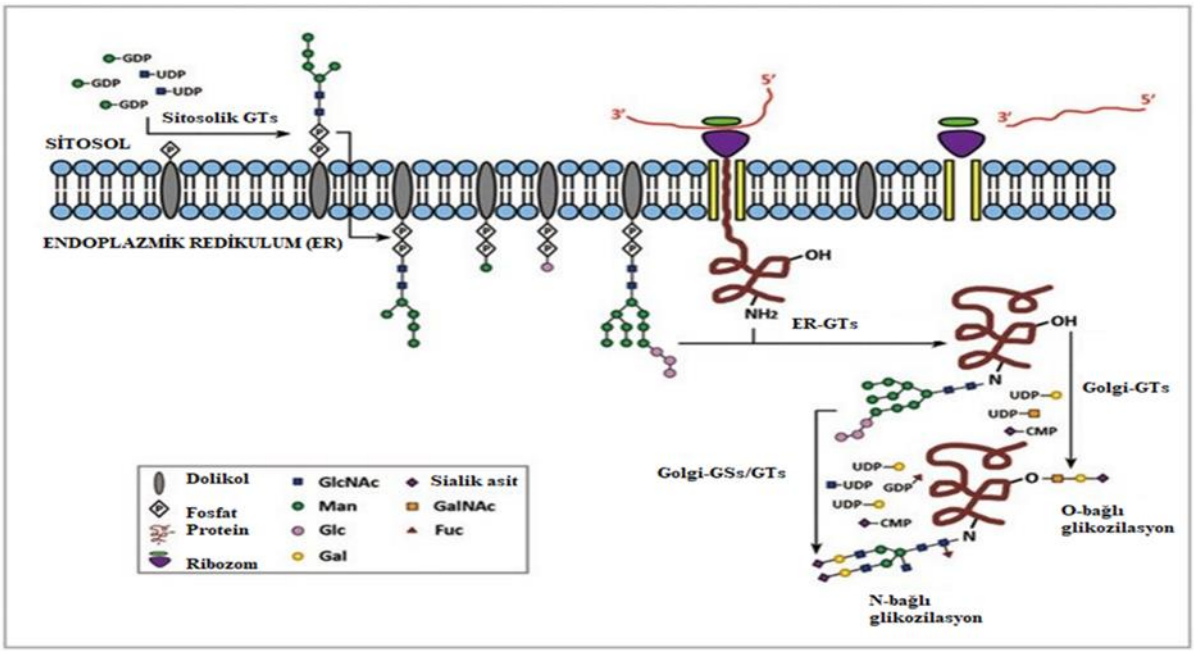
GLİKOBİYOLOJİ

Glikobiyoloji, doğada yaygın olarak bulunan glikanların yapısını, biyosentezini ve biyolojisini inceleyen bir bilim dalıdır. Çoğu glikan, hücresel ve salgılanan makromoleküllerin en dış yüzeylerinde bulunur ve oldukça çeşitli yapıya sahiptir. Basit ve oldukça dinamik proteine bağlı glikanlar, düzenleyici etkiler gösterdikleri hücrelerin çekirdeğinde ve sitoplazmasında da bol miktarda bulunmaktadırlar. Glikokonjugatların şeker bileşenleri, önemli yapısal özellikler oluşturmanın yanı sıra, fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda çok çeşitli işlevleri modüle etmekte veya aracılık etmektedir (14). Glikoproteinler ve polisakkaritler ayrıca bakteri hücrelerinde önemli işlevlere sahiptir ve glikoproteinler çoğu virüsün biyolojisinde merkezi rollere sahiptir. Glikokonjugatlar, şekerlerin proteinlere ve lipidlere eklenmesiyle oluşturulur; memeli glikokonjugatlarında yaygın olarak bulunan monosakkaritlerden bazıları, Tablo 1'de sunulmuştur (15).

Tablo 1. Memelilerde bulunan monosakkaritlerden bazıları ve fonksiyonları

Gen	Protein	Etkilenen yol	Fenotipik sonuç
ALG1	β1,4- mannosiltransferaz	*N* -glikan biyosentezi; *ALG1*, *N* -glikosilasyon için lipide bağlı öncü oligosakaritin biyosentezindeki ilk mannosilasyon adımını katalize eder.	Zihinsel yetersizlik, hipotoni, nöbetler, mikrosefali, enfeksiyonlar ve erken ölüm
B4GALT1	β1,4-galaktosiltransferaz 1	İki alternatif transkript: biri glikokonjugat biyosentezinde yer alan *trans -Golgi'de yerleşik bir proteini kodlarken, ikinci transkript çözünür laktoz sentaz oluşturan bir proteini kodlar*	Entelektüel yetersizlik, gelişimsel gecikme, hipotoni, makrosefali, pıhtılaşma bozukluğu ve miyopati
MPI	*Mannoz*-6-fosfat izomeraz	Fruktoz-6-fosfat ve mannoz-6-fosfatın dönüşümü; çoklu glikosilasyon yollarında yer alır	Hepatik fibroz, koagülopati, hipoglisemi, protein kaybettiren enteropati ve kusma; nörolojik semptom yok
NGLY1	PNGaz	α-distroglikanı değiştiren çeşitli enzim kusurları	Kas, beyin ve göz gelişimindeki kusurlar ve yüksek serum kreatin kinaz

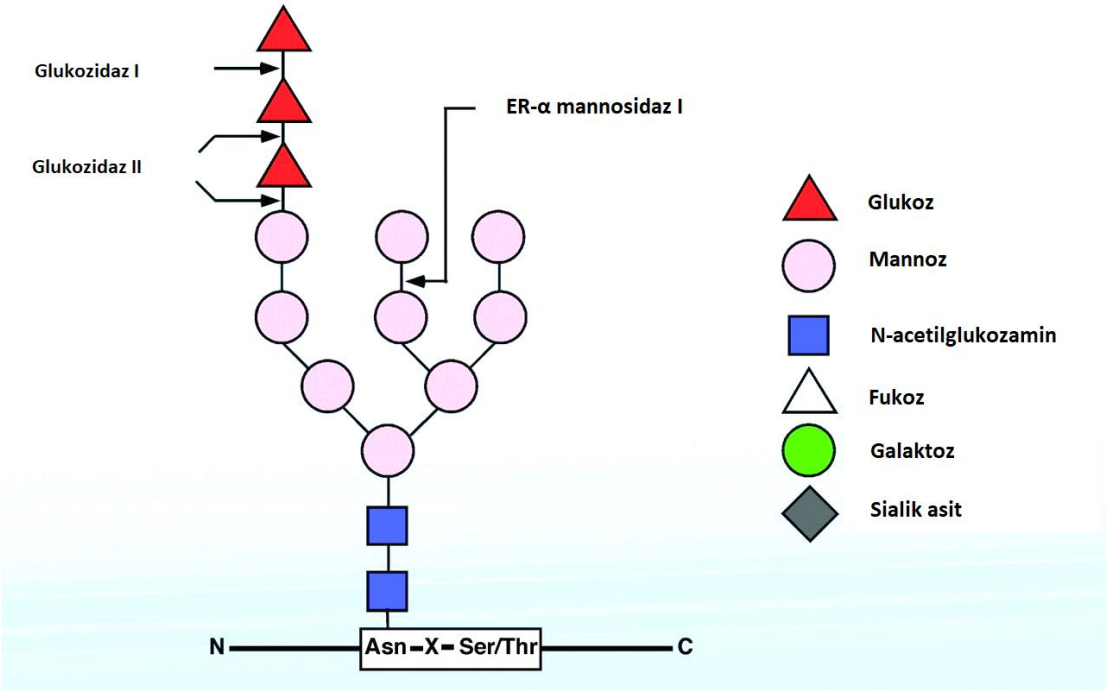
Doğal olarak oluşan çok sayıda şeker, işlevlerini modüle eden lipid ve protein molekülleri üzerinde çeşitli benzersiz glikan yapıları oluşturmak için birleştirilmektedir. Çoklu enzimatik alan tercihlerinin yanı sıra stereokimyasal α veya β konjugasyonlarının kullanımı, bu şekerlerin nerede ve nasıl birbirine bağlandığı konusunda daha fazla çeşitlilik yaratır. Bu özelliklerin tümü, ~1012 farklı dallı glikan yapısının potansiyel varlığını göstermektedir (16). Protein glikosilasyon, N- bağlı glikanların eklenmesini içermektedir. *O*- bağlı glikanlar, fosforile glikanlar, glikozaminoglikanlar ve glikosilfosfatidilinositol (GPI), peptit omurgalarına ve ayrıca triptofan kalıntılarının C-mannosilasyonuna bağlanmaktadırlar. Glikolipidler, lipitlere şekerlerin eklenmesiyle oluşmaktadır (17,18) (Şekil 3). Proteinlerin ve lipidlerin glikosilasyonu, endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi aparatında ve terminal işlemenin çoğu cis-, medial- ve trans-Golgi bölmeleri meydana gelmektedir. Bu organellerde, glikosiltransferazlar ve glikosidazlar, substrat mevcudiyeti, enzim aktivitesi, gen transkripsiyon seviyeleri ve organeller içindeki enzim konumu tarafından kontrol edilen bir dizi adımda farklı karbohidrat yapıları oluşturmaktadır (Şekil 2). Belirli bir hücrenin glikomu, glikokonjugasyondan sorumlu enzimlerin seviyelerini kontrol eden gen ekspresyon modelini yansıtmaktadır. Genom, ekzom veya proteomdan farklı olarak, glikom şablonsuz bir şekilde üretilmekte ve ER ve Golgi aparatında çoklu seviyelerde karmaşık bir şekilde kontrol edilmektedir.



Şekil 2. ER ve Golgi ağında karbohidrat işlenme süreci (19).

N- Bağlı Glikolizasyon

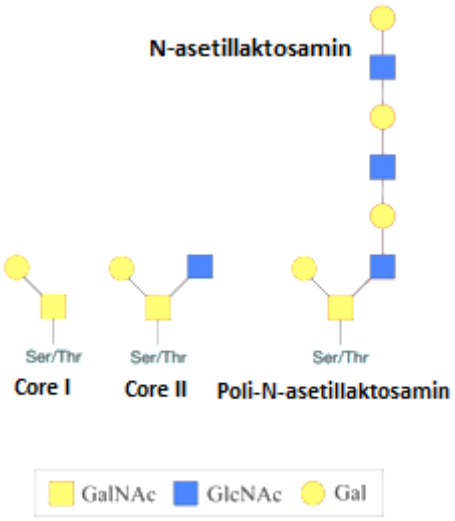
Pek çok protein, *N*-asetilglikozaminin (GlcNAc) bir asparjin (Asn) yan zincirinin nitrojen atomuna bir β-1N bağıyla bağlanması anlamına gelen *N*-glikosilasyon ile modifiye edilmektedir. Bu Asn-bağlı glikokonjugatlar, değişken sayıda diğer monosakkaritlerin eklenebildiği veya çıkarılabileceği bir GlcNAc2 mannoz (Man) çekirdeği içermektedirler (20). *N*-glikanlar çoğu canlı organizmada bulunmakta ve birçok hücre içi ve hücre dışı işlevin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptirler. *N*-glikosilasyon (Şekil 5), GlcNAc ve Man'in ER'nin sitoplazmik tarafında dolikol fosfata (Dol-P) bağlı dallı bir karbohidrat yapısı oluşturduğu bir lipid öncüsünün oluşumuna bağlıdır. Bu lipit öncüsü daha sonra ER lümenine bakacak şekilde döndürülür. Dol-P-karbohidrat yapısının tamamlanmasının ardından, bir oligosakkariltransferaz, karbohidrat zincirini bir Asn-X-Ser/Thr bölgesindeki bir proteine eklemektedir. Yeni ortaya çıkan karbohidrat-protein konjugatı, genellikle bir kalite kontrol sürecinin parçası olarak glikoz kalıntılarının çıkarılmasını içeren ER'de daha fazla işleme tabi tutulmaktadır. Yapı daha sonra, olgunlaşma için medial Golgi'ye aktarılmadan önce karbohidrat yapılarının bir dizi spesifik mannosidaz tarafından kırpıldığı Golgi aparatına (yani cis -Golgi) hareket etmektedir. Hibrit ve karmaşık *N*- 'nin medial ve trans- Golgi bölmelerinde bulunmaktadır. Glikanlar, GlcNAc, galaktoz, sialik asit ve fukoz şekerlerinin eklenmesiyle üretilmektedirler (21).



Şekil 3. N-Bağlı Glikolizasyon (22)

O- Bağlı Glikosilasyon

Glikosilasyon, çoğunlukla Ser ve Thr olan fonksiyonel hidroksil gruplarına sahip amino asitlerde meydana gelmektedir. İnsanlarda, Ser veya Thr'ye bağlı en yaygın şekerler GlcNAc ve *N*-asetilgalaktozamindir (GalNAc) (23) (Şekil 4). Genellikle müsin tipi *O*- glikanlar olarak adlandırılan GalNAc bağlantılı glikanlar, epitel hücreleri ile vücudun dış mukozal yüzeyleri arasında çok önemli bir arayüz oluşturan müsinler dahil olmak üzere birçok hücre dışı ve salgılanan glikoprotein üzerinde bol miktarda bulunmaktadır (23,24). Müsinler, *O*-glikosilasyon için pek çok bölge oluşturan yüksek Pro, Ser ve Thr içeriğine sahip değişken sayıda ardışık tekrarlarla karakterize edilmektedir. Ayrıca, bu bölgeler genellikle hem glikoproteinleri hem de hücresel yüzeyleri dış stresten, mikrobiyal enfeksiyondan ve bağışıklık sistemi tarafından kendini tanımadan koruduğu düşünülen jel benzeri bir madde oluşturan *O*-glikan çekirdekleri tarafından genişletilmiştir. Bu *O*- glikan sınıfı, altı ana temel çekirdek yapı (çekirdek 1-4, terminal GalNAc (Tn) ve sialil-Tn antijenleri) içermektedir. Müsin tipi *O*- glikan sentezi, polipeptit GalNAc transferazlar (GALNT) tarafından başlatılmaktadır (22). GALNT'ler, amino asit motifleri için özgüllüklerinde farklılık göstermektedirler. İlk GalNAc'ye sıralı glikan ilavesi, müsinler ve insan immünoglobulin A1 (IgA1) dahil olmak üzere belirli glikoproteinler üzerinde genellikle yüksek oranda kümelenmiş olan çeşitli karbohidrat yapılarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu şekerler, protein cis- , medial - ve trans-Golgi bölmelerinden geçerken eklenmektedir. Glikopeptid *O*-glikan zincirleri, mevcut yapıyı galaktoz, GlcNAc, sialik asit ve bazı durumlarda fukoz ile genişletebilen farklı glikosiltransferazlar tarafından modifiye edilmektedir (22). Ser veya Thr'ye bağlı GlcNAc tipik olarak nükleer, mitokondriyal ve sitoplazmik bölmelerde bulunan hücre içi glikoproteinlerde bulunmaktadır. GalNAc bağlantılı müsin tipi *O*- glikanların aksine, GlcNAc ilavesi tipik olarak Golgi aparatında meydana gelmemektedir; bu sentez, *O*- bağlı GlcNAc (*O*-GlcNAc) transferazlar (OGT) aracılığıyla düzenlenmektedir (25). Hücre altı bölmeye bağlı olarak bu enzimlerin farklı formları mevcut olsada hepsi aynı hızlı GlcNAc ekleme ve protein substratlarından çıkarma döngüsünü gerçekleştirmektedir. Bu dinamik süreç, glikosilasyon motifine özgü görünmektedir ve hücresel metabolizma da dahil olmak üzere birçok hücresel işlevi düzenlediği düşünülmektedir. Ayrıca, O-GlcNAc modifikasyonu, Ser ve Thr kalıntılarında protein fosforilasyonu ile rekabet ederek katkıda bulunmaktadır (26,27). *O*-'nun bu işlevsel rolü glikosilasyonu, ilgili enzimlerin ekspresyon seviyeleri ve ayrıca substrat konsantrasyonları ile kontrol edilmektedir (28-30).



Şekil 4. O- Bağlı Glikolizasyon (31)

Glikosfingolipidler (GSL)

GSL'ler, bir seramidin C1 hidroksil pozisyonunda bir glikanın eklendiği bir sfingolipid içermektedir; bunlar insanlarda en çok bulunan glikolipidlerden biridir ve tipik olarak hücresel zarların lipid çift katmanlarında bulunmaktadırlar (26). GSL glikozilasyonu, ER veya Golgi aparatının sitoplazmik tarafındaki lipit kısmına glikoz veya galaktoz eklenmesiyle başlamakta, ancak yapı daha sonra daha fazla işlenmek üzere lümen tarafına çevrilmektedir. GSL glikozilasyonunu başlatan enzimler, lipitlere özgüdür, ancak karbohidrat zincirinin daha fazla işlenmesi, daha genel glikosiltransferazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Farklı GSL türlerinin dağılımı, çoklu glikosiltransferazlar arasındaki fonksiyonel rekabet tarafından kontrol edilmektedir (26). GSL'ler, lipit sallarının oluşumu ile ilişkili kritik hücresel işlevleri yerine getirmekte ve bunların glikan bileşimi, spesifik GSL özelliklerini vermektedir (26).

Proteoglikanlar ve Glikozaminoglikanlar

Proteoglikanlar, kanonik *A*-glikanları ve *O*-glikanları içermenin yanı sıra, *O*- bağlı glikosilasyon motifleri yoluyla eklenmiş uzun şeker tekrarlarının varlığıyla karakterize edilen hücre dışı matristeki glikoproteinlerdir (32). Bu uzatılmış şeker zincirleri, glikozaminoglikanlar olarak adlandırılır ve proteoglikanın moleküler kütlesinin önemli bir kısmına katkıda bulunmaktadır. *A*-glikanlar tipik olarak 5-12 monosakkarit içerirken, bir glikozaminoglikan motifi kolaylıkla 80'den fazla şeker içerebilmektedir (örneğin, keratan sülfat, 50'ye kadar disakarit birimi içeren bir poli- N-asetillaktozamin zinciridir) (31). Bu uzun zincirler, bir üronik asit (yani, glukuronik veya iduronik asit) veya galaktoz ile birleştirilen GlcNAc veya GalNAc tarafından oluşturulan disakkarit tekrarları yoluyla oluşturulmaktadır. Glikozaminoglikanlar

işlevsel olarak çeşitlidir ve heparan sülfat, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyalüronan içermektedirler (33). Glikozaminoglikanlar, aynı zamanda büyüme faktörleri için bir rezervuar işlevi gören hücre zarının bakımı için temel bir yapı olan glikokaliksin oluşumu için oldukça önemlidir (32).

KANSERDE GLİKOZİLASYON

Tümör büyümesi, kanser hücrelerinin hücresel bölünme ve kontrol noktalarını atlama, ölüm sinyallerinden ve bağışıklık gözetiminden kaçma ve metastatik bölgelere göç etme yeteneğine bağlıdır; glikosilasyon bu süreçlerin hepsinde önemli bir role sahiptir. Örneğin, anormal büyüme faktörü sinyali, ilgili ligandlar, reseptörler ve moleküler yapı üzerindeki spesifik glikosilasyon motifleri tarafından kontrol edilebilen kanser gelişiminin kritik bir bileşenidir (34). Glikosilasyon paternleri, kanserin ilk biyobelirteçlerinden biri olmasının yanı sıra hem kanserde hem de sağlıklı dokuda kök hücre benzeri fenotiplere sahip hücreleri tanımlamak için kullanılmaya devam etmektedir (35-39). Kanser hücrelerinde sıklıkla gözlemlenen glikosilasyon değişiklikleri, sialil Lewis yapılarında bir artışı, anormal çekirdek fukosilasyonunu, artan *N*- glikan dallanmasını veya müsin tipi *O*- glikan, Tn antijeninin açığa çıkmasını içermektedir (37,38). Kanser hücreleri, hastalığın birçok aşamasında geliştikçe, glikan bileşimi de, hücresel metabolizmadaki değişikliklere paralel olarak değişebilmektedir. Bu durum, *O*-glikanlarda Tn antijenini üreten kesik glikosilasyona atıfta bulunan eksik sentezi ve siyalil Lewis X gibi anormal glikosilasyon modellerini üreten neo-sentezi içermektedir. Normalde kandan lenfosit ekstravazasyonu için ayrılan bu gliko-neoantijenler, yaygın olarak kanser hücrelerinde bulunmakta ve metastatik yayılmayı kolaylaştırmaktadır (39,40). Kanserde değiştirilmiş glikosilasyonun fonksiyonel etkilerine ilişkin çalışmaların sayısı son on yılda artış göstermektedir. Ancak glikosilasyonda kanserle ilişkili değişikliklere yol açan süreçlerin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar hala eksiktir. Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinden gelen proteinler, polipeptit GALNT3 ve Gal 3(4)-L-fukosiltransferaz (FUT3) gibi glikosiltransferaz enzimlerinin değiştirilmiş ekspresyonu yoluyla birçok kanser türünde modifiye edilen hem *O*-glikosilasyon hem de *N*-glikosilasyon bölgelerine sahiptir. Reseptör tirozin-protein kinaz erbB2 (HER2 olarak da bilinir), prostat, meme ve mide kanserleri dahil olmak üzere bir dizi kanserde aşırı eksprese edilmekte ve fonksiyonel özellikleri, glikosilasyon dahil olmak üzere bir dizi karmaşık translasyon sonrası modifikasyon yoluyla modüle edilmektedir (41,42). GALNT3'ün kaybı, HER2'de T ve Tn antijenleri gibi pro-büyüme ve pro-metastatik karbohidrat antijenlerinin HER2 üretiminin artmasına yol açabilirken, FUT3'ün

baskılanması, Lewis Y (LeY) antijen üretimini önleyerek anti-metastatik ve büyümeyi baskılayıcı bir etkiye sahip olabilmektedir (43,44). Ek olarak, artan müsin tipi *O*-glikosilasyon galektin-4 bağlanmasını arttırdığından, HER2 aktivasyonuna yol açan glikoprotein GalNAc 3β-galaktosiltransferaz 1 (C1GalT1) aktivitesi aracılığıyla HER2 de düzenlenebilmektedir (42,45). GALNT3 gibi bazı glikosiltransferaz genlerindeki anormal promotör bölge metilasyonu da anormal enzim ekspresyonuna yol açabilmektedir (46).

