T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELICOBACTER PYLORI CagA PROTEİNİNİN HÜCRE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Babak NAMI MOLLALOU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan ACAR

KONYA - 2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELICOBACTER PYLORI CagA PROTEİNİNİN HÜCRE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Babak NAMI MOLLALOU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan ACAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından proje numarası: **12202032** ile desteklenmiştir.

KONYA - 2014

i. ÖNSÖZ

Günümüzde, kanser en önemli sağlık sorunlarından biri olup tedavisi zor ve sağlık gideri yüksek bir hastalık grubudur. Gastrik kanser dünyada sık görülen ve ölümcül bir kanser grubudur. Gastrik kansernin etiyolojisine bakıldığında, birçok genetik ve çevresel faktörün işe karıştığı görülmektedir. Çevresel faktörlerden mikrobiyolojik faktörler, oldukça önemli ve detayları çok iyi bilinmemektedir. Bunlardan *Helicobacter pylori* (Hp) gastrik kanser gelişiminde ve progresyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Ancak Hp'nin gastrik epitel hücrelerinde nasıl bir etki mekanizması(ları) ile kanser ortaya koyan çalışmalar literatürde sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, Hp'nin genlerinden olan ve gastrik kanser gelişiminde önemli role sahip olduğu düşünülen CagA genin epitel hücrelerindeki etkisi ile ilgili literatürdeki çalışmalar oldukça sınırlı sayıda olup bu proteinin moleküler etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Diğer taraftan, eksojen kökenli olan Hp'nin CagA proteini, hücre içinde veya hücreye dışarıdan verildiğinde, hücrenin temel protein üretme ve işleme sistemi üzerindeki etkisi vehücrenin endoplazmik retikulum sisteminin bu proteine nasıl cevap verdiğine dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Eksojen veya endojen kaynaklı misfold ve unfold proteinler hücre içinde endoplazmik retikulum sisteminin cevabını oluşturur ve bu cevap unfolded protein response (UPR) ve endoplazmik retikulum (ER) stresi yolağı olarak adlandırılır. UPR ve ER stresi yolağına müdahale edilerek bazı hastalıkların tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Literatürdeki veriler çerçevesinde mevcut tez çalışma sonucunda eksojen bir mikrobiyal protein olan CagA proteinin gastrik kanser hücrelerindeki UPR üzerindeki etkisi olduğuna dair bir hipotez ortaya koyduk.

Bu tez Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. Bu kuruma maddi desteğinden dolayı teşekkür ederiz. Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Tülin ÇORA ve Yrd. Doc. Dr. Nadir KOÇAK'a ayrıca Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi öğretim üyeleri Doç. Dr. Ercan Kurar ve Doç. Dr. Aydın Güzeloğlu'na gen ekspresyon tekniklerinin optimizasyonunundaki katkıları için teşekkür ederiz. Tezın bazı teknik çalışmalarında

bana yardımcı olan doktora öğrencileri Vasfiye Betül ÜÇAR'a ve Aysel KALAYCI YIĞIN'a da teşekkürlerimi bildiriyorum.

Bu tezi ve sarf ettiğim tüm emeklerimi, bana emeği çok geçen annem Hatice Navidiyan ve babam Behlül Nami'ye ithaf ediyorum.

ii. İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÇİZELGE ve ŞEKİL LİSTESİ vi
SİMGELER ve KISALTMALAR vii
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER 1
1.1. *Helicobacter pylori* CagA 1
1.2. Unfolded Protein Response 5
2. GEREÇ ve YÖNTEM 14
2.1. Tunicamycin ve CagA 14
2.2. Hücre Kültürü 14
2.3. Hücre Sayımı 15
2.4. Kantitatif Real Time PCR (qPCR) 16
2.4.1. Etken madde muamelesi 16
2.4.2. Total RNA İzolasyonu 16
2.4.3. cDNA Sentezı 17
2.4.4. Primer Dizayni 17
2.4.5. Real time PCR Prosedürü 18
2.5. XBP1 mRNA İşlenmesi 19
2.5.1. Primer Çifti 19
2.5.2. PCR Protokolü 20
2.5.3. SDS-PAGE Jel DNA Dikey Elektroforezi 20
2.6. İmmünofloresans Assay 21
2.7. MTT Assay Proliferasyon Analizi 21
2.8. Trypan Blue Canlılık Testi 22
2.9. İstatistik Analizleri 22
3. BULGULAR 24
3.1. Eksojen CagA ER stress Genlerinin Transkripsyonunu Artırır 24
3.2. Eksojen CagA XBP1 mRNA İşlenmesini Tetikler 26
3.3. Eksojen CagA ATF6 Protein Translokasiyonunu Tetikler 28
3.4. Eksojen CagA Hücre Proliferasyonunu Baskılar 30