Kanser alanında, hedeflerine göre spesifik glikosiltransferazların ekspresyonunda ve aktivitesinde değişikliklere neden olan hücre içi mekanizmaları değerlendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bir istisna, kısmen birçok adenokarsinomda artan ekspresyonu ve değişen glikan bileşimi ve kısmen de kanser aşısı antijeni olarak kullanılması nedeniyle kanser alanında en çok çalışılan glikokonjugatlardan biri olan müsin 1'dir (MUC1) (47-49). MUC1, ~20 amino asit kalıntısından oluşan çoklu tekrarlarının her birinde beş potansiyel *O*-glikosilasyon bölgesi olan büyük bir hücre dışı alan (yani müsin alanı) içermektedir. Glikosiltransferaz enzim çalışmaları, C1GalT1, β-galaktozid a-2,3-siyaliltransferaz 1 (ST3GalI) ve a-GalNAc a-2,6-siyaliltransferaz 1 (ST6GalNAcI) dahil olmak üzere MUC1'in *O*-glikosilasyonunun değiştirilmesinde birkaç enzimin düzensizliğini göstermiştir; ER'de GALNT'lerin değiştirilmiş lokalizasyonunun da MUC1 glikozilasyonunu değiştirmede rolü bulunmaktadır (50-54). GALNT'ler tipik olarak Golgi aparatında *O*-glikosilasyonu başlatır, ancak hücre kültürü modellerinde bu enzimler, MUC1 tekrarlarının *O*-glikosilasyon yoğunluğunun artmasına yol açan, anormal Src sinyallemesini içeren bir süreç aracılığıyla ER'ye yer değiştirilmektedir; Kanser hücreleri tarafından üretilen MUC1 ayrıca artmış sialil-Tn antijeni sunmaktadır (52-56). Ek olarak, MUC1 üzerindeki değiştirilmiş glikosilasyon motifleri, tipik olarak, sialillenmiş MUC1'e bağlandıktan sonra makrofaj aktivasyonunu artıran ve tümör büyümesini destekleyen CD169 gibi hücre yüzeyi lektinlerini birlikte seçerek kanser immüniteyi etkileyebilmektedir (57-59).

Serum ve/veya tümör dokularındaki spesifik proteinlerin glikozilasyonu, tanısal bir biyobelirteç olarak ve hastanın prognozunu ve tedaviye yanıtlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır; bu tür glikoproteinlerin örnekleri arasında CEA, MUC1, MUC16 ve prostata özgü antijen (PSA) yer almaktadır (60-64). Karbohidrat antijeni 19-9 (CA19-9), ilk olarak gastrointestinal kanserde tanımlanan bir monosialoganglioside üzerindeki sialil Lewis A (sLea) karbohidrat motifini (yani, Neu5Acα2,3Galβ1,3(Fucα1,4) GlcNAcβ1-R) tanıyan spesifik bir fare monoklonal antikoru ile tespit edilmiştir (66,67). CA19-9, her zaman olmamakla birlikte, pankreas, mide ve kolorektal kanserler dahil olmak üzere çeşitli kanserlere sahip hastaların

serumunda sıklıkla yükselmektedir. Kanserde serum düzeylerinde bu artışa yol açan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır, ancak Gal-β-1,3-GalNAc-α-2,3-siyaliltransferaz 2 ve 4 (ST3GalII) gibi düzensiz sialiltransferazlarla ilişkili görünmektedir (68). Birden çok kanserde CA19-9'un varlığı, kanser patobiyolojisinin temel bir özelliği olarak anormal glikozilasyonu vurgulamaktadır (60,64).

Diğer bir önemli glikosilasyon paterni, pankreatik ve kolon kanserlerinde yaygın olarak yükselen ve pro-tümör etkilere sahip olan, *A*-glikanlardaki α-2,6-bağlı sialik asittir; bu sialik asit glikan omurgasına β-Gal α-2,6-siyaliltransferaz 1 (ST6GalI) tarafından eklenmekte ve yine bu kanserlerde yukarı regüle edilmektedir (69-71). ST6GalI'nin artan ekspresyonu, hayatta kalma ile ilişkilidir ve sialile edilmiş ürünleri, tümör hücresi apoptozunu inhibe etmesinin yanı sıra büyüme faktörü yollarını aktive edebilmektedir (72-76).

Kanser Sinyali, Tümör İlerlemesi ve Metastazda Glikosilasyon

Reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve bunların sinyalleşme basamakları, kanserin ilerlemesinde kritik rol oynamaktadırlar. Ayrıca büyüme, göç, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreci yönlendirirler. Çoğu RTK, reseptör dimerizasyonunu ve/veya oligomerizasyonunu indükleyerek, reseptöre özgü ligand bağlanmasıyla kanonik olarak aktive edilir. Bununla birlikte, son çalışmalar, glikosilasyondaki değişikliklerin, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) için gösterildiği gibi, anormal aktivasyon ve sinyallemeye neden olarak, hücre dışı alanlarının konformasyonel düzenlemelerini etkileyebileceğini göstermiştir (77,78). Terminal sialilasyon, fukosilasyon veya oligosakarit dallanması gibi glikosilasyondaki değişikliklerin, etkileşimi ve ardından RTK'lerin aktivasyon kapasitesini etkilediği açıklanmıştır (77,79). Örneğin, artan sialilasyon ve dış kol fukosilasyon, akciğer kanseri hücrelerinde EGFR dimerizasyonunu ve reseptör aktivasyonunu engellerken, artan çekirdek fukosilasyon bu süreci teşvik eder (79). Ayrıca, gastrik karsinom hücrelerinde artan α-2,3-sialilasyon, RTK'ler mezenkimal-epitelyal geçiş faktörü (MET) ve Recepteur d'origine nantais'in (RON) hiperaktivasyonuna yol açarak daha invaziv bir fenotiple sonuçlanır (80,81).

RTK'lerde gözlenen bu değiştirilmiş glikosilasyon değişikliklerinin, galektin tanınmasına izin verdiği ve reseptör aktivasyonunu kolaylaştırarak kanser hücresi yüzeyinde reseptör tutulmasını teşvik ettiği bilinmektedir (82,83).

Protein *O*-glikosilasyon ayrıca RTK'lerin aktivasyonunu modüle etme yeteneğine sahiptir. Bu, musindeki ilk adımı katalize edebildiği bilinen 20 enzimden biri olan N-

asetilgalaktozaminiltransferaz III (MGAT3) ekspresyonunun yıkılmasıyla pankreas kanseri hücrelerinde artan EGFR ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) *O*-glikolizasyon fosforilasyonu ile gösterilmiştir. (84). Ayrıca, MGAT3 yıkımının ayrıca tümörle ilişkili antijenler sialil Tn (STn) ve sialil Lewis X'te bir artışa yol açarak tümör hücrelerine artan agresiflik ve metastatik potansiyel kazandırdığı açıklanmıştır (83). RTK'lerin aktivasyonunu modüle eden ek mekanizmalar, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar, sialile edilmiş glikosfingolipidler ve diğer glikosile edilmiş transmembran proteinleri ile etkileşim yoluyla tarif edilmiştir (85,86). Heparan sülfat içeren proteoglikanlar, RTK'lerin aktivasyonunu modüle eden glikokonjugatların açıklayıcı örnekleridir. Hepatosit büyüme faktörü veya vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri, ligand aracılı reseptör aktivasyonunu ve akış aşağı sinyal iletimini kolaylaştıran heparan sülfat zincirleri ile kanser hücresi yüzeyine bağlanır (86). Ayrıca, α-5 integrinin *N*-glikan dallanma derecesinin, EGFR sinyalini pozitif olarak düzenlediği ve hücre proliferasyonunu etkilediği gösterilmiştir, bu da glikosilasyonun anahtar kanser hücresi moleküllerindeki rolünü vurgulamaktadır (87).

Hem *N*- hem de *O*-glikosilasyon, integrinlerin kanser hücresi glikokaliksinde bulunan hücre dışı matris proteinleri ve glikanlar ile etkileşimini doğrudan etkiler, hücre yapışması ve kanser göçü ve istilasının teşviki dahil olmak üzere biyolojik fonksiyonlarını düzenler (88,89). Bir örnek olarak, gastrik karsinom hücrelerinde, α-3β1 integrin üzerindeki N-glikanların, β1,6-N-asetilglukosaminiltransferaz V'nin (MGAT5 geni tarafından kodlanan ve N'den sorumlu) etkisiyle laminin-5 üzerindeki hücre göçünü desteklediği veya baskıladığı gösterilmiştir. -dallanma) veya MGAT3, sırasıyla (90). β1 integrin alt biriminin β1,6-*N*-asetilglukosamin-dallı *N*-glikan yapılarında anormal ekspresyon ayrıca integrin kümelenmesini ve sinyal transdüksiyon yollarını modüle ederek tümör büyümesini, hücreyi teşvik eder. RTK'ler, gangliyositler ve glikozaminoglikan ekspresyonu ile aktive edilerek kanser hücresi göçü, istilası ve proliferasyonunda artışa yol açmaktadırlar. N-glikanların E-kadherin üzerinde artan dallanması, hücre hücresi yapışmasını ve aşağı akış sinyalini bozmaktadır. Ayrıca bu durum metastaza da katkıda bulunur. Hücre dışı matris, dinamik ve karmaşık bir glikoproteinler, kollajenler, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar dizisinden oluşur. Glikosilasyonun hücre-matriks etkileşimlerini modüle ettiği ve hücre büyümesini ve hayatta kalmasını, göçünü ve hücre istilasını teşvik etmek için integrin bağımlı sinyali kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Hücre dışı matrisin yeniden modellenmesi, kolon karsinoma hücrelerinde β1integrin adezyon reseptörlerinin α-2,6-sialilasyonu gibi terminal sialilasyon eylemi yoluyla da gerçekleşebilir (91). Spesifik proteinlerin terminal sialilasyonu, kanserin ilerlemesinde kilit bir oyuncu olarak

tanımlanmıştır. *N*-Glikan sialilasyonunun, kanser hücrelerinin habis fenotipleri üzerinde büyük etkisi olan integrin α-3β1 içeren protein kompleksleri tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (82). Ek olarak, *N*-glikanların terminal α-2,6-sialilasyonundan sorumlu olan β -galaktozid α-2,6-siyaliltransferaz 1'in (ST6GAL1), hipoksiyaya karşı tümör hücresi direnci kazandırarak hipoksi ile indüklenebilir ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir ve bu nedenle tümör hücresinin hipoksik bir ortama adaptasyonunu kolaylaştırır (93).

Ayrıca glikosilasyon, kanser hücrelerinin epitelyal ve mezenkimal fenotipler arasındaki geçişini çoklu mekanizmalar yoluyla etkiler. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinin, örneğin α1,4-galaktosiltransferaz aracılı glikosfingolipidlerin ekspresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (94). EMT, hücre morfolojisindeki değişiklikler ve epitelyal hücre-hücre adezyon moleküllerinin ekspresyon veya fonksiyon kaybı ile karakterize edilir. *N*-Glikanların, hali hazırda EMT'ye bağlanan murin meme tümör hücrelerinin kullanıldığı deneylerde gösterildiği gibi, kanser hücrelerinde EMT'yi etkilediği gösterilmiştir. Bu modelde, MGAT5 devre dışı bırakılmış hücreler, EMT fenotipini hariç tutarak epitelyal morfolojilerini korurlar (95). Ana epitelyal hücre adezyon molekülü olan transmembran glikoprotein E-kadherin ayrıca α-2,6-siyalillenmiş terminal yapılarla sonlanan β1,6-N-asetilglukosamin-dallı *N*-glikanların varlığından da etkilenir. Dallanmış *N*-glikanların kritik bir role sahip olduğu tanımlanmaktadır.

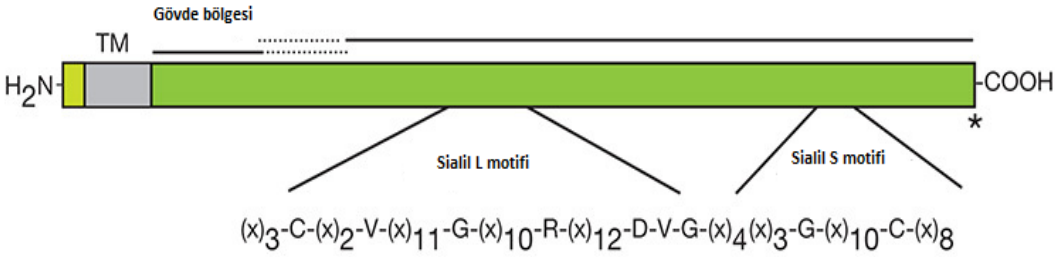
E-kadherinin bir kanser bağlamında kuralsızlaştırılması, tümör hücresi yapışmasının ve akış aşağı sinyal yolaklarının bozulmasıyla hücresel hatalı kalizasyonu ve işlev bozukluğunu teşvik ederek, tümör ilerlemesini, hücre istilasını ve metastazı indükler (89). Buna karşılık, ikiye bölünmüş *N*-glikan yapılarıyla modifiye edilmiş ve yapışık bağlantıların stabilitesi ve tümör baskılanması ile ilişkili olan E-kadherin, bu mekanizmaya karşı koyar (89). Yüksek hücre içi *O*-GlcNAsilation, E-kadherinin baskılanmasına yol açan, transkripsiyon faktörü SNAIL1'in düzenlenmesi yoluyla EMT'de de yer almıştır. Hücre içi O-GlcNAsilasyonu, sitoplazmik ve nükleer proteinlerde meydana gelir ve genellikle O-GlcNAsilasyonu ve fosforilasyon arasındaki karışma yoluyla hücresel sinyallemeyi ve transkripsiyonu düzenleyen bir besin sensörü olarak işlev görür.

Selektinler, lenfositler, trombositler ve endotel hücreleri tarafından eksprese edilen bir hücre adezyon molekülleri ailesidir (96). Selektinler, siyalofukosile kısımlara bağlanır ve lökositlerin yuvalanması ve doku alımı için önemlidir. Enflamatuar koşullar altında, E ve P-selektinler endotel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir, bu daha sonra yavaşlar ve hücre yüzeyinde selektin ligandı SLex'i eksprese eden dolaşımdaki bağışıklık hücrelerini toplar (96).

Bu işlem, endotel yoluyla dokuya ekstravazasyonu sağlar. Benzer şekilde, SLex ve SLea gibi siyalofukosile edilmiş antijenlerin ekspresyonunun, endotelyal hücrelerde dolaşan tümör hücrelerinin tutuklanmasını kolaylaştırdığı ve artan metastatik potansiyel ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (97).

GLİKOZİLTRANSFERAZLAR

Memeli genomundaki genlerin yaklaşık %1'i, glikanların üretimi veya modifikasyonunda yer almaktadır. Tüm canlılarda neredeyse 200.000 glikosiltransferaz sekansı bilinmektedir ve birincil sekans tarafından tanımlandığı şekliyle yaklaşık 97 glikosiltransferaz ailesini içermektedirler. Bir ailenin üyeleri ile diğeri arasında önemli bir dizi benzerliğinin bulunmaması bu sınıflandırmanın temelini oluştursa da birden fazla ailenin üyelerinde ortak olan kısa dizi motifleri tespit edilmiştir. Bu sekans elemanları, tipik olarak, belirli bir donör substrat özgüllüğü ile glikosiltransferazlar arasında bulunur; ökaryotik sialiltransferazlarda ortak olan sialil motifleri bu duruma iyi bir örnektir (Şekil 5) (98,99).

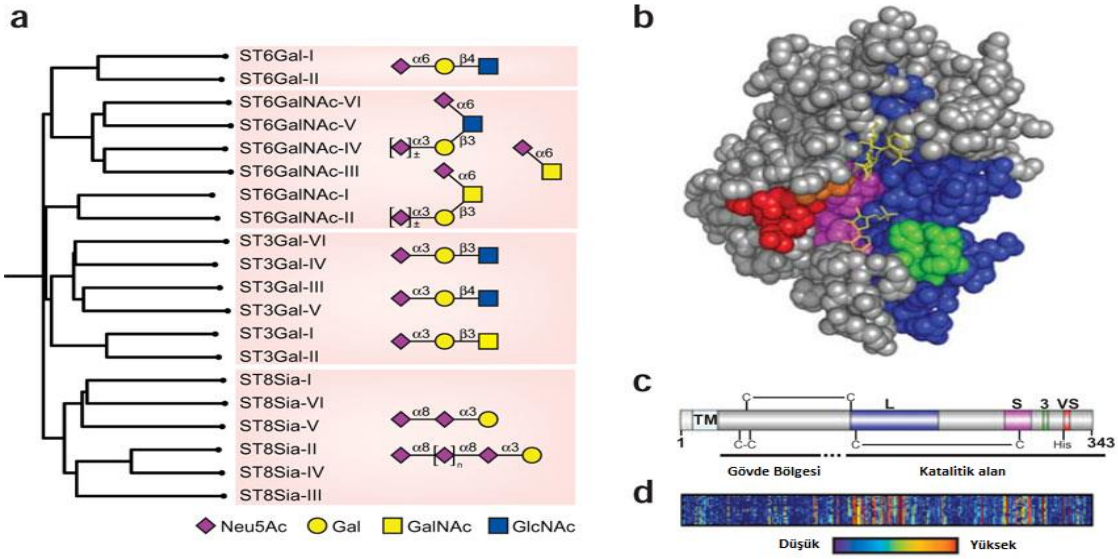


Şekil 5. Sialil motifleri (100)

Bu enzim ailesi tarafından paylaşılan sialil motiflerini gösteren tipik bir sialiltransferazın alan yapısı. 48-49 amino asitlik siyalil L motifi, üyeler arasında önemli benzerlikler taşır ve amino asit sekansında %65'e kadar aynı olabilir. Sialil S motifi daha küçüktür (yaklaşık 23 amino asit) ve sadece iki kesinlikle korunmuş kalıntı ile ailenin üyeleri arasında daha fazla farklılık gösterir. Her iki durumda da aynı kalıntılar belirtilir ve benzerlik gösteren kalıntılar parantez ile gösterilir. (*) Yüksek düzeyde korunmuş bir H-X4-E dizisinin konumunu göstermektedir.

Sialiltransferazlar

"Glikomik" alanı son zamanlarda transkriptomik, genom ve proteomik alanlarındaki araştırmaların bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (101). Sialil transferazlar, sialik asidi alıcı sitidin monofosfat N-asetilnöraminik asit (CMP-Neu5Ac) molekülünden alıcı glikan oligosakarit zincirlerine, proteinlerine ve lipid moleküllerine aktaran bir enzim ailesidir. Siyalik asitlerin biyosentezi ve aktivasyonunda da rol oynarlar. Glikosil transferaz ailesinin üyeleri olan siyalil transferazları analiz etmek için üç kategori kullanılır. Her ikisi de mitokondriyal organelin dış zarının zar yüzeylerinde bulunan Golgi aygıtı ve granüler ve pürüzsüz endoplazmik retikulum, organelin yapısal bütünlüğünü korumakla görevli sialil transferazları içerir. (102). Bu transfer spesifik olarak oligosakkaritlere, glikolipidlere ve glikoproteinlere olur ve sialik asidin bağlandığı molekülün yapısına, tipine, pozisyonuna ve glikoz kalıntısına özeldir (103,104). Sialiltransferazlar, Neu5Ac ile alıcı molekül arasında oluşturdukları bağlantı sayısına bağlı olarak sialiltransferazlar ve polisialiltransferazlar olarak adlandırılır: α2-3, α2-6 ve α2-8. (102,105). Alıcı şeker molekülü ve bağ türüne göre kategorize edilen 20 farklı siyaliltransferaz ve polisiyaliltransferaz tipi vardır. Sentezleri sırasında bağlandıkları karbonhidrat moleküllerine göre dört kategoriye ayrılabilirler: ST3Gal (α2,3-ST), ST6Gal (α2,6-ST), ST6GalNAc ve ST8Sia (α2,8-ST). Ayrıca bu çok sayıdaki enzim ailesi kendi aralarında daha küçük gruplara ayrılmaktadır (102). Polisiyaliltransferazlar olarak da bilinen α-2,8-siyaliltransferazlar, homopolimerlerin üretimini katalize ederek oldukça seçici bir yapıya sahipken, α-2,3- ve α-2,6-sialiltransferazlar, çeşitli protein yapılarında çekirdek glikan yapısını değiştirme kapasitesine sahiptir (102,105). Şekil 6'da insan sialiltransferazların yapısı gösterilmiştir.



Şekil 6. İnsan Sialiltransferazlarının Yapısı (106)

(a) İnsan sialiltransferaz ailesinin 20 üyesi için homoloji dendrogramı gösterilmektedir. Dört ana alt ailenin her biri tarafından üretilen sialoside ürünleri sembol biçiminde gösterilmektedir. (b) Dört 'sialil motifini' vurgulayan pST3Gal-I'in CPK gösterimi: büyük (L, mavi), küçük (S, macenta), 3 (3, yeşil) ve çok küçük (VS, kırmızı). Bağlı akseptör ligand sarı renkle ve katalitik His319 turuncu renkle vurgulanmıştır. Motifler 3 ve VS arasında yer alan düzensiz bir ilmekten oluşan varsayılan 'kapak' alanı çıkarılmıştır. (c) b'de korunmuş motifler için kullanılanla aynı renk kodlamasıyla vurgulanan pST3GalI'nin birincil dizisindeki siyalil motif bölgelerinin lokalizasyonu. (d) hST3Gal-I'e göre siyaliltransferaz ailesinin 20 üyesinin tümü arasında dizi koruma bölgelerini vurgulayan homoloji ısı haritası. Diğer siyaliltransferazlardaki eklemeler, c'de gösterilen siyalil motiflerine göre karşılaştırmaları sürdürmek için çıkarılmıştır.

Omurgalı siyaliltransferazları benzer yapısal özelliklere sahiptir. Genellikle hücrenin trans golgisinde bulunurlar. Sialiltransferazlar bir C-terminal katalitik alana ve bir N-terminal sitoplazmik kuyruğa sahiptir ve uzunlukları 20 ila 200 amino asit arasında değişebilir. Yapısı, korunan dört siyalil motifi içerir. Bu motifler "L" (Uzun), "S" (Kısa), "III" (üçüncü konum) ve "VS" olarak adlandırılır ve donör ve donör substratları (Çok Küçük) belirlemekle görevlidirler. -III ve -VS motifleri alıcı substratın bağlanmasına yardımcı olurken, L sialylmotif donör substratın bağlanmasına yardımcı olur. Donör ve alıcı substrat bağlanmasına S-sialilmotif (107) katkı sağlar.

Fizyolojik sürecin korunmasına yardımcı olan post-translasyonel değişikliklerden biri de glikan veya glikoprotein zincirlerinin terminal ucuna kovalent bağlanma yoluyla sialik asit eklenmesi olarak tanımlanan sialilasyondur (106,108). Sialilasyon, hücre tanıma, hücre ve matris teması, hücreler arası iletişim ve glikokonjugat yarı ömrü dahil olmak üzere bir dizi biyolojik sürece katılan bir olaydır (106,107).

"Hipersialilasyon" olarak bilinen durum, kanser hücrelerinin yüzeyinde anormal derecede yüksek seviyelerde sialik asit bulunması ile karakterize edilir (14). Normalin üzerine çıkan sialik asit seviyeleri, ilaç direnci, immünolojik kaçış, tümör hücresi migrasyonu ve invazyon üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Araştırmalara göre kanser hücrelerinde sialitransferaz aktivitesi yükselirken, yüzeyden sialik asit salan sialidaz ekspresyonu düşmektedir. Sonuç olarak Golgi organelinde sioglikan sentezi artarken hidrolizi azalmaktadır (103,108). Yumurtalık, prostat, meme, kolorektal, pankreas ve akciğer kanserleri gibi birçok farklı kanser türünde anormal siyalilasyon malignite sinyali olarak kabul edilmektedir (105). Sialiltransferaz aktivitesinin artması bilinen ilk mekanizmadır. Bir glikosiltransferaz alt sınıfı olan sialiltransferazlar, karbonhidrat özgüllüklerine göre α2,3-Sialiltransferaz (ST3Gal); α2,6-Sialiltransferaz (ST6Gal); ve α2,8-Sialiltransferaz (ST8Sia) olmak üzere dört ana aileye ayrılır ve ekspresyonları kanser hücrelerinde değişkendir (105,108).

Hücre yüzeylerinde görülen tümöre özgü karbonhidrat antijenlerindeki artış, Golgi organelindeki siyaliltransferazlardaki artışla ilişkilidir. Hücre yüzeyindeki glikosilasyondaki değişiklikler de artan sialiltransferaz ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Birkaç kanser türünün siyaliltransferaz ekspresyonunu ve bileşimini arttırdığı iddia edilmektedir. Bu enzimler, kanser hücrelerinin istilasını ve göçünü teşvik etmek, hücre ölümünü önlemek, hücre proliferasyonunu sürdürmek, epitelyal-mezenkimal geçişi teşvik etmek, anjiyogenezi teşvik etmek ve bağışıklık sisteminden kaçmayı sağlamak gibi çeşitli aktivitelerde rol oynarlar (103,105,108).

İkinci tanınan mekanizma ise sialidaz ekspresyonundaki değişikliklerdir (31). Hücre yüzeyinde, sialik asitleri glikokonjugatlardan uzaklaştırmaktan sorumlu olan sialidazlar, siyalilasyonu kontrol eder. İnsan vücudunda dört sialidaz enzimi vardır ve her biri farklı amaçlara hizmet etmektedir. Ekzositoz, fagositoz, immünolojik tepki ve lizozomlardaki sialoglikokonjugatların yıkımı, lizozomal sialidaz-1 (NEU1) tarafından başlatılır. Miyoblast ve nöral gelişimde yer alan sitozolik bir sialidaz olan sialidaz-2 (NEU2), sitozolde bulunur. Nöral değişikliklerde yer alan sialidaz türleri, plazma zarındaki sialidaz-3 (NEU3) ve lizozom,

mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki sialidaz-4 (NEU4)'tür (100,104). Üçüncü mekanizma, siyaliltransferazların değişken substrat mevcudiyetidir. Tümör mikro ortamının sialik asit üretimindeki birkaç değişiklik, anormal sialilasyonla sonuçlanabilir. Çalışmalar, istila ve metastaza yol açan moleküllerin üretiminde değişikliklerin meydana gelebileceğini göstermiştir. Eşzamanlı olarak heksozamin üretimi sırasında UDP-GlcNAc molekülündeki yükselme sonucu sialilasyon ve siyaliltransferaz ekspresyonunda artış söz konusu olmaktadır (105).

ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ve KANSER

Endoplazmik redikulum (ER), tüm ökaryotlarda bulunan, zara bağlı ribozomlarda sentezlenen proteinlerin katlandığı, lipitlerin ve sterollerin sentezinin yapıldığı ve serbest kalsiyumun depolandığı zarla çevrili ağsı yapıdaki hücresel organeldir. Salgı yükünün artması gibi hücresel fizyolojik stresler veya ER'de hatalı katlanmış proteinlerin varlığı gibi patolojik stresler, fonksiyonel protein ihtiyacı ile ER'nin doğru protein katlama kapasitesi arasında bir dengesizliğe neden olabilir. Bu durum ER stresine neden olur. ER stresinin algılanması ve buna karşılık yanıt oluşturulması için ökaryotik hücreler, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir grup sinyal iletim yolu geliştirmiştir (109). UPR'nin ER-yakın düzenleyicilerinin çoğu, inositol gerektiren protein 1 (IRE1), PKR benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF)-6 dahil olmak üzere bir dizi transmembran proteini ER'da yerleşik olarak bulunmaktadır. Bu proteinler, ER stresini algılayan, sitozolik efektör alanlara birleştirilmiş, ER lümenine çıkıntı yapan alanları taşır. ER stresi, ER'nin proteinleri katlama kapasitesi doygun hale geldiğinde ortaya çıkar. ER stresi, protein glikozilasyonunu veya disülfit bağı oluşumunu bozan faktörlerden veya salgı yoluna giren proteinlerin aşırı ekspresyonundan veya mutasyonlarından kaynaklanabilir. Sonuç olarak, bu stres algılayan proteinlerden gelen sinyaller hücreyi korur veya alternatif olarak hücre ölümünü destekler.

Endoplazmik redikulum (ER) stresi ve eşlik eden UPR hücre ölümüne yol açabileceğinden, protein yanlış katlanmasında artışa veya hücrenin ER'de bu proteinleri işleme yeteneğinde azalmaya yol açan koşulların hücresel işlev bozukluğuna ve hastalığa neden olması şaşırtıcı değildir. Bu tür hastalıklar, hücrenin salgılanan veya zar proteinlerini katlama kabiliyetinin azalmasından, yanlış katlanmış proteinleri tanıma veya bunlara yanıt verme kabiliyetinin azalmasından ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin artan yükünün bir sonucu olabilir. Gerçekten de, ister doğal olarak meydana gelen ister deneysel olarak teşvik edilen bu durumların her birinin, insanlarda veya model organizmalarda hücresel düzeyde veya organizma düzeyinde hasara neden olduğu gösterilmiştir.

Protein homeostazı (veya proteostazı), protein transkripsiyonu, translasyonu, katlanması ve degradasyonunu içeren hücresel süreçlerin toplamıdır (110). Bir hücrenin işlevsel kalması ve değişen biyokimyasal ve çevresel sinyallere uyum sağlayabilmesi için proteostazın tavizsiz kalması gerekir (111). Katlanmış bir proteinin nihai şekli, işlevi için gerekli olduğundan, protein katlanması hücresel süreçler için özellikle önemlidir. Hücre zarı dinamikleri, protein katlanmasının çok önemli bir yönüdür; ER zarının bileşiminde ve boyutunda uyarlamalar, proteostazı sürdürmek için gereklidir ve buna karşılık, bu zar bütünlüğünü korumak için uygun protein katlanması gerekir (112).

Normal koşullar altında, salgılama yolu için hedeflenen proteinler, ER membranındaki ribozomlarda sentezlenerek doğrudan ER lümenine gerer, şaperon proteinleri tarafından bağlanır, katlanır ve daha sonra salgılanmak üzere Golgi organelinde kesecikler halinde paketlenir (113). Ancak bazı durumlarda proteinler, ER'de yanlış katlanmış veya katlanmamış halde kalabilirler ve protein kalite kontrol mekanizması tarafından geri kazanılamazlar. Böyle durumlarda yanlış katlanmış proteinler parçalanmak üzere sitozole gönderilir ve proteazoma hedeflenerek burada parçalanır (114). Ancak bazı çevresel, hücresel veya moleküler faktörler bu yolda bozulmalara neden olarak yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin uygun şekilde devrini önleyerek potansiyel olarak bunların birikmesine ve kümelenmesine yol açabilir. Bu süreç ER stresi olarak bilinen hücresel bir durum oluşturur (115-117). Endoplazmik retikulum stresi ve proteinlerin doğru şekilde katlanamaması, protein fonksiyonu kaybı ve hücre ölümü ile ilişkilidir (118-120). Bundan kaçınmak için, hücre yanlış katlanmış protein stresini, sitoplazmada yanlış katlanmış proteinleri idare eden ısı şoku tepkisi (HSR) (121) ve katlanmamış protein tepkisi (UPR) olmak üzere iki temel stres tepki yolu aracılığıyla çözer (122-123). Bu protein kalite kontrol mekanizmaları, hücresel süreçlerin işlevini ve bütünlüğünü korumak için gereklidir. Bu mekanizmalar devreye girmediğinde, hücre işlev bozukluğuna ve toksisiteye neden olurlar (125,126). Normal koşullar altında, her ikisi de yanlış katlanmış proteinlerin varlığından kaynaklanan hücresel stresin çözülmesine yol açar. Yanlış katlanmış proteinle ilişkili birkaç hastalıkta olduğu gibi bazı durumlarda (127,128), bu stres tepki yollarının kendileri bozulabilir. Bu, yanlış katlanmış proteinlerin daha fazla birikmesine yol açar ve bu da daha fazla UPR veya HSR bozulmasına neden olur (129,130). Yanlış katlanmış protein agregatlarının, ER'de sentezlenen katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri tanıyan bir protein kalite kontrol mekanizması olan ER-ilişkili bozunma (ERAD) yoluyla yanlış katlanmış proteinleri parçalamak için önemli olan makineleri bağladığı ve ayırdığı da gösterilmiştir (131). Bu ERAD bozukluğu, ER'de daha fazla strese neden olur ve UPR'nin

indüklenmesine neden olur. Proteostatik disfonksiyon, esas olarak artan ER stresi, protein birikimi ve stres yanıtı bozukluğu gibi bir kısır döngüye yol açar.

UPR, ER stresini çözmek için çalışan ve protein sentezi ve katlanmasının devam etmesine izin veren karmaşık bir sinyal yoludur ve ER'de meydana gelenler ve farklı pekçok hücresel yollar ve süreçlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Ayrıca, yaşlanma ve lipit metabolizması dahil olmak üzere dış etkilerden etkilendiği gösterilmiş ve bu yoldaki işlev bozukluğu, kısalan hücresel yaşam süresi ve hücre ölümü ile bağlantılı görülmüştür (131,132). Bu nedenle, ER stresi ve UPR'nin arkasındaki moleküler mekanizmaların incelenmesi, protein homeostazının tüm hücreyi nasıl etkilediğinin anlaşılması ve stres faktörlerine yanıtın belirlenmesi, yaşlanma ve hücre ölümü dahil olmak üzere diğer süreçler üzerindeki etkilerinin ortaya konması için gereklidir.

TUNİKAMİSİN

Doğal bir nükleosid ürünü olan Tunikamisin (TM) ilk olarak *Streptomyces lysosuperficus* ve daha sonra *Streptomyces char treusis*'in fermantasyon sıvılarından izole edilmişdir. TM, peptidoglikanın biyosentezinden sorumlu olan bakteriyel fosfo-N-asetilmuramil-pentapeptit transferaz (MraY) ve lipopolisakarit ve ortak enterobakteriyel antijen sentezinden sorumlu olan undekaprenil-fosfat α-N-asetilglukosaminil 1-fosfat transferaz (WecA) tarafından katalize edilen enzimatik reaksiyonları inhibe eder (133,134). Tunikamisin, birçok poliprenil-fosfat-N-asetilheksozamin-1-fosfat-transferaz (PNPT) süper ailesinin bir nükleosid-analog inhibitörüdür (135,136). MraY, bakterilerin hayatta kalması için gerekli bir enzimdir ve antibakteriyel ilaç keşfi için iyi bir hedeftir. (137). Tunikamisinler ayrıca endotel hücrelerinin Endoplazmik Redikulumunda (ER) N-bağlı glikopeptitlerin ilk N-asetilglukozaminasyonundan sorumlu olan insan UDP-N-asetilglukosamin-dolikil fosfat N-asetilglukozamin-fosfotransferazı (GPT) güçlü bir şekilde inhibe eder (134). Aynı zamansa katlanmamış protein yanıtını aktive etmek için bir ER stres indükleyicisi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (138,139). TM ayrıca, doğal substratı UDP-MurNAc-pentapeptid için temel translokaz MraY'nin rekabetçi inhibisyonu sayesinde güçlü antibakteriyel aktiviteye sahiptir (140,141). TM'ler, proteinlerin *N*- bağlı glikosilasyonunun (NLG) geniş çapta araştırıldığı çalışmalarda biyolojik araçlar olarak kullanılmaktadır.

Poliizoprenil fosfat ile UDP-GlcNAc veya UDP-MurNAc-pentapeptid arasındaki enzimatik reaksiyonları inhibe ediyor olmaları TM2nin antibakteriyel, antiviral ve antitümör aktivitelerini ortaya koymaktadır. Bu özelliklerinin yanında biyolojik aktiviteleri nedeniyle, TMler, kanser için terapötik ajanlar olma potansiyeline sahiptir. Yapısal olarak, TMler, bir 1,1-

β, α-trehaloz tipi glikosidik bağ ile bağlanmış bir dekodialdoz iskeleti, bir lipid zinciri ve bir GlcNAc (N-asetilglukosamini) fragmanından oluşan bir yapıya sahiptirler. Streptovirudinler, korinetoksinler, MM19290, mikosposidin, antibiyotik 24010, aynı psödotrisakarit çekirdeğini paylaşır ve quinovosamycins bir deoksi türdeştir (133).

NLG, transmembran Reseptör tirozin kinazların (RTK) glikoproteinlerinin olgunlaşmasında oldukça düzenlenmiş ve kritik bir adımdır. TM nükleosit antibiyotiği olup hücrelerde N-bağlı oligosakkaritlerin biyosentezindeki ilk adımı inhibe etmektedir. Bu inhibisyon, glikoproteinlerin katlanmasına etki eder ve yanlış veya katlanmamış proteinlerin ER'da birikmesine neden olur. ER'da hatalı katlanmış glikoproteinlerin birikmesi ER stres indüksiyonu ve apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanır (142,143).

Daha önceki çalışmalarda NLG bozulmasının, RTK'nın protein seviyelerini ve aşağı akış sinyal yolunu azaltabileceği ifade edilmiştir ve çalışmalar NLG'nin inhibisyonunun hem onkojenik sinyali hem de terapötik direnç mekanizmalarını azaltmak için alternatif yaklaşım olabileceğini düşündürmüştür (144). NLG inhibitörü olan TM, deneysel olarak ER stresini indüklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı terapötik ajanların TM ile etkileşimleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. İlaçlar, aşılar ve antijenlerin tunikamisin ile etkileşimi (145)

İlaçlar	**Etkileşim**
Warfarin	Tunikamisin Warfarin ile kombine edildiğinde kanama riski veya şiddeti artabilir.
Vibrio cholerae CVD Ag	*Vibrio cholerae* CVD 103-HgR suşu canlı antijeninin terapötik etkinliği, Tunikamisin ile kombinasyon halinde kullanıldığında azaltılabilir.
Typhoid vaccine	Tifo aşısının terapötik etkinliği, Tunikamisin ile kombinasyon halinde kullanıldığında azaltılabilir.
Tioclomaro	Tunikamisin Tioklomarol ile kombine edildiğinde kanama riski veya şiddeti artabilir.
Picosulfuric acid	Pikosülfürik asidin terapötik etkinliği, Tunikamisin ile kombinasyon halinde kullanıldığında azaltılabilir.
Phenprocoumon	Tunikamisin Phenprocoumon ile birleştirildiğinde kanama riski veya şiddeti artabilir.
Phenindione	Tunikamisin Phenindione ile kombine edildiğinde kanama riski veya şiddeti artabilir.
Lactulose	Lactulose'un terapötik etkinliği, Tunikamisin ile kombinasyon halinde kullanıldığında azaltılabilir.
Fluindione	Tunikamisin Fluindione ile kombine edildiğinde kanama riski veya şiddeti artabilir.
Ethyl biscoumacetate	Tunikamisin, Ethyl biscoumacetate ile birleştirildiğinde kanama riski veya şiddeti artabilir.
BCG vaccine	Tunikamisin ile kombinasyon halinde kullanıldığında BCG aşısının terapötik etkinliği azaltılabilir.
Dicoumarol	Tunikamisin, Dicoumarol ile birleştirildiğinde kanama riski veya şiddeti artabilir

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER ve CİHAZLAR

Deneylerde kullanılan sarflar ait bilgiler Tablo 3'de ve kullanılan cihaz bilgileri Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan sarfların adı, markası ve katalog numaraları

Kullanılan Sarflar	Marka	Katalog Numarası
SH-SY5Y	Ankara Şap Enstitüsü	-
Tunikamisin	Sigma	T7765-1MG
MTT	Biomatik	A3338-5G
Etanol	Merck	603-002-00-5
DMSO	Merck	67-68-5
Hams'F-12	Multicell	318-010-CL
EMEM	Multicell	320-026-CL
DMEM	Multicell	319-020-CL
Tripsin- EDTA	Multicell	352-542-EL
L-glutamin	Multicell	609-065-EL
FBS	Multicell	FBS-HI-IIA
Penisilin-Streptomisin	Multicell	450-201ZL
High- Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kit	Thermo Fischer Scientific	4368814
RNA PureLink ® RNA Mini kit	Life Science	12183018A

Tablo 4. Kullanılan cihazların adı ve markası

Cihaz Adı	Marka
Laminar Kabin	Sfae Fast Elite (EN 12469 2000)
Etüv (%5 CO_2)	Panasonic
Santrifüj	Hermle
Mikro plaka spektrofotometre	Multiskan go- Thermo Scientific
Gradient PCR	Applied Biosystems Veriti 96 Well
qRT-PCR	Applied Biosystems Quant studio 6 Flex
Nanodrop	NanoQ Optizen

ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATLARI

Deneylerde kullanılan SH-SY5Y (insan nöroblastom) hücre hattı Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM) hücre koleksiyonundan temin edildi. SH-SY5Y hücrelerin çoğalabilmeleri için DMEM:HAMS/F:12 (1:1), % 5 FBS (Fetal Bovin Serum), % 1 L-glutamine, % 1 Penicilin Streptomycin ile hazırlanmış besiyeri kullanıldı.