4. TARTIŞMA 33
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 39
6. ÖZET 40
7. SUMMARY 41
8. KAYNAKLAR 42
9. EKLER 51
Ek 1 51
Ek 2 52
Ek 3 53
10. ÖZGEÇMİŞ 55

iii. ÇİZELGE ve ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1 1
Şekil 1.2 5
Şekil 1.3 7
Şekil 1.4 9
Şekil 1.5 12
Şekil 2.1 14
Çizelge 2.1..... 16
Çizelge 2.2..... 18
Şekil 3.1 25
Şekil 3.2 27
Şekil 3.3 30
Şekil 3.4 31
Şekil 4.1 34
Şekil 4.2 36

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR

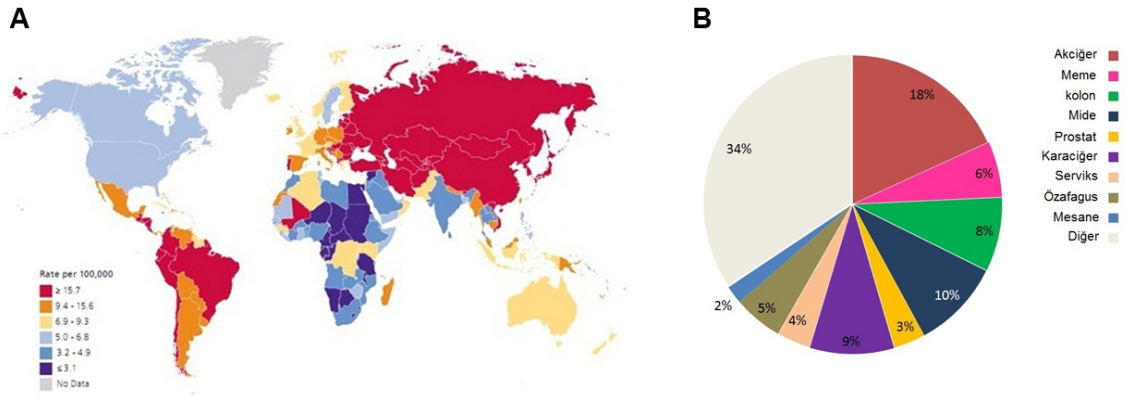
#	Numara
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
A	Adenine
ABD	Amerika Bileşik Devletleri
Abl	Abelson
ADP	Adenosine diphosphate
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammonium persulfate
ASK1	Signal-regulating kinase 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
ATP	Adenosine triphosphate
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bkz.	Bakınız
BSA	Bovine serum albumin
bZIP	Basic lucine zipper
C	Cytosine
CagA	Cytotoxic-associated gene A
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CHOP	C/EBP homologous protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct	Cycle threshold
DAPI	4’,6-diamidino-2-phenylindole
ddH_2O	Double distilled H_2O
DTT	Dithiothreitol
dH_2O	Distilled H_2O
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide
EDEM1	Endoplasmic reticulum enhancer monnosidase alpha-like 1
EerI	Eeyarestatin I
EIF2α	Eukaryotic initiation factor 2
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation
ERSE	Endoplasmic reticulum stress element

FBS	Fetal bovine serum
FDA	U.S. Food and Drug Adminstration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gram
G	Guanine
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GRP78	Glucose binding protein 78 kilodalton
GRP94	Glucose binding protein 94 kilodalton
HEK	Human embryonic kidney
HP	Helicobacter pylori
IDT	Integrated DNA Technology
IgG	Immunoglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IRE1	Inositil-requiring kinase 1
JNK	Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligram
ml	Millilitre
mM	Millimilar
mRNA	Massenger Ribonucleic acid
N	Nucleotide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFY	Nuclear transcription factor Y
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogram
NIH	National Institute of Health
nm	Nanometer
P	Probability
P38 MAPK	P38 mitogen activated protein kinase
P53	Protein 53 kilodalton
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	PPKR-like endoplasmic reticulum kinase
pH	Power of hydrogen
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid

rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Src	Sarcoma
SRF	Serum response factor
T	Thymine
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Rween20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tm	Tunicamycin
TNFα	Tumor necrosis factor-alpha
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
UPR	Unfolded protein response
UV	Ultraviolet
V.	Versiyon
XBP1	X-box binding protein 1

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Gastrik kanser, epitelyal kökenli adenokarsinom kanser tipidir (Ackerman 1948). Gastrik kanser dünyada dördüncü sık görülen kanser olup 2002 yılında 930.000 vaka rapor edilmiştir (Parkin ve ark 2005). Gastrik kanser nedeniyle ölenlerin sayısı yılda 800.000 olduğu ve dünya çapında akciğer kansernden sonra ikinci ölümcül kanser tipi olarak tespit edilmişir (World Health Organozation 2012) (Şekil 1.1). Gastrik kanser metastaz oranı %80 - %90 olup Doğu ve Orta Asya, Orta Doğu ve Latin Amerika'da diğer ülkelere göre daha sık görülmektedir (Parkin ve ark 2005). Gastrik kansernin nedenleri arsında çevre faktörleri, sigara ve alkol kullanımı, diyet, yaş ve cinsiyet sayılabilir. Bunların yanı sıra *Helicobacter pilori* (Hp) enfeksiyonu gastrik kansernin tetiklenmesinde önemli rol oynamaktadır (Eslick ve ark1999, Parsonnet ve ark 1991, Huang ve ark 1998, Marciniak ve ark 2006, Forman ve ark 2006, Blaser ve ark 2006).



Şekil 1.1. Dünyada gastrik kanser vaka ve ölüm sıklığı. (A) Doğu ve Güney Asya gastrik kansernin en yaygın olduğu bölgedir. Sonra Orta ve Batı Asya ve GüneyAmerika gastrik kansernin en sık görüldüğü bölgelerdir. (B) Gastrik kanser yılda yaklaşık 740,000 ölüme neden olmaktadır ve kanser nedenli ölümlerin %10'unu oluşturarak akciğer'den sonra ikinci ölümcül kanser türüdür (World Health Organization 2012).

1.1. *Helicobacter pylori* CagA

Helicobacter pylori (Hp) gram negatif, mikroaerofil, lophotrichous spiral şekilli bir bakteridir. Bu bakteri normal flora olarak insanların yaklaşık %50 - %80'de bulunmaktadır (Kusters ve ark2 006). Hp'nin, mide asit ve mukus salgılayan hücrelerine müdahale ederek, gastro-duodenal hastalıklarına yol açmaktadır. Ayrıca, bu bakterinin mide mukus tabakasında kolonize olması epitel hücreleri ile direk ilişkiye girmesini sağlar ve bu hücrelerin iltihabına neden olarak gastrit riskini arttırdığı bilinmektedir (Hunt 1996, Graham ve Yamaoka 1998, Makola ve ark 2007). Birçok vaka-kontrol çalışmaları ile Hp'nin gastrik kanser ile ilişkisi ortaya konmuştur. Örneğin, 1998 yılında yapılmış 19 vaka-kontrol çalışmasının meta-analizi sonucunda 2491 gastrik kanser hastası ve 3959 kontrol bireyin Hp enfeksiyon durumu karşılaştırılmış ve sonuçta gastrik kanser riski ve Hp enfeksiyonu arasında anlamlı bir fark olduğu ortaya konmuştur (Odd ratio = 6.35, P = 0.001) (Huang ve ark 1998). 2001 yılında yayınlanan, 11 vaka-kontrol çalışmasını değerlendiren bir başka meta-analizde ise Hp ve gastrit arasındaki ilişkisini ortaya koymuştur (Odd ratio = 3.00, P < 0.001) (Xue ve ark 2001). Yapılan araştırmalarda Hp pozitif olan gastritli hastaların büyük bir kısmında, gastrik neoplazi gelişimi gözlenmiştir. Hp popülasyonda yaklaşık %20 peptit ülser ve %2 oranında gastrik kanser riski artmaktadır (Petersen ve Krogfelt 2003). Ayrıca bu bakteri, gastrit ve deudenal ülser hastalarının yaklaşık %90'nında ve gastrik kanser hastalarının %80'nin midesinde bulunduğu tespit edilmiştir (Uemura ve ark 2001 , Kusters ve ark 2006, Palli ve ark 2007).