HÜCRELERİN KÜLTÜRE ALINMASI ve PASAJLANMASI

Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının kültüre alınması ve pasajlanması TÜTAGEM Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan Safe Fast Elite (EN 12469 2000) marka flow kabinde gerçekleştirildi ve 37°C de %95 nem ve %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. İnvert mikroskop kullanılarak belirli aralıklarda hücrelerin çoğalımları kontrol edildi. Çoğalım durumlarına göre pasajlama işlemleri yapıldı.

Pasajlama işlemi için; flaskta içerisinde bulunan besiyeri uzaklaştırılarak 37°C'ye getirilmiş tripsin-EDTA ilave edilmiş ve hücrelerin flask tabanından ayrılması için 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra flask tabandan ayrılan hücreler santrifüj tüplerine alınarak 2500g'de 2.5 dakika santrifüj edilmiş ve böylelikle eklenen tripsin uzaklaştırılarak yeni besiyeri eklenmiştir. Yeni besiyeri eklendikten sonra hücreler yeni flasklara alınmış ve pasajlama işlemi tamamlanmıştır.

Deney Grupları ve Tunikamisin Konsantrasyonları

Çalışma, kontrol ve tıunikamisin (0.09-50 µM) olacak şekilde planlanarak ve SH-SY5Y hücrelerine 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Çalışma 1 kontrol ve 2 deney grubu olacak şekilde planlanmış ve yürütülmüştür.

1.Grup: SHSY5Y hücre hattı grubu (Kontrol grubu).

2.Grup: 24 saat süre ile TM uygulanmış SHSY5Y hücre hattı grubu.

3.Grup: 48 saat süre ile TM uygulanmış SHSY5Y hücre hattı grubu.

MTT (*3-(4,5-Dimethyldiazol-2-Yl)-2,5* Diphenyl Tetrazolium Bromid): Madde Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

MTT, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan enzimler tarafından sarı renkli MTT maddesinin indirgenerek mor renkli suda çözünmeyen kristallere dönüştürmesi esasına dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. 492 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçülerek, belirlenen absorbanslara göre % hücre canlılıkları ve hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz değerleri hesaplanmaktadır.

MTT Testi Protokolü

İki adet 96'lı plakalara her bir kuyucuğa 180 µL (10^5) olacak şekilde SH-SY5Y hücre ekimi yapılmış ve hücre ekimi yapılan plakalar 24 saat 37°C ve %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan tunikamisinden 20 µL eklenerek tekrar inkübe edilmiştir.

Uygulama süresinin sonunda, plakalardaki tüm kuyucuklara 5 mg/mL olacak şekilde hazırlananan MTT çözeltisinden 20 µL eklenmiş ve 37°C'de, %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (2 saat). İki saatlik sürenin sonunda, plakanın her bir kuyucuğuna 200 µL DMSO ilave edilmiş ve 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Absorbans okumaları sonunda % hücre canlılıkları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

% Hücre Canlılığı: Örnek absorbans değeri / Kontrol absorbans değeri * 100

RNA İZOLASYONU ve cDNA SENTEZİ

SH-SY5Y hücreleri $4x10^6$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. MTT testi sonucunda istatistiksel olarak belirlenen tunikamisinin IC50 dozu kontrol grubu hariç uygulama grubuna eklenmiş ve uygun kit protokolüne göre RNA izolasyonları yapılmıştır. Kit protokolüne göre;

Plaka içerisindeki medyum uzaklaştırılarak, her bir kuyuya %1 merkaptoetanol içeren 500 µL lizis tamponu ilave edilerek inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler ependorf tüplere alınarak 500 µL %70'lik etanol ilave edilmiş ve pipetaj yapılmıştır. Pipetaj yapılan karışım, kitte bulunan spin kolonlara aktarılmış ve 10.000 g'de 20 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra yıkama tamponu 1'den 700 µL ilave edilmiş ve 20 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı uzaklaştırılarak ikinci yıkamaya geçilmiştir. 500 µL tampon-2'den ilave edilmiştir. Santrifüj işlemi yapılarak altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 2 sefer yapılmıştır. İkinci kez yapılan yıkama-2'den sonra 10.000 g'de 2.30 dk santrifüjlenmiştir. 50 µL RNaz içermeyen su

eklenerek 2 dakika 10.000 g'de santrifüj yapılmıştır. Elde edilen RNA'lar, Nanodrop cihazında 260-280 nm'de okunmuş ve cDNA sentezine geçilmiştir.

İzole edilen RNA'lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kiti kullanılarak (Tablo 5) cDNA'lar sentezlenmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Tablo 5. cDNA sentez protokolü

Madde	**Hacim**
Total RNA	10
10 X RT tampon	2 µL
25 X dNTP mix (100 mM)	0,8 µL
10 X Random Primer	2 µL
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 µL
Nukleaz free su	4,2 µL
Son Hacim	20 µL

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR)

Alfa-2,8-sialiltransferaz 8B (ST8SIA2), β1,6-*N*-asetilglukozaminiltransferaz V (GnT-V,) *N*-Asetilgalaktozaminiltransferaz 3 (GALNACT3), β1,3-N-asetilglukosaminiltransferaz-3 (B3GNT3), K-RAS Proto-Onkogen (K-RAS), H-RAS Proto-Onkogen (H-RAS), Raf-1 Proto-Onkogen (RAF), Mitojen aktifleştiren kinaz **(**MEK), Hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz (ERK) genlerine ait relatif kat değişimleri Quant Studio 6 Flex qRT-PCR (384 kuyucuklu) sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. GAPDH geninin endojen kontrol olarak kullanıldığı analizde her bir gen ve örnek 3 tekrar olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Metot kısmında belirtildiği gibi kit protokolüne uygun olarak sentezlenen cDNA'lar; SYBR Green boyası kullanılarak analize alınmış ve belirtilen primerler ile RT-PCR'da çoğaltılmıştır. PCR döngüsü: 1 döngü 2 dakika 50ºC ve 10 dakika 95ºC, 50 döngü denaturasyon (95ºC 15 s) ve annealing, uzama (60ºC 'de 1 dakika) olarak ayarlanmıştır.

RT-PCR'da ΔΔCt metodu seçilerek RQ değerleri otomatik olarak hesaplatılmıştır. Tez kapsamında analiz edilen primerlerin baz dizileri Tablo 6'da gösterilmiştir. qRT-PCR reaksiyonu karışımının içeriği, Tablo 7'deki gibidir.

Tablo 6. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları

Gen Adı	Forward Primer Sekansı	Reverse Primer Sekansı
ST8SIA2	5′-GTG GTC TTC CTC ATC TTC G-3′	5′-GAG GAG CCG TTT ATT ACA AC-3'
GnT-V	5'-GAGCAGATCCTGGACCTCAG-3'	5'-GCTGTCATGACTCCAGCGTA-3'
GalNAcT13	5'-ATCCCTGCTGCCTGCGCTGAGG-3'	5'-TGTCCCCAAGGTCATGTTCCTCAG-3'
B3GNT3	5′ - TATGTGT CTGGAGCTTGAGG-3 ′	5′ - AAGGATGTGTAGGAGTTC GC - 3'
K- Ras	5'-GCTGGTGGCGTAGGCAAGAG-3'	5′- CTCCTCTTGACCTGCTGTGTCG- 3'
H- Ras	5'-AGGAGACCCTGTAGGAGGA-3'	5′- CGCTAGGCTCACCTCTATAGTG- 3'
Raf	5'-AGACTGCTCACAGGGCCTTA-3'	5'-CTGCAAATGGCTTCCTTCTC-3'
MEK	5'-GGTGTTTATTGGGCCTCAGA-3'	5'-ACCCGGAGCATCACAAATAG-3'
ERK	5'-GACAAGGGCTCAGAGGACTG-3'	5'-AGGACCAGGGGTCAAGAACT-3'

Tablo 7. qRT-PCR karışım içeriği

PCR karışımı içeriği	Hacim (µL)
Sybr Green Master Mix	6 µL
cDNA	2 µL
RNaz free su	2.2 µL
F Primer	0.4 µL
R Primer	0.4 µL
Son hacim	11 µL

VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK ANALİZİ

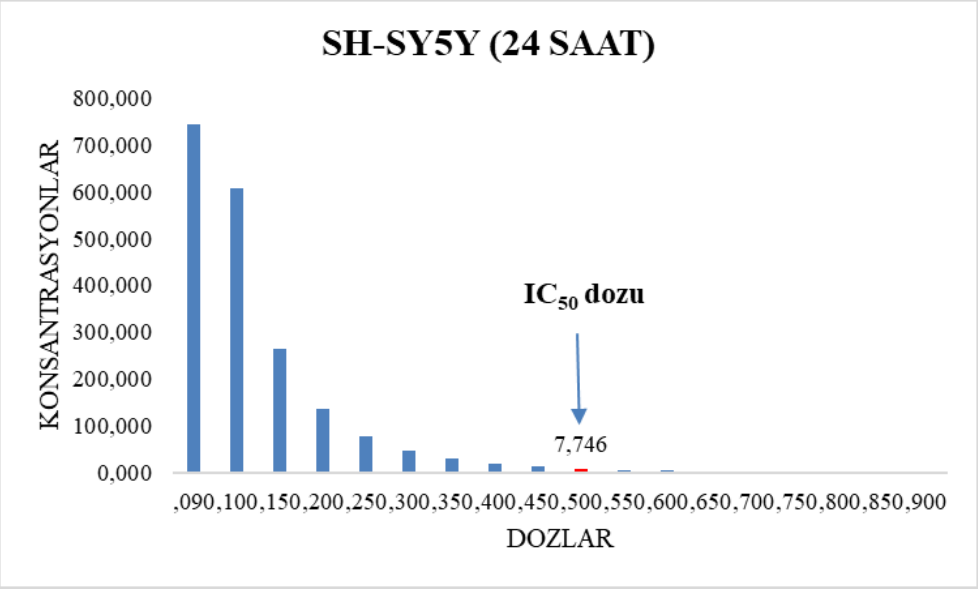
MTT analizinde hesaplanan % Canlılık değerleri baz alınarak, SPSS- Probit analizi yapılmış ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir (Log_{10}). Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde ▲▲Ct metodu ile analiz yapılmış ve düzeltme faktörü olarak GADPH gen ekspresyonu kullanılmıştır. Ayrıca gruplar arası T testi yapılarak, anlamlı çıkan genler değerlendirilmiştir.

BULGULAR

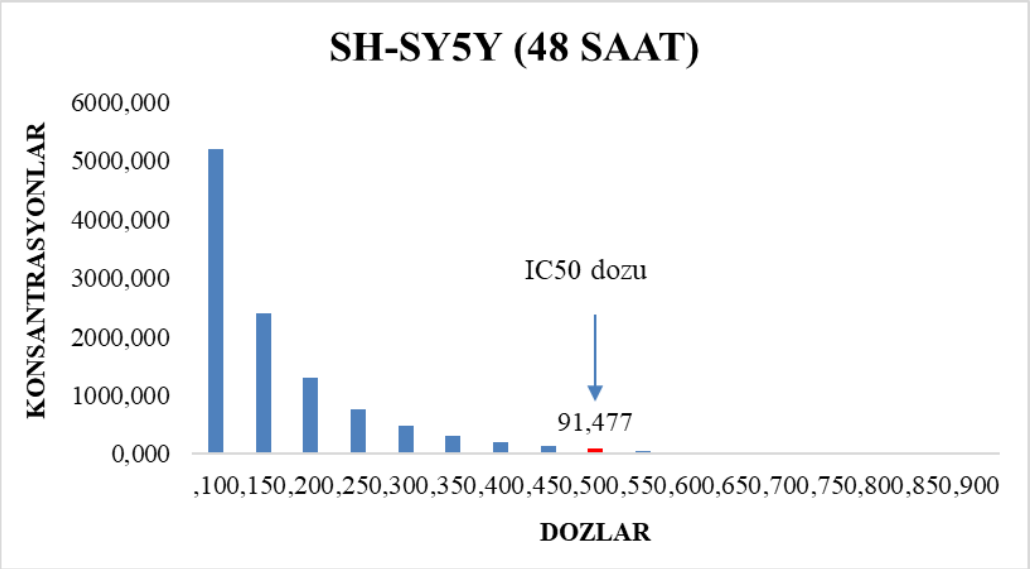
TUNİKAMİSİN KONSANTRASYONLARININ SH-SY5Y İNSAN NÖROBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Çalışma kapsamında ilk olarak SH-SY5Y hücre hatlarında 24 ve 48 saat süre ile farklı dozlarda TM uygulaması yapılarak MTT testi ile % canlılık değerleri belirlenmiştir.

SH-SY5Y hücrelerinde 24 ve 48 saat süre aralığında 0.09 µM ile 50 µM seri dilüsyon yapılarak uygulanmıştır. Süre bitiminde % canlılık değerleri hesaplanmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. 24 saatteki probit analiz grafiği Şekil 7' de, 48 saatteki probit analiz grafiği ise Şekil 8'de verilmiştir.

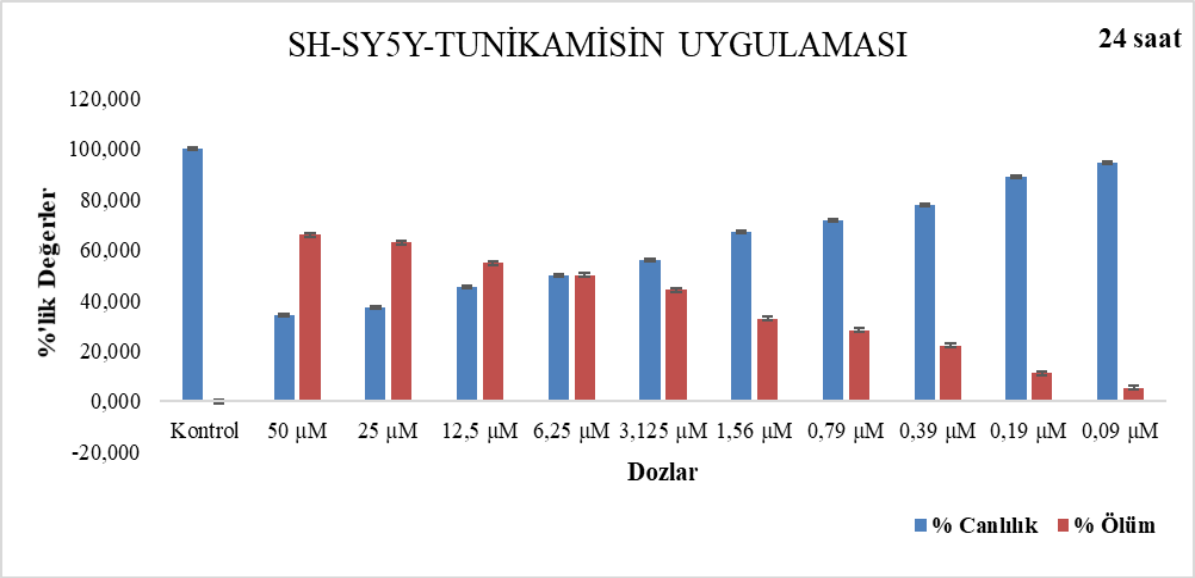


Şekil 7. 24 Saate ait Probit Grafiği ve IC50 dozu.



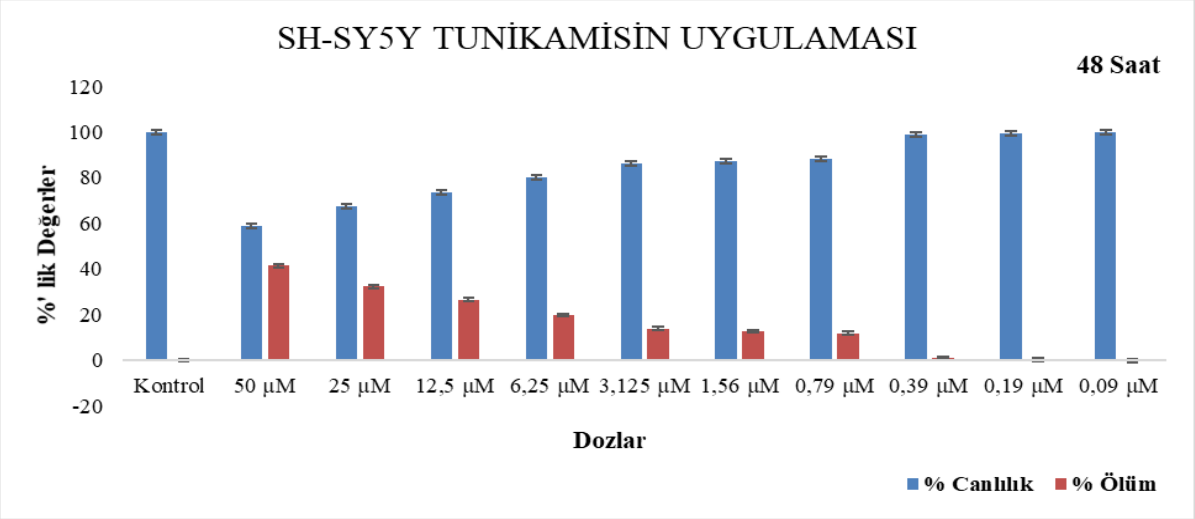
Şekil 8. 48 Saate ait Probit Grafiği ve IC50 dozu

TM uygulamasından 24 saat sonra SH-SY5Y hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0.0001$). Kontrole göre kıyaslama yapıldığında 50 µM konsantrasyonda hücrelerin % 65,938 ± 0.067'sinin ölü olduğu saptanmıştır. % canlılık değerleri hesaplanarak yapılan Probit analizlerinde IC_{50} dozu, 24 saatte 7.746 µM olarak belirlenmiştir. En düşük doz olan 0.09 µM'lık dozda ise %5,324 ölüm meydana gelmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. SH-SY5Y hücre hattında TM uygulamasının hücre canlılığına etkisi, 24h.

TM uygulamasından 48 saat sonra SH-SY5Y hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0.0001$). Kontrole göre kıyaslama yapıldığında 50 µM konsantrasyonda hücrelerin % 41,363 ± 0.052'sinin ölü olduğu saptanmıştır. % canlılık değerleri hesaplanarak yapılan Probit analizlerinde IC_{50} dozu, 48saatte 91.477 µM olarak belirlenmiştir. En düşük doz olan 0.09 µM'lık dozda ise 48 saatte ölüm meydana gelmemiştir (Şekil 10).



Şekil 10. SH-SY5Y hücre hattında TM uygulamasının hücre canlılığına etkisi, 48h.

TUNİKAMİSİN'İN GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Çalışmada metod kısmında açıklandığı gibi SH-SY5Y hücre hattından RNA'lar izole edilmiş ve uygun kit protokolü baz alınarak cDNA'lar sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA'lar kullanılarak, qRT-PCR metodu ile gen ifadelerindeki değişimler incelenmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde, kontrol ve TM grubundaki gen ifadelerine ait relatif kat değişiklikleri bulunmuştur. Bulunan değerler dikkate alınarak T testi yapılmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. 24 saate ait ortalama ve standart sapma sonuçları Tablo 8' de, T testi sonuçları ise Tablo 9'da verilmiştir (n:3). 48 saate ait ortalama ve standart sapma sonuçları Tablo 10' da T testi sonuçları ise Tablo 10'da sunulmuştur (n:3). Ayrıca tüm genlere ait 24 saatlik sütün grafiği Şekil 11'de 48 saatlik ise Şekil 12'de gibidir.