Günümüzde 36 farklı Hp alt tipi tespit edilmiştir. Bu alt tipler ortalama 1480-1660 gene sahip olup, 1.55-1.82 mega baz'lık halkasal DNA ile bu genleri kodlamaktadır (GenBank NCBI 2013). Hp'nin virülansına birçok yüzey antijen ve toksinleri iştirak etse de, cytotoxin associated gene A (CagA) geni tarafından kodlanan CagA proteini patogenezde en önemli ve en fonksiyonlu proteindir (Atherton 1998, Yamaoka 2010). CagA proteini 125-145 kDa ağırlığında bir protein olup C-terminus bölgesinde 5 amino asitten (glutamic acid, proline, isoleucine, tyrosine ve Alanine) oluşan EPIYA motif dediğimiz kutucuklar bulunmaktadır (Higashi ve ark 2005, Backert ve Selbach 2008). CagA proteini Hp tarafından IV. salgı sistemi kullanılarak konakcı hücre içine enjekte edilir (Backert ve ark 2000, Kandulski ve ark 2008). CagA proteini,

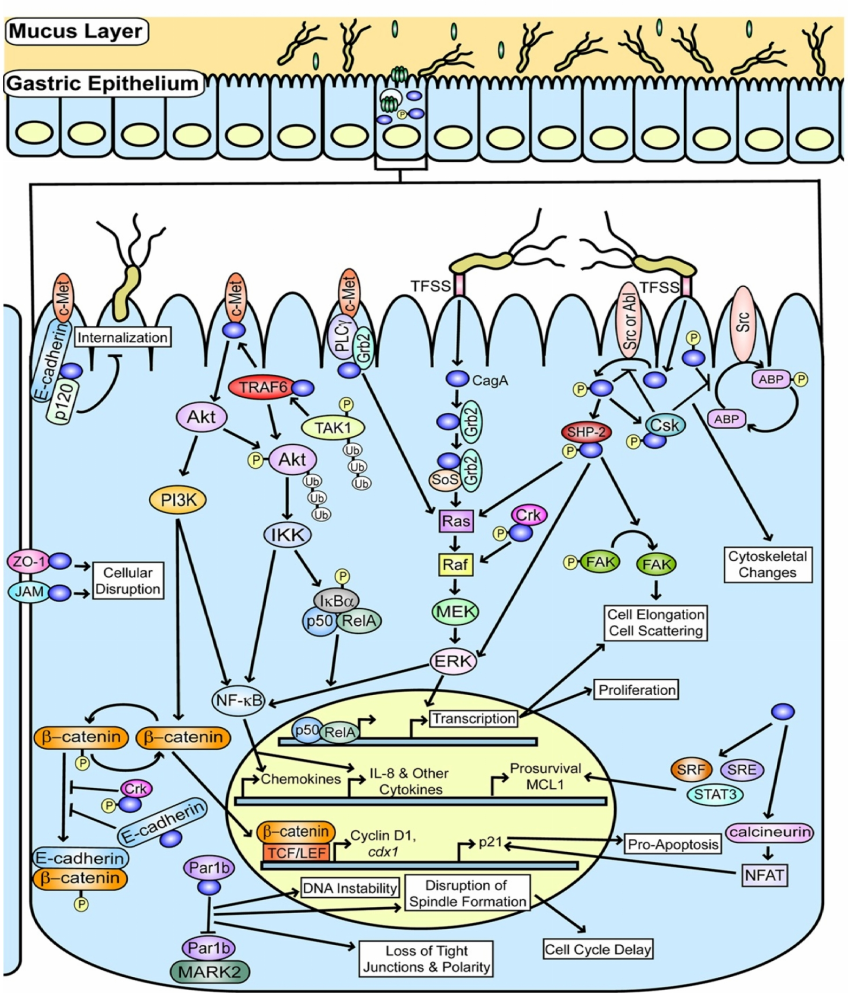
hücre içine salındıktan sonra direk fosforlanır ya da fosforlanmadan da kalabilir. CagA'nın bazı fonksiyonları yerine getirebilmesi için fosforlanması gerekmektedir. Bunun için CagA, hücre içine girer girmez EPIYA motif kutucuklar hücre sarcoma (Src) veabelson (Abl) kinaz proteinler tarafından fosforlanır ve fonksiyonel hale gelir ve birçok hücre fonksiyonunda özellikle hücre iskeletinde rol oynar (Hatakeyama 2004, Backert ve Selbach 2008, Amieva ve El-Omar 2008, Tegtmeyer ve Backert 2011). Fosforlanmış CagA RAS/RAF/ERK sinyal yolağını hiper-aktifleştirerek hücre proliferasyonuna neden olur (Higashi ve ark 2004, Amieva ve El-Omar 2008). Ras/Raf/Erk yolağının aktif olması nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) yolağının hiper-aktivasyonuna neden olur ve bunun sonucunda sitokin ve kemokinlerin seviyesi yükselerek imflamasyon ve proliferasyon seviyesi paralel olarak artar (Suganuma