Tablo 8. qRT-PCR sonuçları (n:3; ortalama, std. spma) (24 saat)

Gruplar		N	Ortalama	Std. Sapma
ST8SIA2	**Kontrol**	3	1,020	,152
	Tunikamisin	3	22,007	,276
GnT-V	**Kontrol**	3	1,050	,005
	Tunikamisin	3	0,185	,014
GALNACT3	**Kontrol**	3	1,040	,020
	Tunikamisin	3	0,024	,000
B3GNT	**Kontrol**	3	1,026	,017
	Tunikamisin	3	8,071	,064
KRAS	**Kontrol**	3	1,040	,023
	Tunikamisin	3	2,022	,004
HRAS	**Kontrol**	3	1,036	,008
	Tunikamisin	3	1,032	,005
RAF	**Kontrol**	3	1,010	,005
	Tunikamisin	3	0,284	,012
MEK	**Kontrol**	3	1,020	,015
	Tunikamisin	3	6,624	,437
ERK	**Kontrol**	3	1,043	,023
	Tunikamisin	3	10,141	,017

Tablo 9. T testi sonuçları (anlamlılık: p<0,005) (24 saat)

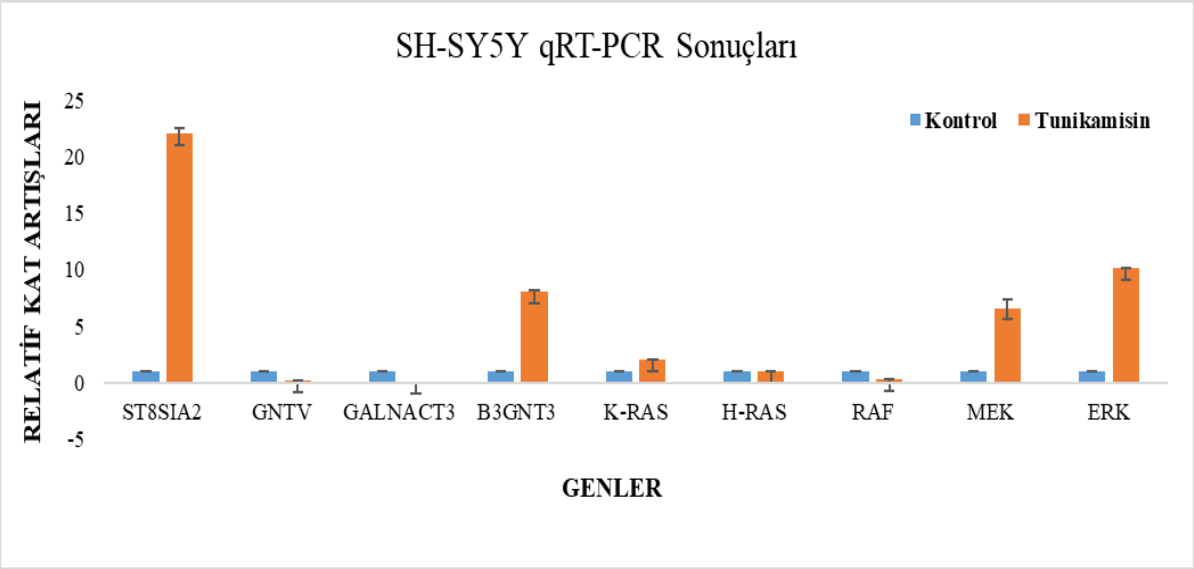
GENLER	**Varyansların Eşitliği için Levene Testi**			
	F	**t**	**df**	***p***
ST8SIA2	10,425	-75,920	2	**,000**
GnT-V	13,693	55,630	2	**,000**
GALNACT3	6,159	1112,817	4	**,000**
B3GNT3	15,989	-109,035	2	**,000**
K-RAS	10,406	-207,690	2	**,000**
H-RAS	15,440	-5,812	2	**,028**
RAF	15,995	58,322	2	**,000**
MEK	12,171	-12,850	2	**,006**
ERK	5,450	-533,192	4	**,000**

Tablo 10. qRT-PCR sonuçları (n:3; ortalama, std. sapma) (48 saat)

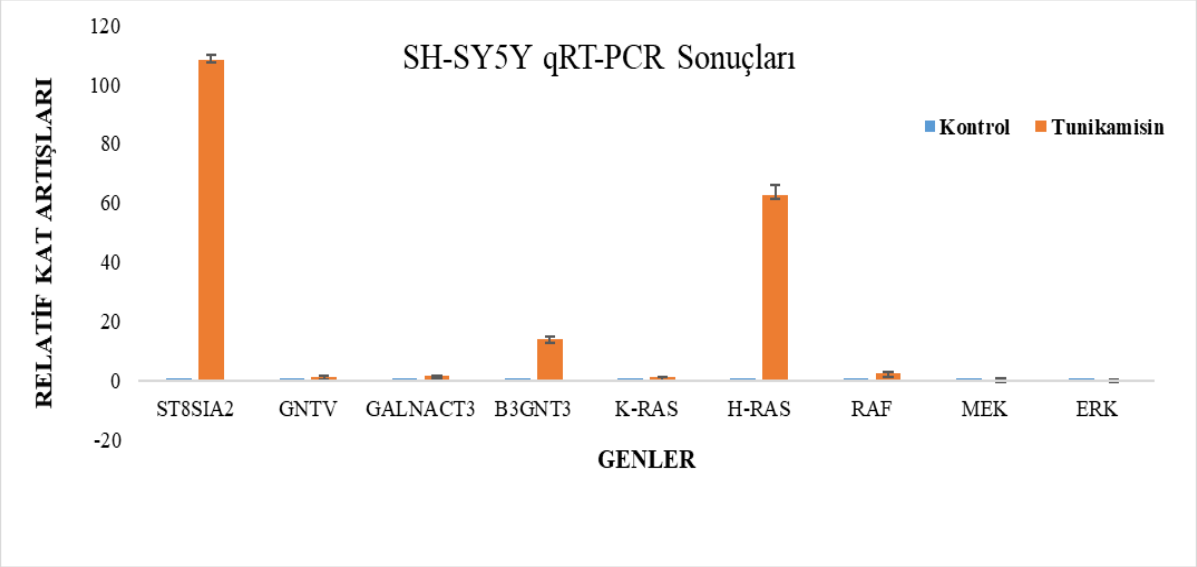
GENLER	Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma
ST8SIA2	**Kontrol Grubu**	3	1,020	,0152
	Tunikamisin Grubu	3	108,323	,910
GnT-V	**Kontrol Grubu**	3	1,050	,005
	Tunikamisin Grubu	3	1,461	,195
GALNACT3	**Kontrol Grubu**	3	1,040	,020
	Tunikamisin Grubu	3	1,737	,040
B3GNT3	**Kontrol Grubu**	3	1,026	,017
	Tunikamisin Grubu	3	13,914	,687
KRAS	**Kontrol Grubu**	3	1,040	,023
	Tunikamisin Grubu	3	1,196	,105
HRAS	**Kontrol Grubu**	3	1,036	,008
	Tunikamisin Grubu	3	62,564	1,962
RAF	**Kontrol Grubu**	3	1,010	,005
	Tunikamisin Grubu	3	2,480	,205
MEK	**Kontrol Grubu**	3	1,020	,015
	Tunikamisin Grubu	3	,539	,075
ERK	**Kontrol Grubu**	3	1,043	,023
	Tunikamisin Grubu	3	,534	,007

Tablo 11. T testi sonuçları (anlamlılık: p<0,005) (48 saat)

GENLER	**Varyansların Eşitliği için Levene Testi**			
	F	**t**	**df**	***p***
ST8SIA2	7,297	-117,892	4	**,000**
GnT-V	13,382	-2,103	2,003	**,170**
GALNACT3	2,094	-15,434	3,006	**,001**
B3GNT3	14,324	-18,745	2,003	**,003**
K-RAS	9,011	-1,451	2,192	**,221**
H-RAS	9,482	-31,358	2,000	**,001**
RAF	14,863	-7,151	2,003	**,002**
MEK	4,273	6,226	4	**,020**
ERK	2,710	20,712	4	**,000**



Şekil 11. Çalışılan genlerin kontrol ve TM grubundaki relatif kat değişimleri (24 saat)



Şekil 12. Çalışılan genlerin kontrol ve TM grubundaki relatif kat değişimleri (48 saat).

ST8SIA2 Gen İfadesi

24 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda *ST8SIA2* geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-75,920) ($p<0,005$). TM grubunda *ST8SIA2* geni relatif kat değişimi (N=22.007), kontrol grubuna göre daha fazla bulunmuştur.

48 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda *ST8SIA2* geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=-117.892) (p<0,005). TM *ST8SIA2* geni relatif kat değişimi (N=108.323), kontrol grubuna göre daha fazladır.

***GnT-V* Gen İfadesi**

24 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda GnT-V geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=55.630) (p<0,005). TM grubunda GnT-V geni relatif kat değişimi (N=0.186), kontrol grubuna göre daha düşüktür.

48 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda GnT-V geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

***GALNACT3* Gen İfadesi**

24 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda GALNACT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=1112.817) (p<0,005). TM grubunda GALNACT3 geni relatif kat değişimi (N=0.025), kontrol grubuna göre daha düşüktür.

48 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda GALNACT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;3,006=-15.434) (p<0,005). TM grubunda GALNACT3 geni relatif kat değişimi (N=1.9737), kontrol grubuna göre daha yüksektir.

***B3GNT3* Gen İfadesi**

24 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda B3GNT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-109.035) (p<0,005). TM grubunda B3GNT3 geni relatif kat değişimi (N=8.071), kontrol grubuna göre daha yüksektir.

48 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda B3GNT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2.003=-18.745) (p<0,005). TM grubunda B3GNT3 geni relatif kat değişimi (N=13.914), kontrol grubuna göre daha yüksektir.

***K-RAS* Gen İfadesi**

24 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda K-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-207.690) (p<0,005). TM grubunda K-RAS geni relatif kat değişimi (N=2.022), kontrol grubuna göre daha yüksektir.

48 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda K-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmamıştır.

***H-RAS* Gen İfadesi**

24 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda H-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark bulunmamıştır (t0.05;2=-5.812) (p=0,028).

48 Saatte;

Kontrol ve TM grubunda H-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-1.451) (p<0,005). TM grubunda K-RAS geni relatif kat değişimi (N=62.564), kontrol grubuna göre daha yüksektir.

***RAF* Gen İfadesi**

24. Saatte;

Kontrol ve TM grubunda RAF geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=58.322) (p<0,005). TM grubunda RAF geni relatif kat değişimi (N=0.284), kontrol grubuna göre daha düşüktür.

48. Saatte;

Kontrol ve TM grubunda RAF geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-7.151) (p<0,005). TM grubunda RAF geni relatif kat değişimi (N=2.480), kontrol grubuna göre daha düşüktür.

***MEK* Gen İfadesi**

24. Saatte;

Kontrol ve TM grubunda MEK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-12.850) (p<0,005). TM grubunda MEK geni relatif kat değişimi (N=6.625), kontrol grubuna göre daha yüksektir.

48. Saatte;

Kontrol ve TM grubunda MEK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmamıştır.

***ERK* Gen İfadesi**

24. Saatte;

Kontrol ve TM grubunda ERK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=-12.850) (p<0,005). TM grubunda ERK geni relatif kat değişimi (N=10.141), kontrol grubuna göre daha yüksektir.

48. Saatte;

Kontrol ve TM grubunda ERK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=20.712) (p<0,005). Kontrol grubunda ERK geni relatif kat değişimi (N=1.043), TM grubuna göre daha yüksektir.

TARTIŞMA

Glikozilasyon, glikoziltransferazların aktivitesi ile proteinlerin spesifik aminoasitlere transferi sırasında glikozidik bağlar oluşturularak gerçekleşen bir posttranslasyonel modifikasyondur. Glikozlasyonda kanser ile ilişkili en yaygın değişiklikler arasında sialilasyon, fukosialilasyon, *N*-bağlı ve *O*-bağlı glikozilasyonlar yer almaktadır (147).

Glikoproteinler ve glikolipidler üzerindeki glikan zincirlerinin terminal konumuna sialik asit eklenmesinden oluşan sialilasyonun anormal şekilde gerçekleşmesi kanserde meydana gelen glikosilasyondaki en yaygın değişikliklerden biridir (148). Sialil transferazlar ve sialidazların rol aldığı anormal sialilasyonda hücre yüzeyinde aşırı miktarda negatif yüklü sialik asitin birikimi meydana gelir. Sialik asit birikimi, kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin azalmasının yanı sıra immün kaçışa katkıda bulunmakla birlikte tümör invazyonu ve anjiyogenezini uyararak metastaza teşvik eder (148).

Kanser hücrelerinin yapısında meydana gelen moleküler düzeydeki değişiklikler glikoproteinlerin önemini arttırmaktadır. Hücre yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi için kullanılan yöntemler üzerinde hücre kültürü sık kullanılmaktadır.

N-bağlı glikosilasyon, ökaryotlarda proteinin baskın bir post-translasyonel modifikasyonudur ve düzensizliği, birçok hastalığın etiyolojisidir. UDP-N-asetilglukozamin dolikil-fosfat *N*-setilglukosaminfosfotransferaz enzimi, endoplazmik retikulum zarındaki *N*-bağlı glikosilasyonun ilk ve kararlı adımını katalize eder ve doğal ürün tunikamisinin hedefidir. Tunikamisin, bakteriyel hücre duvarı sentez enzimi MraY'yi inhibe ederek güçlü antibakteriyel aktiviteye sahiptir, ancak bir antibiyotik olarak kullanışlılığı, insan GPT'sinin hedef dışı inhibisyonu ile sınırlıdır. TM'nin N-bağlı glikozilasyonu nasıl engellediğine dair anlayışımız ve seçici olarak MraY'yi hedefleme çabaları, yapısal bilgi eksikliği nedeniyle engellenmektedir.

Jiho ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada kompleks halinde insan GPT'sinin kristal yapılarını analiz edilmiştir. Yapısal ve fonksiyonel analizler, tunikamisin tarafından inhibisyon mekanizmalarında GPT ve MraY arasındaki farkı ortaya koymaktadır. Bu farkın, MraY'ye özgü inhibitörleri potansiyel antibiyotikler olarak tasarlamak için kullanılabileceğini göstermişlerdir (134).

Uzun süreli ER stresi, enflamatuar miyopatilere ve insülin sinyal yollarına aracılık etmektedir. 2021 yılında; Hyeeneonn ve ark.'ları çift-sarmal RNA (dsRNA) ile aktive olan PKR, iskelet kası işlev bozukluğunda rol oynadığı göstermiştir. Yapılan çalışmada, PKR'nin kastaki ER stresindeki patolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışma da, seçici bir PKR inhibitörü olan imoksinin (IMX), TM kaynaklı ER stresinin teşviki ve C2C12 miyotüplerinde insülin sinyalinin baskılanması üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlanmıştır. Hücreler 5 mM IMX ile 1 saat ön işleme tabi tutularak, 23 saat 0.5 mg/mL TM'ye maruz bırakılmıştır. Bir hücre alt grubu, son 15 dakika boyunca 100 nM insülin ile uyarılmıştır. ER stresinde yer alan mRNA ekspresyonu ve protein seviyeleri, sırasıyla RT-PCR ve Western lekeleme ile ölçülmüştür. TM, IMX tarafından önlenen PKR fosforilasyonunu %231 oranında önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Ek olarak, IMX, CCAATenhancer-bağlayıcı protein homolog protein (CHOP, mRNA: %95 azalma; protein: %98 azalma) dahil olmak üzere ER stresiyle ilişkili belirteçlerin mRNA ve protein seviyelerini düşürerek transkripsiyon faktörü 4'ü (ATF4, mRNA: %69) aktive etmiştir. Ayrıca, IMX, insülinle uyarılan AS160 fosforilasyonunu ve glikoz alımını arttırırken, TM kaynaklı fosfo-insülin reseptörü b'nin baskılanmasını ve miyotüplerdeki Akt fosforilasyonunu iyileştirmiştir. Bu bulgular araştırmacılara, IMX'in potansiyel olarak PKR'nin aracılık ettiği TM kaynaklı iskelet kası ER stresi ve insülin direncine karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmüştür (149).

ER, salgı proteinlerini sentezleyen ve hücrenin ana kalsiyum depolama bölgesi olarak görev yapan kritik bir organeldir. ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesi ER stresiyle sonuçlanmaktadır. ER stresi ile birçok metabolik durumun patogenezi arasındaki ilişki hem in vivo hem de in vitro modeller kullanılarak iyi bir şekilde karakterize edilmiş olsa da ER stresi ile ilgili standartlaştırılmış bir model yoktur. Abdikarim ve çalışma arkadaşları (2017), iyi karakterize edilmiş iki ER stresi indükleyen ajan, thapsigargin ve tunikamisin kullanılarak standartlaştırılmış bir ER stresi modeli üzerine çalışmıştır. Bu mevcut çalışmanın amacı: öncelikle akut ER stresini modellemek için hangi ajanın in vitro kullanım için en uygun olduğunu karakterize etmek ve belirlemek ve sonrasında in vivo kullanım için hangi ajanın en uygun olduğunu değerlendirmedir. İlk amaçlarını incelemek için iki köklü metabolik hücre dizisi kullanılmıştır; insan hepatoselüler karsinomu (HepG2'ler) ve farklılaşmış fare adipositleri

(3T3-L1). İkinci amaçta ise, sahte, thapsigargin ve TM olmak üzere 3 tedavi grubuna randomize edilmiş C57BL/6J farelerini kullanılmıştır. Araştırmanın in-vitro sonuçları, TM'nin adipositlerde sürekli olarak hızlı ve etkili bir ER stresi indükleyicisi olarak çalıştığını, oysa thapsigargin ve TM'nin hepatositlerde ER stresi indüklemede eşit derecede etkili olduğunu göstermiştir. İn vivo sonuçlarla ilgili olarak, TM'nin sadece ER stresini tetiklemede değil, aynı zamanda ER stresiyle ilişkili metabolik değişiklikleri yeniden düzenlemede etkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle, araştırma bulguları, modellerine göre hangi ER stres ajanının uygun olduğu konusunda farklılık gösterdiğini doğrulamıştır (150).

SARS-CoV-2, uygun bir ilaç veya aşı bulunmaması nedeniyle tıbbi ve ekonomik bir sorun olmaya devam etmektedir. Bazı proteinlerdeki glikanlar, protein katlanmasında, oligomerizasyonda, kalite kontrolünde, sıralamada ve taşımada çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle glikoproteinlerin N-bağlı glikosilasyonunun engellenmesi, viryonun birleşmesini önleyecektir. TM bir antikanser ilacı olarak, *N*-bağlı glikanları inhibe etmektedir. Ali Adel ve Mahmood'un (2020) yaptığı çalışmada TM'nin viral glikoproteinler üzerindeki etki mekanizmasının ortaya çıkarması amaçlanmıştır. İnhibitör TM varlığında koronavirüsün büyümesi, S proteininden yoksun, sivri uçsuz, bulaşıcı olmayan viryonların üretilmesiyle sonuçlanmıştır. TM'nin koronavirüslerin E2, S ve M glikoproteinlerini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. TM ayrıca HE ve 8 ab SARS-CoV gibi PTM'lerin glikosilasyonunu azaltmıştır. Sonuç olarak, antikanser ilacı olan TM'nin SARS-CoV-2'yi tedavi etmek için kullanılması önerilmiştir (151).

Shaoqun Shu ve ark.'larının 2020 yılında yaptığı çalışmada hem ER stresi hem de otofaji, kronik böbrek hasarı ve renal fibroz ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, bu koşul altında ER stresi ve otofaji arasındaki ilişki ve düzenleyici mekanizmalar büyük ölçüde bilinmediği söylenmiştir. Bu çalışmada, ilk olarak, klasik bir ER stres indükleyicisi olan düşük dozda TM haftalık 2 enjeksiyonuyla ER stresinin neden olduğu kronik böbrek hasarının bir fare modeli oluşturulmuştur. Bu model, böbrek dokularında ER stresi, otofaji, fibroz ve apoptoz indüksiyonunu göstermiştir. In vitro, TM ayrıca HK-2 insan böbreği proksimal tübüler hücrelerinde ve BUMPT-306 fare böbrek proksimal tübüler hücrelerinde ER stresi, otofaji, fibroz ve apoptozu indüklemiştir. Bu hücrelerde, otofaji inhibitörü, TM'nin neden olduğu fibrotik değişiklikleri ve apoptozu bastırmış, bu da otofajinin ER stresiyle ilişkili kronik böbrek hasarına dahil olduğunu düşündürmüştür. PERK inhibitörü, TM ile tedavi edilen hücrelerde otofajiyi, fibrotik protein ekspresyonunu ve apoptozu iyileştirmiştir; bu, ER stresi sırasında otofaji aktivasyonunda PERK/eIF2a yolunun bir rolünü göstermiştir. TGF-β1 ile tedavi edilmiş HK-2 hücrelerinde de benzer sonuçlar gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, hem TM- hem de TGF-

21 ile muamele edilmiş böbrek proksimal tübüler hücrelerinde, otofajinin inhibisyonu, ER stresini arttırmıştır, bu da ER stresinin neden olduğu otofajinin, stresi azaltmak için negatif bir geri bildirim mekanizması sağladığını düşündürmüştür. Elde edilen bu sonuçlar kronik böbrek hasarı ve fibrozda ER stresi ile otofaji arasında karşılıklı bir düzenleme olduğunu ortaya koymuştur (152).

Behnaz ve arkadaşları 2019 yılında; apoptoz İnhibitörü (IAP) proteinleri, ER stresine hücresel adaptasyonda yer aldığından, ER stres kaynaklı apoptozun, IAP proteinlerini antagonize eden kaspaz mimetiklerinin küçük moleküllü ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü tarafından düzenlenmesini araştırmışlardır. Burada, SMAC mimetiğinin, UPR ve ER stresinin çözülmesi yoluyla TM kaynaklı apoptozu baskıladığını keşfedilmiştir. BV6 gibi SMAC mimetikleri, protein *N*-glikosilasyonunun ilk adımını katalize eden enzim olan TM veya DPAGT1'in yıkılması kullanılarak protein *N*-glikosilasyonunun farmakolojik veya genetik inhibisyonuyla tetiklenen apoptozu seçici olarak inhibe etmektedir. Buna karşılık BV6, diğer tipik ER stresörleri (yani, thapsigargin (TG), dithiothreitol, brefeldin A, bortezomib veya 2-deoxyglucose) tarafından indüklenen hücre ölümünü durduramamıştır. TM ile tetiklenen apoptozdan koruma, yapısal olarak farklı SMAC mimetikleri için ve çeşitli kanser türlerinde hücresel IAP (cIAP) proteinlerinin genetik yıkımı için bulunmaktadır ve bu da daha geniş alaka düzeyini ortaya koyamamaktadır. İlginç bir şekilde, lektin mikrodizi profili, BV6'nın TM tarafından uygulanan protein glikosilasyon inhibisyonuna karşı koyduğunu ortaya koymuştur. BV6, glikozla düzenlenmiş protein 78 (GRP78) ve C/EBP homolog protein (CHOP) gibi TM ile uyarılan ER stres belirteçlerinin birikimini sürekli olarak ortadan kaldırmış ve protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK) fosforilasyonunu ve X kutusu bağlayıcı protein 1'i (XBP1) azaltır) TM işlemine eklemiştir. Nükleer faktör-κB'nin (NF-κB) BV6 ile uyarılmış aktivasyonu, ER stresinin çözülmesine katkıda bulunmuştur, çünkü baskın-negatif IκBa süper baskılayıcının aşırı ekspresyonu ile NF-κB inhibisyonu, CHOP ve GRP78'in BV6 tarafından TM ile uyarılmış transkripsiyonel aktivasyonunun baskılanmasına karşı koymuştur. Bu nedenle çalışmada SMAC mimetiğinin UPR ve ER stresini çözerek TM ile tetiklenen apoptozdan koruduğunu gösteren ilk çalışma olmuştur. Bu da SMAC mimetikleri tarafından hücresel stres tepkilerinin düzenlenmesine ilişkin yeni bilgiler sağlamıştır (153).

Tunikamisinler, nükleosit doğal ürünlerdir ve poliizoprenil fosfat ile UDP-GlcNAc veya UDP-MurNAcpentapeptid arasındaki enzimatik reaksiyonları inhibe etmelerine atfedilen antibakteriyel, antiviral ve antitümör aktiviteleri gösterirler. Çeşitli ilginç biyolojik aktiviteleri nedeniyle, tunikamisinler bulaşıcı hastalıklar veya kanserler için terapötik ajanlar olarak potansiyele sahiptir. Yapısal olarak, tunikamisinler, bir 1,1-β, α -trehaloz tipi glikosidik bağ ile

bağlanmış bir dekodialdoz iskeleti, bir lipid zinciri ve bir GlcNAc fragmanından oluşan benzersiz bir yapıya sahiptir (154).

HER2'yi hedefleyen hümanize bir monoklonal antikor olan Trastuzumab, HER2-pozitif meme kanserli kadınlar için klinik faydalar göstermiştir; ancak trastuzumab direnci en büyük klinik zorluk olmaya devam etmektedir. 2015 yılında yapılan bir çalışmada sonuçlar, bir N-glikosilasyon inhibitörü olan TM'nin, trastuzumabın HER2'yi aşırı eksprese eden meme kanseri hücrelerine karşı antitümör aktivitesini, hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükleyerek sinerjistik olarak arttırdığını göstermiştir. TM'nin trastuzumab ile kombine tedavisi, EGFR ailesinin ekspresyonunu ve bunun SKBR3 ve MCF-7/HER2 hücrelerinde aşağı sinyal yolunu önemli ölçüde azaltmıştır. TM hem SKBR3 ksenogreftlerinde hem de MCF-7/HER2 ksenogreftlerinde tümör büyümesini doza bağlı olarak inhibe etmiştir. Karaciğer dokusunda ER stresi oluşturmadan optimal TM, MCF-7/HER2 ksenogreftlerinde trastuzumabın antitümör etkisini önemli ölçüde artırmıştır. Elde edilen sonuçlar araştırmacılara Trastuzumabın N-glikosilasyon inhibitörleri TM ile kombinasyonlarının, trastuzumabın klinik etkinliğini iyileştirmek için umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmüştür (155).

Zübeyde ve ark.'larının 2021 yılında yapmış olduğu çalışmada; ince bağırsağın çeşitli yabancı maddelere maruz kaldığından, konakçının bağışıklık tepkisine katıldığı vurgulanmıştır. Kısa süreli TM tedavisinin ardından intestinal MAdCAM-1, PECAM-1 (CD31) ve CAV-1 ekspresyon seviyelerinin ER stresinden etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. İntraperitoneal olarak tek doz TM uygulaması yapılmıştır. 24 saat sonra Peyer yamaları ve villuslardaki MAdCAM-1, PECAM-1 ve CAV-1 ekspresyon seviyeleri immünohistokimya (IHC), immünofloresan (IF), western blotlama, immün boyama kullanılarak incelenmiştir. MAdCAM-1 ve CAV-1, kontrol ve TM ile muamele edilmiş Peyer yamaları ve villuslarda benzer lekelenme modelleri sergilemiştir. PECAM-1'in immünoreaktivitesi, kontrol ve TM ile tedavi edilen Payer yamaları için benzer bulunmuştur. TM ile tedavi edilen villuslarda ise boyama önemli ölçüde azalmıştır. Bulgular, kısa süreli TM tedavisinin ince bağırsağın lenfoid bölümlerine lökosit hareketini etkilemediğini, ancak PECAM-1 ekspresyonunun azalması nedeniyle villus mimarisini değiştirdiğini göstermiştir (156).

2019 yılında *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde yapılan çalışmada, yüksek Ozmolariteli Gliserol (HOG) yolunun bileşenleri, bu organelin lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesiyle ortaya çıkan ER stresi yanıtı dahil olmak üzere çeşitli streslere yanıt için önemli olduğu gösterilmiştir. Katlanmamış proteinlerin birikmesi, antibiyotik TM ile tedavi edilerek elde edilebilen protein *N*-glikosilasyonunun inhibisyonuna bağlı olabileceği söylenmiştir. Bu çalışmada, HOG yolunun mitojenle aktive edilmiş protein kinazı (MAPK) olan

Hog1 tarafından düzenlenen ER stres tepkisinde yer alan proteinleri bulma üzerine amaçlanılmıştır. Yüksek gen dozajı baskılama taraması, bir hog1D mutantı tarafından gösterilen TM'ye duyarlılığı baskılayan genlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bastırıcılar, lipid/karbonhidrat biyosentezi ve protein glikozilasyonu, vezikül aracılı taşıma ve ekzositoz, hücre duvarı organizasyonu ve biyogenez ve hücre detoksifikasyon süreçleri dahil olmak üzere sınırlı sayıda hücresel sürece katılmıştır. Dolikol biyosentez yoluna katılan baskılayıcı Rer2 ve Srt1'in bulunması, hog1D suşunun kusurlu bir poliprenol metabolizmasına sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma, Hog1'in yeni genetik ve işlevsel etkileşimcilerini ortaya çıkarmış ve bu MAPK'nın ER stres tepkisine katılımının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur (157).

Disfonksiyonel ER ve mitokondrilerin metabolik hastalık patolojisine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu hasar, kısmen, obezite gibi besin fazlalığı durumlarında ER-mitokondri çapraz konuşmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Labura ve ekibinin 2022 yılında yaptığı çalışmada, ER stresinin zayıf ve obez katılımcılardan alınan insan adipositlerinde mitokondriyal verimsizliğin gelişimine katkıda bulunup bulunmadığını araştırılmıştır. Chub-S7 hücre hattından insan farklılaştırılmış adipositleri ve zayıf ve obez katılımcılardan birincil abdominal subkutan adipositler, ER stresini indüklemek için TM ile tedavi edilmiştir. Mitokondriyal solunum, membran potansiyeli (MMP) ve dinamikler dahil olmak üzere mitokondriyal fonksiyonun temel parametreleri değerlendirilmiştir. ER stresi, bir model diposit sisteminde (Chub-S7 adipositler) konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde (24 saat: %23 ↑; 48 saat: %68 ↑, $P < 0.001$; 72 saat: %136 ↑) solunum kapasitesinin artmasına neden olmuştur, $P < 0.001$). Bu, mitokondriyal verimsizliğe ve azalmış MMP'ye karşılık gelmiştir ve işlevsiz mitokondri oluşumunu vurgulamıştır. Morfolojik analiz, mitokondriyal ağın yeniden düzenlendiğini, özellikle mitokondriyal parçalanmayı ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, fisyonda anahtar bir protein olan p-DRP1 önemli ölçüde arttırmıştır ($P < 0.001$). Ek olarak, obez deneklerden alınan adipositler daha düşük bazal solunum sergilemiştir (%49↓, $P < 0.01$) ve zayıf muadillerinin aksine TM'ye yanıt vermemişlerdir, bu da verimsiz mitokondriyal oksidatif kapasite göstermiştir. Bu veriler, adiposit mitokondriyal verimsizliğinin ER stresi tarafından yönlendirildiğini ve obezitede şiddetlendiğini göstermiştir. Besin fazlalığına bağlı ER stresi mitokondri disfonksiyonuna yol açmıştır, bu nedenle araştırma sonuçlarında lipit birikimini ektopik olarak değiştirebileceği ve dolayısıyla ilgili metabolik bozuklukların gelişimi üzerinde daha fazla etkisi olabileceği düşünülmüştür (158).

Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER da birikmesi, ER stresine neden olarak UPR aktivasyonuna neden olmaktadır. ER stresi ve UPR, birçok nörogelişimsel ve

nörodejeneratif bozuklukla ilişkilidir. Gelişmekte olan beyin, ER stresine neden olabilecek çevresel hakaretlere karşı özellikle hassastır. 2015 yılında Haiping ve ark.'ları, doğum sonrası farelerin beynindeki UPR'yi değerlendirmiştir. Yaygın olarak kullanılan bir ER stres indükleyicisi olan TM, doğum sonrası günler (PD'ler) 4, 12 ve 25. günlerdeki farelere deri altından uygulanmıştır. TM, PD4 ve PD12 farelerinin serebral korteks, hipokampus ve beyinciklerinde UPR'ye neden olmuş ve ATF6, XBP1'ler, p-eIF2a, GRP78, GRP94 ve MANF'yi arttırmıştır, ancak PD25 farelerinin beyninde UPR'yi indükleyememiştir. Karaciğerde TM ile indüklenen UPR tüm aşamalarda gözlenmiştir. PD4 farelerinde, parietal ve optik korteksin II. katmanında, CA1-CA3'te ve hipokampusun alt hücresinde, serebellar dış germinal katmanda ve superior/inferior kollikulusta TM kaynaklı kaspaz-3 aktivasyonu gözlenmiştir. TM kaynaklı kaspaz-3 aktivasyonu da PD12'de gösterilmiş, ancak çok daha düşük bir derecede ve esas olarak hipokampusun dentat girusunda, derin serebellar çekirdeklerde ve ponsta yer almıştır. TM, PD25 farelerinin beyninde ve karaciğerinde tüm evrelerde kaspaz-3'ü aktive etmemiştir. Benzer şekilde olgunlaşmamış serebellar nöronlar, kültürde TM kaynaklı hücre ölümüne duyarlıyken, in vitro olarak olgunlaştıkça dirençli hale gelmiştir. Bu sonuçlar, UPR'nin gelişimsel olarak düzenlendiğini ve olgunlaşmamış beynin ER stresine daha duyarlı olduğunu göstermiştir (159).

T, Tn, siyalil-T ve siyalil-Tn gibi basit müsin tipi karbonhidrat antijenlerinin anormal ekspresyonu, birçok kanserde kötü prognoz ile ilişkilidir. β3GlcNAcT ailesinin bir üyesi olan β1,3-N-asetilglukosaminiltransferaz-3 (B3GNT3), genişletilmiş çekirdek 1 (T antijeni) oligosakkaritlerinin oluşturulmasından sorumludur. İnsan fetal beyni de dahil olmak üzere çeşitli dokularda eksprese edilen B3GNT3'ün nöroblastoma oluşumu ve hücre davranışlarını düzenlemedeki rolü belirsizliğini korumaktadır. 2013 yılında Ho ve ark.'larının nöroblastoma tümör dokuları ile yaptıkları çalışmada, immünohistokimya kullanılarak değerlendirilen artan B3GNT3 ekspresyonunun, histolojik farklılaşma derecesi ve ayrıca Shimada'nın uygun bir patoloji alt kümesi ile iyi korele olduğunu gösterilmiştir. Tek değişkenli ve çok değişkenli analizler, tümör dokularında pozitif B3GNT3 ekspresyonunun, diğer prognostik belirteçlerden bağımsız olarak nöroblastoma hastalarında olumlu bir prognozu öngördüğünü ortaya koymuştur. B3GNT3 aşırı ekspresyonu, T antijen oluşumunu ve SK-N-SH (Nöroblastom hücre hattı) hücrelerinin göçü ve istilası dahil olmak üzere malign fenotipleri baskılarken, B3GNT3 yıkımı, nöroblastoma hücrelerinin bu fenotiplerini geliştirdiği bulunmuştur. Ayrıca B3GNT3 ekspresyonu, fokal adezyon kinaz (FAK), Src, paxillin, Akt ve ERK1/2'nin fosforilasyonunu azaltmıştır. B3GNT3'ün, nöroblastomanın olumlu bir kanser davranışını öngördüğü ve

nöroblastoma hücrelerinde müsin tipi O-glikosilasyon ve sinyallemeyi modüle ederek malign fenotipleri baskıladığı sonucuna varılmıştır (160).

Çalışmamızda TM grubunda B3GNT3 gen ekspresyonunda 13.914'lük relatif kat artışı meydana gelmiştir. Uygulama grubunda meydana gelen pozitif B3GNT3 ekspresyonunun, diğer prognostik belirteçlerden bağımsız olarak nöroblastoma hastalarının daha iyi hayatta kalmasını sağladığı düşündürmüştür. Spesifik glikosilasyon inhibitörleri, protein katlanması ve konformasyonu, oligomerizasyon, sınıflandırma, hücre-hücre etkileşimleri ve proteinlerin hücre içi veya hücre dışı bölgelere hedeflenmesi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde glikosilasyonun rolünü aydınlatmak amacı ile için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. *N*-bağlı glikosilasyon inhibitörü olan TM, glikoprotein sentezini birinci basamağında rol oynayan *N*-asetil glukosamin-1-fosfat transferazı inhibe ederek *N*-bağlı tüm glikoproteinlerin sentezini durdurmaktadır.

TM uygulamasına bağlı olarak hem 24 hem de 48 saatlik gruplarda kontrole göre artan B3GNT3 ekspresyon düzeyi Ho ve ark.'larının yapmış oldukları çalışma ile paralellik göstermektedir. Nöroblastom hücrelerinin yüksek glikozilasyon profillerinin devamının sağlanabilmesi amacıyla enzim ekspresyonunun artması, TM uygulamasına bağlı olarak hücrelerin adaptif bir cevabı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda B3GNT3 ekspresyon artışına bağlı olarak ERK ekspresyon seviyesinin 48 saatlik uygulama grubunda azalmış olması aynı çalışma ile benzerlik göstermektedir.

ST8SIA2 ve ST8SIA4, polySia'yı sentezleyen polisialil transferazları kodlar. ST8SIA2, fetal gelişim sırasında ve kanserde yüksek oranda ifade edilir, ancak yetişkin normal insan hücrelerinde ifade edilmemektedir. ST8SIA4, fetal ve yetişkin beyin, dalak, timus ve periferik kan lökositlerinde ve kanserde eksprese edilir. İnsan kanser hücre çizgileri ve tümörlerinin hücre yüzeyinde eksprese edilen ancak normal hücrelerde eksprese edilmeyen de-N-asetil nöraminik asit kalıntıları (dPSA) içeren bir polySia türevinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, dPSA'nın, kanserin hücre yüzeyinde olduğu ancak normal hücrelerde olmadığı bildirilen bir nükleer protein olan nükleolin ile bağlantılı veya ilişkili olduğu bulunmuştur. ST8SIA2 ekspresyonunun RNAi ile yok edilmesi veya CRISPR kullanılarak her bir genin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde yok edilmesi, hücre yüzeyi dPSA'nın ST8SIA2 ekspresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (161).

Çalışmamızda TM uygulamasına bağlı olarak hem 24 hem de 48 saatlik gruplarda kontrole göre artan ST8SIA2 ekspresyon düzeylerinin nöroblastom hücrelerinin yüksek sializasyon profillerinin devamının sağlanabilmesi amacıyla, TM uygulamasına bağlı olarak hücrelerin adaptif bir cevabı olarak değerlendirilmiştir.

KRAS, NRAS ve HRAS dahil olmak üzere RAS ailesi protoonkogenleri, birçok hücre tipinin büyümesinin, farklılaşmasının ve hayatta kalmasının düzenlenmesinden sorumlu proteinleri kodlar. HRAS ve KRAS onkojen mutasyonları iyi tanımlanmıştır, ancak bazı kanser türlerinde RAS ifadelerinin klinik önemi hala belirsizdir. Milena ve ark. 2021 yılında, tanı anında, ameliyattan 100 gün sonra ve ameliyattan 1 yıl sonra olmak üzere üç noktada toplanan toplam 39 küçük hücreli akciğer kanserli hastalardan (KHDAK) alınan tam kan örneği (incelenen grup) ve ameliyat sırasında alınan 35 doku örneği ile çalışma yapmışlardır. Çalışmada HRAS ve KRAS genleri mRNA ekspresyonu, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu teknikleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Kanda rölatif HRAS mRNA düzeyi artışı sigara içen grupta anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p = 0,008$). NSCLC'nin skuamöz hücreli karsinom alt tiplerine sahip hastaların kanda HRAS geninin aşırı ekspresyonunu gösterme olasılığı daha yüksek olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p = 0.065$). Tümör dokusunda HRAS geninin aşırı ekspresyonu, adenokarsinom alt tipi ile ilişkilendirilmiştir ($p = 0.049$). Çalışmada hastaların yaşı dışında herhangi bir klinikopatolojik parametre ile KRAS ekspresyonu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Aynı hastalardan 3 gözlem noktasında alınan kan örneklerinde ve ayrıca hastalardan ameliyat öncesi alınan kan ile ameliyat sırasında alınan doku örneklerinde rölatif HRAS ve KRAS genleri ekspresyon seviyeleri arasında fark çıkmamıştır. Yüksek HRAS ekspresyon seviyeleri, yaş, sigara içme durumu ve histolojik kanser türü arasındaki potansiyel ilişkiler gözlemlenmiştir, bu da RAS ailesinin daha fazla çalışılması gereğini düşündürmüştür. Bu nedenle, araştırmacılar bulguları doğrulamak için daha fazla sayıda hasta ve daha uzun takip içeren sonraki araştırmaların yanı sıra çok merkezli çalışma gerekli olduğunu söylemiştir (162).

Çalışmamızda SH-SY5Y hücre hattında HRAS ve KRAS genleri ekspresyon seviyeleri TM uygulamasına bağlı olarak HRAS ekspresyon düzeyinde 48 saatlik grupta, KRAS ekspresyon düzeyinin ise 24 saatlik grupta kontrol grubuna göre yüksek olması hücrelerin proliferatif etkinliği üzerine araştırılan süre ve dozda olumsuz prognoz gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda N- bağlı glikozilasyon inhibitörü olduğu bilinen TM'nin insan nöroblastom SH-SY5Y hücre hattında, mitojenik aktiviteleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmiştir. Hücre yüzeyi glikosilasyon profillerinin, inhibitör moleküller aracılığıyla değiştirilmesi ve bu moleküllerin etkin rollerinin birçok hastalıkta önem arz eden glikozilasyon mekanizmaları üzerindeki etkilerinin aydınlatılması büyük bir öneme sahiptir. Tümör hücrelerinin yüzey glikanlarında meydana gelen değişimler, bu hücrelerin metastaz potansiyelinde değişikliklere yol açmaktadır. Bu nedenle glikozilasyonda meydana gelen

değişiklerin belirlenmesi hem tanının konması hem de tedavinin şekillendirilmesinde önem teşkil etmektedir. Glikozilasyon, protein ve lipitlerde yapısal çeşitlilik oluşturmak için en sık gözlenen translasyon sonrası değişikliktir. Bu değişimler hücrelerin birbirini ve patojenleri tanımasında, hücreler arası iletişimde ve yapışmada önemli rolü olan zincirlerin oluşumda önemlidir. Glikozil transferazlar glikozilasyondaki rolleri nedeniyle son derece önem taşıyan enzim ailesi olmuştur. Bu nedenle kanserli hastaların dolaşım sisteminde bulunan Glikozil transferaz düzeyleri üzerine olan araştırmalara olan ilgi artmıştır (163). Literatür taramalarımızda; glikozilasyonda görülen değişimlerin temel nedeni olarak, kanserli hücrelerde ve dokularda Glikozil transferazlar'ın ifadesindeki artış gösterilmektedir. Glikozil transferazlar özellikle, ER zarında bulunan ve golgi aygıtından karbonhidrat bakiyelerinin transferi sırasında onlara yeni zincirlerin eklemesinden sorumludurlar. Kanserli dokularda Glikozil transferaz düzeyleri yoğun olarak incelenmiş ve transkripsiyonel olarak onkogenik bir transformasyona uğradıkları görülmüştür. Sialik asitin post-translasyonel ilavesine sialiltransferazlar aracılık etmektedir ve polisialilasyon (α-2,8-bağlı sialik asit bakiyelerinin ilavesi) üç enzim tarafından katalize edilimektedir. Bu enzimler ST8SIA2 (STX), ST8SIA4 (PST) ve ST8SIA3'dür. Hücresel yapışmada rol oynayan polisialik asit ve ekspresyonundan sorumlu olan enzim sialiltransferaz ST8SIA2 nöroblastomanın ilerlemesi ve kötü prognozu ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalar tümör belirteçleri ve potansiyel moleküler hedefler olarak farklı glikosiltransferazların rol aldığını göstermiştir. Çalışmamızda, özellikle 48 saatte ST8SIA2 geninde TM grubunda meydana gelen 108.323'lik relatif kat artış, nöroblastom hücrelerinin ER stresine karşı savunma gösterdiğini göstermektedir.

GnT-V, tümör istilası ve metastazı ile ilişkili en önemli glikosiltransferazlardan biridir (164). Çalışmamızda, kontrol grubuna göre, 24 saatlik TM grubunda azalan GnT-V mRNA ekspresyonu, olumlu prognoz doğrultusunda değerlendirilmiştir. 24 saatlik TM grubunda GnT-V ve GALNACT3 ekspresyon düzeylerinin azalması, TM uygulamasına bağlı olarak glikozilasyon düzeylerinin engellenmesine yönelik olumlu bir veri olarak belirlenmiştir. Bu enzimlerin ekspresyon düzeylerindeki azalma aynı zamanda 24 saatlik TM grubunda proteinlerin modifikasyonlarının engellenmesinden dolayı ER stresinin indüklenebileceğine dair önemli bir sonuç olarak düşünülmektedir.

Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerine TM uygulanmasının, ER'de yanlış katlanmış veya katlanmamış glikoproteinlerinin birikimine yol açarak ER stresine neden olduğu belirlenmiştir.

Bu anlamda SHSY5Y, hücre hattında transkripsiyon sonrası modifikasyonun olarak değerlendirilen glikozilasyon mekanizmasının, TM uygulamasına bağlı olarak SHSY5Y hücrelerinin prognozunu etkilediği belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçların

literatür taramalarıyla uyum sağladığı ve yapılacak detaylı çalışmaların değerlendirmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

SONUÇLAR

Endoplazmik redikulum stresi inhibitörü olarak bilinen Tunikamisin'nin SH-SY5Y hücre hattında glikolizasyonla ilgili genlerin araştırıldığı çalışmanın sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

1. SH-SY5Y hücre hatlarında TM uygulamasının 24 saatlik uygulama süresi sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile saptanmış ve bunun sonucunda uygulanan TM dozlarının 24 saatlik sürede, en yüksek doz olan 50 µM'lık dozda yaklaşık %61 ölüm olduğu belirlenmiştir. Ancak 48 saatlik uygulamada uygulanan doz aralığında herhangi bir etki saptanmamıştır.
2. Çalışmada TM uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben yapılan probit analiziyle 24. saatte hücrelerin IC_{50} değeri 7.746 µM olarak hesaplanmıştır. 48. Saatte hücrelerin IC_{50} değeri 91.477 µM olarak belirlenmiştir.
3. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, ST8SIA2 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-75,920) (p<0,005). TM grubunda, ST8SIA2 geni relatif kat değişimi (N=22.007), kontrol grubuna göre daha fazladır. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda ST8SIA2 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=-117.892) (p<0,005). TM grubunda ST8SIA2 geni relatif kat değişimi (N=108.323), kontrol grubuna göre daha fazladır.
4. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, GnT-V geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=55.630) (p<0,005). TM grubunda GnT-V geni relatif kat değişimi

(N=0.186), kontrol grubuna göre daha düşüktür. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, GnT-V geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

5. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, GALNACT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=1112.817) (p<0,005). Bu grupta GALNACT3 geni relatif kat değişimi (N=0.025), kontrol grubuna göre daha düşüktür. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, GALNACT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;3,006=-15.434) (p<0,005). 48 saatlik TM grubunda, GALNACT3 geni relatif kat değişimi (N=1.9737), kontrol grubuna göre daha yüksektir.
6. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, B3GNT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-109.035) (p<0,005). 24 saatlik TM grubunda, B3GNT3 geni relatif kat değişimi (N=8.071), kontrol grubuna göre daha yüksektir. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, B3GNT3 geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2.003=-18.745) (p<0,005). 48 saatlik TM grubunda, B3GNT3 geni relatif kat değişimi (N=13.914), kontrol grubuna göre daha yüksektir.
7. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, K-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-207.690) (p<0,005). 24 saatlik TM grubunda, K-RAS geni relatif kat değişimi (N=2.022), kontrol grubuna göre daha yüksektir. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, K-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.
8. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, H-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark bulunmamıştır (t0.05;2=-5.812) (p=0,028). Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, H-RAS geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-1.451) (p<0,005). 48 saatlik TM grubunda, K-RAS geni relatif kat değişimi (N=62.564), kontrol grubuna göre daha yüksektir.
9. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, RAF geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=58.322) (p<0,005). 24 saatlik TM grubunda, RAF geni relatif kat değişimi

(N=0.284), kontrol grubuna göre daha düşüktür. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, RAF geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-7.151) (p<0,005). 48 saatlik TM grubunda, RAF geni relatif kat değişimi (N=2.480), kontrol grubuna göre daha düşüktür.

10. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, MEK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;2=-12.850) (p<0,005). 24 saatlik TMgrubunda MEK geni relatif kat değişimi (N=6.625), kontrol grubuna göre daha yüksektir. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, MEK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmamıştır.
11. Kontrol ve 24 saatlik TM grubunda, ERK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=-12.850) (p<0,005). 24 saatlik TM grubunda, ERK geni relatif kat değişimi (N=10.141), kontrol grubuna göre daha yüksektir. Kontrol ve 48 saatlik TM grubunda, ERK geninin relatif kat artışları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yapılan t testinde iki grup arasında fark olduğu saptanmıştır (t0.05;4=20.712) (p<0,005). Kontrol grubunda ERK geni relatif kat değişimi (N=1.043), 48 saatlik 48 saatlik TM grubundan daha yüksektir.
12. 24 sattelik TM grubunda, ST8SIA2, B3GNT3, K-RAS, MEK, ERK gen ifadelerinde SH-SY5Y hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir (p<0.0005). Bu ekspresyon düzeyinde meydana gelen artışların, TM'in neden olduğu ER stresine karşı bir yanıt olabileciğini düşündürmektedir.

ÖZET

Nöroblastom, çocuk döneminde görülen ekstrakraniyal solid bir tümördür. Çocuklarda görülen tümörler arasında yaygın oranda görülmesi ve agresif prognozu nedeni ile oldukça önemlidir. Hücre yüzeyinde meydana gelen glikosilasyon değişiklikleri pek çok hastalığın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde önemlidir. Tümör hücreleride gözlemlenen bu değişiklikler glikozilasyonda rol oynayan glikosiltransferazların ve glikosidazların ekspresyon seviyelerinde veya aktivitesinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Spesifik glikosilasyon inhibitörleri, biyolojik süreçlerde glikosilasyonun rolünü aydınlatmak amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Çalışmamızda, N-bağlı glikozilasyon inhibitörü olduğu bilinen Tunikamisin'in SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik süre ile uygulanmıştır. 24 saatlik MTT sonuçlarında tunikamisinin dozu 7.746 µM, 48 saatte ise 91.477 µM bulunmuştur. Tunikamisin uygulanmış deney gruplarında α-2,8-sialiltransferaz 8B, β1,6-*N*-asetilglukozaminiltransferaz V, *N*-Asetilgalaktozaminiltransferaz 3, β1,3-N-asetilglukosaminiltransferaz-3 ile K-RAS proto-onkogen, H-RAS proto-onkogen, Raf-1 proto-onkogen Serin/Treonin Kinaz, Mitojen aktifleştiren kinaz ve hücre dışı sinyalin aktiflediği kinazların, gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Tunikamisin'in, SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde glikolizasyon enzim düzeyleri üzerine farklı etkilere sahip olduğunu görülmüştür. 24 saatlik Tunikamisin grubunda β1,6-*N*-asetilglukozaminiltransferaz V ve *N*-Asetilgalaktozaminiltransferaz 3 ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azaldığı görülmüştür. Alfa-2,8-sialiltransferaz 8B ve β1,3-N-asetilglukosaminiltransferaz-3 ekspresyonları her iki deney grubunda da kontrole göre yüksek bulunmuştur. Bu anlamda SH-SY5Y, hücre hattında Tunikamisin'in glikozilasyon mekanizması üzerinde etkili olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Glikolizasyon, Tunikamisin, Endoplazmik Redikulum Stresi, Nöroblastoma

EVALUATION OF PROGNOSTIC ROLES OF GLYCOSYLTRANSFERASES IN HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE

SUMMARY

Neuroblastoma, a solid extracranial tumor that commonly affects children, Its high prevalence among pediatric tumors and aggressive prognosis make it extremely significant. The emergence and development of many diseases are largely dependent on changes in glycosylation that take place on the cell surface. These modifications are due to changes in the expression levels or activities of the glycosyltransferases and glycosidases, which are involved in glycosylation, in tumor cells. The use of specific glycosylation inhibitors to define the role of glycosylation in biological processes is too common. In our study, Tunicamycin, known to be an N-linked glycosylation inhibitor, was applied on the SH-SY5Y cell line for 24 and 48 hours. In the 24-hour results, the dose of tunicamycin was 7,746 μM, and 91,477 μM in 48 hours. The levels of expression in the Tunicamycin group of 2,8-sialyltransferase 8B, 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V, N-Acetylgalactosaminyltransferase 3 and 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-3, as well as the proto-oncogenes K-RAS, H-RAS, Raf-1, Mitogen-Activated Kinase and Extracellular Signal-Activated Kinases, were investigated by qRT-PCR. At 24 and 48 hours after administration, Tunicamycin was found to have different effects on the glycosylation enzyme levels in the SH-SY5Y cell line. When compared to the control group, the expression levels of 1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase V and N- acetyl galactosaminyltransferase 3 were lower in the 24-hour Tunicamycin group.

The expression levelsof 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-3 and α-2,8 sialyltransferase 8B was higher in both experimental groups compared to the control. In this sense, it has been determined that in the SH-SY5Y cell line, Tunicamycin treatment may be effective in the glycosylation mechanism.

Keywords: Cancer, Glycolization, Tunicamycin, Endoplazmic Rediculum Stress, Neuroblastoma

KAYNAKLAR

1. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat Rev Cancer 2006 Dec;6(12):924-35. doi: 10.1038/nrc2013. Epub 2006 Nov 16. PMID: 17109012.

2. Burgio E, Migliore L. Towards a systemic paradigm in carcinogenesis: linking epigenetics and genetics. Mol Biol Rep 2015 Apr;42(4):777-90. doi: 10.1007/s11033-014-3804-3. PMID: 25387435.

3. Cooper GM, Hausman RE. The cell, a molecular approach. Third Edition, ASM Press, Washington USA 2004;s 631-32.

4. Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. Toxicology 2001 Sep 14;166(1-2):3-10. doi: 10.1016/s0300-483x(01)00442-5. PMID: 11518605.

5. Yokuş B, Çakır ÜD. Kanser Biyokimyası.Dicle Üniv. Vet.Fak. Derg.2012; 1(2):7-18.

6. Zhang L, Plon SE, Nuchtern JG, Burlingame S, Blaney S, Rousseau R, et al. Cyclin D and cisplatin cytotoxicity in primary neuroblastoma cell lines. Anticancer Drugs 2004; 15(9):883-8.

7. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et. al. Molecular cell biology. 6th. Edititon. W.H. Freeman and Company, New York USA 2008;s1107-08.

8. Lüleyap HÜ. Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitabevi, Adana 2008;s262-316.

9. Klug WS, Cummings MR. Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara 2002;28,s635-651.

10. Maris JM. The biological basis for neuroblastoma heterogeneity and risck stratification. Current opinion in pediatrics 2005;17:7-13.

11. Demirkaya M, Sevinir B. Nöroblastom. Güncel Pediatri 2006;3:128-132.

12. Levin B, Boyle P. Dünya Kanser Raporu, Dünya Sağlık Örgütü Raporu, Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) 2008;69372 Lyon Cedex 08, Fransa.

13. Olshan AF, De Roos AJ, Teschke K, Neglia JP, stram DO, Pollock BH, Castlebery RP. Neuroblastoma and parental occupation. Cancer Causes Control 1999;10:539- 49.

14. Matthey KK, George RMD, Yu LA. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. Clin Cancer Res 2012;18(10):2740–2753.

15. Varki, A. Biological roles of glycans. Glycobiology 2017;27, 3–49.

16. Varki, A. et al. Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. Glycobiology 2015;25,1323–24.

17. Laine, RAA calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05 × 10(12) structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. Glycobiology 2014;4,759–67.

18. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. Glycobiolog 2012;12,43R–56R.

19. Wang YC, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. Cell Res 2014;24(2):143-60. doi: 10.1038/cr.2013.151.

20. Gagneux P. & Varki A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. Glycobiology 1999;9,747–55.

21. Stanley P, Taniguchi N & Aebi M. in Essentials of Glycobiology (ed. Varki, A. et al.) 2012;99–111.

22. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. Science 2001;23;291(5512):2364-9. doi: 10.1126/science.291.5512.2364.

23. Brockhausen I. & Stanley P. In Essentials of Glycobiology (ed. Varki, A. et al.) 2017;113–23.

24. Bennett EP. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. Glycobiology 2012;22,736–56.

25. Vasudevan D. & Haltiwanger RS. Novel roles for O-linked glycans in protein folding. Glycoconjugates Journal 2014;31,417–26.

26. Zachara N, Akimoto Y & Hart GW. In Essentials of Glycobiology (ed. Varki, A. et al.) 2017;239–51.

27. Van der Laarse SAM, Leney AC. & Heck AJR. Crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAcylation: friend or foe. FEBS Journal 2018;285,3152–67.

28. Chiaradonna F, Ricciardiello F. & Palorini R. The nutrient-sensing hexosamine biosynthetic pathway as the hub of cancer metabolic rewiring. Cells 2018;7,E53.

29. Manya H. & Endo T. Glycosylation with ribitol-phosphate in mammals: new insights into the O-mannosyl glycan. Biochim. Biophys. Acta 2017;1861,2462–72.

30. Lukose V, Walvoort, MTC & Imperiali B. Bacterial phosphoglycosyl transferases: initiators of glycan biosynthesis at the membrane interface. Glycobiology 2017;27,820–33.

31. Handwiki, "O-Linked Glycosylation." Encyclopedia Web 25 November,2022.

32. Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. J. Cell Sci 1999;112,2799–809.

33. Schnaar RL & Kinoshita T. In essentials of glycobiology (ed. Varki, A. et al.) 2017;125-35.

34. Iozzo RV. & Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature oföproteoglycans. Matrix Biol 2015;42,11–55.

35. Lindahl U, Couchman J, Kimata K. & Esko JDO. In essentials of glycobiology (ed. Varki, A. et al.) 2017;207–21.

36. Ferreira IG. Glycosylation as a main regülatör of growth and death factor receptors signaling. Int. J. Mol. Sci 2018;19,E580.

37. Schultz MJ. ST6Gal-I sialyltransferase confers cisplatin resistance in ovarian tumor cells. J. Ovarian Res. 2013;6,25.

38. Schultz MJ. The tumor-associated glycosyltransferase ST6Gal-I regulates stem cell transcription factors and confers a cancer stem cell phenotype. Cancer Res 2016;76,3978–3988.

39. Nairn AV. Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: combined transcript profiling of glycan-related genes and glycan structural analysis. J. Biol. Chem 2012;287,37835–56.

40. Holmes EH, Ostrander GK, Clausen H. & Graem N. Oncofetal expression of Lex Carbohydrate antigens in human colonic adenocarcinomas. Regulation through type 2 core chain synthesis rather than fucosylation. J. Biol. Chem 1987;262,11331–38.

41. Pinho SS. & Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nat. Rev. Cancer 2015;15,540–55.

42. Hakomori S. Tumor-associated glycolipid antigens defined by monoclonal antibodies. Bull. Cancer 1983;70,118–26.

43. Oliveira-Ferrer L, Legler K. & Milde-Langosch K. Role of protein glycosylation in cancer metastasis. Semin. Cancer Biol 2017;44,141–52.

44. Kunzke T. Native glycan fragments detected by MALDI-FT-ICR mass spectrometry imaging impact gastric cancer biology and patient outcome. Oncotarget 2017;8,68012–25.

45. Tsai CH. Metastatic progression of prostate cancer is mediated by autonomous binding of galectin4-O-glycan to cancer cells. Cancer Res 2016;76,5756–67.

46. Zhan L, Chen L. & Chen Z. Knockdown of FUT3 disrupts the proliferation, migration, tumorigenesis and TGFβ induced EMT in pancreatic cancer cells. Oncology Letters 2018;16,924.

47. Chugh S, Meza J, Sheinin YM, Ponnusamy MP. & Batra SK. Loss of N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in poorly differentiated pancreatic cancer: augmented aggressiveness and aberrant ErbB family glycosylation. Br. J. Cancer 2016;114,1376–86.

48. Tzeng SF. O-Glycosylation-mediated signaling circuit drives metastatic castration-resistant prostate cancer. FASEB Journal 2018;32,fj201800687.

49. Vojta A, Samarzija I, Bockor L. & Zoldos V. Glyco-genes change expression in cancer through aberrant methylation. Biochim. Biophys Acta 2016;1860,1776–85.

50. Muller S. High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells. J. Biol. Chem 1999;274,18165–72.

51. Hanson RL. & Hollingsworth MA. Functional consequences of differential O-glycosylation of MUC1, MUC4, and MUC16 (downstream effects on signaling). Biomolecules 2016;6,E34.

52. Apostolopoulo V. & McKenzie, IFC. Cellular mucins: targets for immunotherapy. Crit. Rev. Immunology 2017;37,421–37.

53. Chou CH. Up-regulation of C1GALT1 promotes breast cancer cell growth through MUC1-C signaling pathway. Oncotarget 2015;6,6123–35.

54. Sewell R. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. J. Biol. Chem 2006;281,3586–94.

55. Gill DJ, Chia J, Senewiratne J. & Bard F. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. J. Cell Biology 2010;189,843–58.

56. Dalziel M. The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. J. Biol. Chem 2001;276,11007–15.

57. Gill DJ, Clausen H. & Bard F. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. Trends Cell Biology 2011;21,149–58.

58. Reis CA, David L, Seixa M, Burchell J. & Sobrinho-Simoes M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. Int. J. Cancer 1998;79,402-10.

59. David L, Nesland JM., Clausen, Carneiro F. & Sobrinho-Simoes M. Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases. APMIS Suppl 1992;27,162–72.

60. Saeland E. The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. Cancer Immunol. Immunother 2007;56,1225–36.

61. Nath D. Macrophage-tumour cell interactions: identification of MUC1 on breast cancer cells as a potential counter-receptor for the macrophage-restricted receptor, sialoadhesin. Immunology 1999 98,213–19.

62. Cascio S & Finn OJ. Intra- and extra-cellular events related to altered glycosylation of MUC1 promote chronic inflammation, tumor progression, invasion, and metastasis. Biomolecules 2016;6,E39.

63. Charpin C, Bhan AK, Zurawski VRJr & Scully RE. Carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate determinant 19–19 (CA 19–19) localization in 121 primary and metastatic ovarian tumors: an immunohistochemical study with the use of monoclonal antibodies. Int. J. Gynecological Pathology 1982;1,231–45.

64. Steele GJr. CEA monitoring among patients in multi-institutional adjuvant G. I. therapy protocols. Ann. Surg 1982;196,162–69.

65. Frenette PS. The diagnostic value of CA 27–29, CA 15–13, mucin-like carcinoma antigen, carcinoembryonic antigen and CA 19–19 in breast and gastrointestinal malignancies. Tumour Biology 1994;15,247–54.

66. Cerwenka H. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions. Anticancer Research 1992;19,849–51.

67. Guadagni F. TAG-72 (CA 72–74 assay) as a complementary serum tumor antigen to carcinoembryonic antigen in monitoring patients with colorectal cancer. Cancer 1993;72, 2098–106.

68. Marrelli D. Clinical utility of CEA, CA 19–19, and CA 72–74 in the follow-up of patients with resectable gastric cancer. Am. J. Surg 2001;181,16–19.

69. Magnani JL. A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. J. Biol. Chem 1982;257,14365–69.

70. Narimatsu H. Lewis and secretor gene dosages affect CA19-9 and DU-PAN-2 serum levels in normal individuals and colorectal cancer patients. Cancer Res 1998;58,512–18.

71. Kudo T. Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. Lab. Invest 1998;78,797.

72. Wilson DF. & Massey W. Scanning electron microscopy of incinerated teeth. Am. J. Forensic Med. Pathol 1987; 8,32–38.

73. Lise M. Clinical correlations of α2, 6-sialyltransferase expression in colorectal cancer patients. Hybridoma 2000;19,281–86.

74. Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm, B. & Heitz, P. U. Expression of α2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. Am. J. Pathology 1991;139,1435-48.

75. Zhao Y. Modification of sialylation mediates the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma. Mol. Cell. Proteomics 2014;13,520–36.

76. Park JJ. & Lee M. Increasing the α2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. Gut Liver 20137, 629–41.

77. Chakraborty A. ST6Gal-I sialyltransferase promotes chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma by abrogating gemcitabinemediated DNA damage. J. Biol. Chem 2018;293,984–94.

78. Contessa JN, Bhojani MS, Freeze HH, Rehemtulla A, and Lawrence TS. Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. Cancer Res 2008;68,3803–9.

79. Kaszuba K, Grzybek M, Orlowski A, Danne R, Rog, T, Simons K, et. al. N-Glycosylation as determinant of epidermal growth factor receptor conformation in membranes. Proc. Natl. Acad. Sci USA 2015;112,4334–9.

80. Liu YC, Yen HY, Chen CY, Chen CH, Cheg, PF, Juan YH, et al. Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA 2011;108,11332–7.

81. Mereiter S, Polom K, Williams C, Polonia A, Guergova-Kuras M, Karlsson NG, et. al. The Thomsen- Friedenreich antigen: a highly sensitive and specific predictor of microsatellite instability in gastric cancer. J. Clin. Med 2018;7. https://doi.org/10.3390/ jcm7090256.

82. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold V, Demetriou M, et. al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. Cell 2007;129,123–4.

83. Chugh S, Meza J, Sheinin YM, Ponnusamy MP, and Batra SK. Loss of N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in poorly differentiated pancreatic cancer: augmented aggressiveness and aberrant ErbB family glycosylation. Br. J. Cancer 2016;114,1376–86.

84. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, and Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. Glycobiology 2012;22,736–56.

85. Julien S, Bobowski M, Steenackers A, Le Bourhis X, and Delannoy P. How do gangliosides regulate RTKs signaling?. Cells 2013;2,751–67.

86. Shintani Y, Takashima S, Asano Y, Kato H, Liao Y, Yamazaki S, et al. Glycosaminoglycan modification of neuropilin-1 modulates VEGFR2 signaling. EMBO J. 2006;25,3045–55.

87. Hang Q, Isaji T, Hou S, Zhou Y, Fukuda T, and Gu J. N-Glycosylation of integrin alpha5 acts as a switch for EGFR-mediated complex formation of integrin alpha5beta1 to α-6β-4. Sci. Rep 2016;6,33507.

88. Paszek MJ, DuFort CC, Rossier O, Bainer R, Mouw JK, Godula K, et al. The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. Nature 2014;511,319-25.

89. Pinho S, and Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nat. Rev. Cancer 2015;15,540–55.

90. Hou S, Hang Q, Isaji T, Lu J, Fukuda T, and Gu J. Importance of membrane-proximal N-glycosylation on integrin beta1 in its activation and complex formation. FASEB 2016;30,4120–31.

91. Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, and Bellis SL. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. Cancer Research 2005;65,4645–52.

92. Isaji T, Im S, Kameyama A, Wang Y, Fukuda, T, and Gu JA complex between phosphatidylinositol 4-kinase IIalpha and integrin alpha3beta1 is required for N-glycan sialylation in cancer cells. J. Biol. Chem 2019;294,4425–36.

93. Jones RB, Dorsett KA, Hjelmeland AB, and Bellis SL. The ST6Gal-I sialyltransferase protects tumor cells against hypoxia by enhancing HIF-1alpha signaling. J. Biol. Chem 2018;293,5659–67.

94. Jacob F, Alam S, Konantz M, Liang CY, Kohler RS, Everest-Dass AV, et al. Transition of mesenchymal and epithelial cancer cells depends on alpha1-4 galactosyltransferase-mediated glycosphingolipids. Cancer Research 2018;78,2952–65.

95. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, et. al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. Science 2004;306,120–4.

96. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signaling at the vascular wall. Cardiovasc. Research 2015;107,331–9.

97. Esposito M, Mondal N, Greco TM, Wei Y, Spadazzi C, Lin SC, et al. Bone vascular niche E-selectin induces mesenchymal-epithelial transition and Wnt activation in cancer cells to promote bone metastasis. Nat. Cell Biology 2019;21,627–39.

98. Roseman S. Reflections on glycobiology. J Biol Chem 2001;276:41527–42.

99. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. Glycosyltransferases: Structures, functions, and mechanisms. Annu Rev Biochem 2008;77:521–55.

100. Rini JM, Moremen KW, Davis BG, Glycosyltransferases and glycan-processing enzymes. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY) 2022.

101. Çebi A. Mide Kanserli Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrası Bazı Tümör Markerleri, Akut Faz Proteinleri, Sialik Asit ve Lipit Bağlı Sialik Asit Seviyelerinin Değerlendirilmesi (tez). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi 2007.

102. Tuna E. Pankreas Kanserin Tanı ve Tedavisinde, İmmünoterapötik Hedef Olabilecek Sialik Asit Moleküllerinin ve Sialiltransferaz Enzimlerinin Belirlenmesi (tez). İzmir: Ege Üniversitesi 2021.

103. Zhou X, Yang G, Guan F. Biological functions and analytical strategies of sialic acids in tumor. MDPI Journal 2020;9(273).

104. Schauer R, Kamerling JP. Exploration of the sialic acid world. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 2018;75,124-8.

105. İliklerden ÜH. Kolon Kanserli Hastalarda Preoperatif ve Postoperatif Total Serum Sialik Asit Düzeylerinin İncelenmesi (tez). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi 2004.

106. Paulson JC, Rademacher C. Glycan terminator. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(11):1121-2. doi: 10.1038/nsmb1109-1121. PMID: 19888308; PMCID: PMC2838401.

107. İnan C. Amsacta Mooreı Entomopoxvırus Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin (AMV248) Yapısal ve Fonksiyonel Analizi (tez). Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi 2016.

108. Korkut S. Kolorektal Kanserlerde Metastatik Fenotipin Göstergesi Olarak Sialiltransferazların Rolü ve Klinikopatolojik Özellikleri (tez). İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi 2017.

109. Türker P, Bakar E. Kanser metabolizmasında ve metastazında glikanların önemi. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2021;(6)2: 145-61.

110. Güngör N. Parkinson Hastalığı ve Sialik Asit (tez). Ankara: ankara Üniversitesi; 2014.

111. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, and Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. Science 2008;319,916–9. doi: 10.1126/science.1141448.

112. Ben-Zvi A, Miller, E. A., and Morimoto, R. I. Collapse of proteostasis represents an early molecular event in Caenorhabditis elegans aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009; 106, 14914–14919. doi: 10.1073/pnas.0902882106.

113. Hou NS, and Taubert S. Membrane lipids and the endoplasmic reticulum unfolded protein response: an interesting relationship. Worm 2014;3:e962405.

114. Novick P, Ferro S, and Schekman R. Order of events in the yeast secretory pathway. Cell 1981;25,461–9.

115. Werner ED, Brodsky JL, and McCracken AA. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996;93,13797–801.

116. Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, and Sommer TA regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. Nat. Cell Biology 2000;2,379–84.

117. Walter P, and Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. Science 2011;334,1081–6.

118. Karagöz GE, Acosta-Alvear D, and Walter P. The unfolded protein response: detecting and responding to fluctuations in the protein-folding capacity of the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb. Perspect. Biology [Epub ahead of print] 2019.

119. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev 1998;12, 982–95.

120. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson, B., et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. Science 2016;312,572–6.

121. Upton JP, Wang L, Han D, Wang ES, Huskey NE, Lim L, et al. IRE1α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. Science 2012;338,818–22. doi: 10.1126/science.1226191.

122. Verghese J, Abrams J, Wang Y, and Morano KA. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (Saccharomyces cerevisiae) as a model system. Microbiol. Mol. Biol. Rev 2012;76,115–58. doi: 10.1128/mmbr.05018-11.

123. Kohno, Normington, K, Sambrook J, Gething MJ, and Mori K. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Mol. Cell. Biology 1993;13,877–90. doi: 10.1128/MCB.13.2.877.

124. Cox JS, and Walter PA novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. Cell 1996;87,391–04. doi:10.1016/s0092-8674(00)81360-4.

125. Liu Y, and Chang A. Heat shock response relieves ER stress. EMBO 2008;27,104959. doi: 10.1038/emboj.2008.42.

126. Ruis H, and Schüller C. Stress signaling in yeast. Bioessays 1995;17,959–5. doi: 10.1002/bies.950171109.

127. Voellmy R. Transcriptional Regulation of the Metazoan Stress Protein Response. Amsterdam: Elsevier 2004;143–85.

128. Yoshida H. ER stress and diseases. FEBS 2007;274,630–58. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x.

129. Torres M, Matamala JM, Duran-Aniotz C, Cornejo VH, Foley A, and Hetz C. ER stress signaling and neurodegeneration: at the intersection between Alzheimer's disease and Prion-related disorders. Virus Research 2015;207,69–75. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.018.

130. Delépine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, and Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. Nat. Genetics 2000;25,406–9. doi: 10.1038/78085.

131. Zhang P, McGrath B, Li S, Frank A, Zambito F, Reinert J, et al. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. Mol. Cell Biology 2002;2,3864–74. doi: 10.1128/mcb.22.11.3864-3874.2002.

132. Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS, Yuan LC, and Klausner RD. Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. Cell 1988;54,209–20. doi: 10.1016/0092-8674(88)90553-3.

133. Yamamoto K, & Ichikawa S. Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis. The Journal of Antibiotics 2019;72(12),924-33. doi.org/10.1038/s41429-019-0200-1.

134. Al-Dabbagh B, Mengin-Lecreulx D, & Bouhss A. Purification and characterization of the bacterial UDP-GlcNAc: undecaprenyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase WecA. Journal of bacteriology 2008;190(21),7141-6.

135. Yoo J, Mashalidis EH, Kuk AC, Yamamoto K, Kaeser B, Ichikawa S, et. al. GlcNAc-1-P-transferase–tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation. Nature structural & Molecular Biology 2018;25(3),217-24.

136. Takatsuki A, Kawamura K, Okina M, Kodama Y, Ito T, & Tamura G. The structure of tunicamycin. Agricultural and Biological Chemistry 1977;41(11),2307-9.

137. Winn M, Goss RJ, Kimura KI, & Bugg TD. Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: Recent advances in structure–function studies and nucleoside biosynthesis. Natural Product Reports 2010;27(2),279-4.

138. Koizumi N, Ujino T, Sano H, & Chrispeels MJ. Overexpression of a gene that encodes the first enzyme in the biosynthesis of asparagine-linked glycans makes plants resistant to tunicamycin and obviates the tunicamycin-induced unfolded protein response. Plant physiology 1999;121(2), 353-62.

139. Oslowski CM, & Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. In Methods in Enzymology 2011;490,71-92.

140. Brandish PE, Kimura KI, Inukai M, Southgate R, Lonsdale JT, & Bugg TD. Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from Escherichia coli. Antimicrobial agents and chemotherapy 1996;40(7),1640-4.

141. Tamura G, Sasaki T, Matsuhashi M, Takatsuki A, & Yamasaki M. Tunicamycin inhibits the formation of lipid intermediate in cell-free peptidoglycan synthesis of bacteria. Agricultural and Biological Chemistry 1976;40(2),447-9. https://doi.org/10.1271/bbb1961.40.447

142. Schönthal AH. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. Scientifica 2012.

143. Bull VH, & Thiede B. Proteome analysis of tunicamycin-induced ER stress. Electrophoresis 2012;33(12),1814-23.

144. Contessa JN, Bhojani MS, Freeze HH., Rehemtulla A, & Lawrence TS. Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. Cancer research 2008;68(10),3803-9.

145. Dawood AA, & Altobje MA. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin may contribute to the treatment of SARS-CoV-2. Microbial Pathogenesis 2020;149,104586. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104586

146. Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. Acta Histochem 2011;113(3):236-47.

147. Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. Glycosylation changes in cancer. Essentials of Glycobiology. 2 nd ed. Cold Spring Harbor, Newyork.

148. Hart GW, Lowe JB, Sathyamoorthy N. Glycobiology and cancer: meeting summary and future diection. Cancer biology & therapy 2004;3(2),233-7.

149. Eo H, Valentine RJ. Imoxin inhibits tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress and restores insulin signaling in C2C12 myotubes. Am J Physiol Cell Physiology 2021;1;321(2):221-9.

150. Abdullahi A, Stanojcic M, Parousis A, Patsouris D, & Jeschke MG. Modeling acute er stress in vivo and in vitro. Shock (Augusta, Ga.) 2017;47(4),506–13. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000759.

151. Dawood AA, & Altobje MA. Inhibition of N-linked Glycosylation by Tunicamycin May Contribute to The Treatment of SARS-CoV-2. Microbial pathogenesis 2020;149,104586. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104586.

152. Shu S, Wang H, Zhu J, Liu Z, Yang D, Wu W, et. al. Reciprocal regulation between ER stress and autophagy in renal tubular fibrosis and apoptosis. Cell death & disease 2021;12(11),1016. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04274-7.

153. Abhari BA, McCarthy N, Le Berre M, Kilcoyne M, Joshi L, Agostinis P, & Fulda, S. Correction: Smac mimetic suppresses tunicamycin-induced apoptosis via resolution of ER stress. Cell death & disease 2020;11(9),806. https://doi.org/10.1038/s41419-020-02991-z.

154. Yamamoto K, & Ichikawa S. Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis. The Journal of antibiotics 2019;72(12),924–33. https://doi.org/10.1038/s41429-019-0200-1.

155. Han X, Zhang X, Li H, Huang S, Zhang S, Wang F, et. al. Tunicamycin enhances the antitumor activity of trastuzumab on breast cancer in vitro and in vivo. Oncotarget 2015;6(36),38912–25. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5334.

156. Öztel Z, Gazan S, & Balcan E. Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress in the small intestine. Biotechnic & histochemistry: Official publication of the Biological Stain Commission 2021;96(7),507–19. https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1823481.

157. Hernández-Elvira M, Martínez-Gómez R, Domínguez-Martin E, Méndez A, Kawasaki L, Ongay-Larios L, & Coria R. Tunicamycin Sensitivity-Suppression by High Gene Dosage Reveals New Functions of the Yeast Hog1 MAP Kinase. Cells 2019;8(7),710. https://doi.org/10.3390/cells8070710.

158. Jackisch L, Murphy AM, Kumar S, Randeva H, Tripathi G, & McTernan PG. Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Mitochondrial Dysfunction in Human Adipocytes. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2020;105(9). https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa258.

159. Wang H, Wang X, Ke ZJ, Comer AL, Xu M, Frank JA, et. al. Tunicamycin-induced unfolded protein response in the developing mouse brain. Toxicology and applied pharmacology 2015;283(3),157–67. https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.12.019.

160. Ho WL, Che MI, Chou CH, Chang HH, Jeng YM, Hsu WM, et. al. B3GNT3 expression suppresses cell migration and invasion and predicts favorable outcomes in neuroblastoma. Cancer science 2013;104(12),1600–08. https://doi.org/10.1111/cas.12294

161. Mueller TM, Yates SD, Meador-Woodruff JH. Increased A-2,8-Sialyltransferase 8B (ST8SIA2) expression in schizophrenia superior temporal gyrus. Biorxiv 2018.

162. Pązik M, Michalska K, Żebrowska-Nawrocka M. Clinical significance of HRAS and KRAS genes expression in patients with non–small-cell lung cancer-preliminary findings. BMC Cancer 2021;21,130. https://doi.org/10.1186/s12885-021-07858-w

163. Helenius A, Aebi M. Intracellular Functions of N-linked Glycans. Science 2001;291(5512):23649.

164. Häuselmann I, Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. Frontiers in oncology 2017;4(28):1-15.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanser Gelişimi 4
Şekil 2. ER ve Golgi ağında karbohidrat işlenme süreci 8
Şekil 3. N-Bağlı Glikolizasyon 9
Şekil 4. O- Bağlı Glikolizasyon 11
Şekil 5. Sialil motifleri 17
Şekil 6. İnsan Sialiltransferazlarının Yapısı 19
Şekil 7. 24 Saate ait Probit Grafiği ve IC50 dozu. 30
Şekil 8. 48 Saate ait Probit Grafiği ve IC50 dozu 31
Şekil 9. SH-SY5Y hücre hattında TM uygulamasının hücre canlılığına etkisi, 24h. 31
Şekil 10. SH-SY5Y hücre hattında TM uygulamasının hücre canlılığına etkisi, 48h. 32
Şekil 11. Çalışılan genlerin kontrol ve TM grubundaki relatif kat değişimleri (24 saat) 35
Şekil 12. Çalışılan genlerin kontrol ve TM grubundaki relatif kat değişimleri (48 saat). 35

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Memelilerde bulunan monosakkaritlerden bazıları ve fonksiyonları 7
Tablo 2. İlaçlar, aşılar ve antijenlerin tunikamisin ile etkileşimi 24
Tablo 3. Kullanılan sarfların adı, markası ve katalog numaraları 25
Tablo 4. Kullanılan cihazların adı ve markası 26
Tablo 5. cDNA sentez protokolü 28
Tablo 6. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları 29
Tablo 7. qRT-PCR karışım içeriği 29
Tablo 8. qRT-PCR sonuçları (n:3; ortalama; std.spma) (24 saat) 33
Tablo 9. T testi sonuçları (anlamlılık: p<0,005) (24 saat) 33
Tablo 10. qRT-PCR sonuçları (n:3; ortalama; std. sapma) (48 saat) 34
Tablo 11. T testi sonuçları (anlamlılık: p<0,005) (48 saat) 34

ÖZGEÇMİŞ