ve ark 2008, Feng ve ark 2008, Hou ve ark 2009). Yapılan çalışmalarda, fosforlanmış CagA'nın konakçı hücrelerde sito-iskelet düzenini bozduğu gösterilmiştir (Su ve ark 2003, Tegtmeyer ve Backert 2011). Hücre iskeletine gerekli olan aktin filamentlerinin düzenlenmesi için fosforlanmış cortactin proteinleri gerekmektedir, ancak fosforlanmış CagA, bazı kinaz proteinlerini inhibe ederek cortactin'nin fosforlanmasını engeller. Cortactinin fosforlaşmaması, aktin filamentlerin yanlış polimerize olmasına sebep olur ve hücre iskeleti bozulur (Selbach ve ark 2003).

CagA'nın fosforlanmamış formu da birçok konakçı hücre içi fonksiyonlara müdahale ederek kanserleşme yollarını aktifleştirebilmektedir. Genelde CagA iki önemli yolağı kullanarak hücre apopitozunu engeller. Birincisi fosforlanmış halde Ras/Raf/Erk yolağını hiper-aktif ederek serum yanıt faktörlerin (Serum response factors; SRFs) gen ekspresyonunun artışına sebep olur (Hirata ve ark 2002). SRF proteinleri mitokondride Bim ve Bcl-2 homologous antagonist killer/ Bcl-2-associated X protein (Bak/Bax) proteinlerini baskılar ve bunun sonucunda caspase 9 ve 3 proteinleri baskılanır. Kaspazların baskılanması apopitoz olayının durmasına neden olur (Drewett ve ark 2001, Murai ve Treisman 2002). İkincisi ise, fosforlanmamış CagA NF-κB yolağını aktifleştirerek anti-apopitoz faktörlerinin hiper-ekspere olmasına neden olur (Feng ve ark 2008, Hou ve ark 2009). Anti-apopitoz faktörler mitokondriden sitokrom-c

salgılanmasını ve sonuçta apopitozun başlamasını engeller (Wang ve ark 1999, Shou ve ark 2002). Ayrıca CagA NF-κB yolağını up-regüle ederek karsinoma gelişiminde önemli bir gen olan cyclooxygenase-2 (COX-2) fonksyonuna mudahale eder ve hücrenin kanserleşmesine yol açar (Lee ve ark 2004, Ulivi ve ark 2008). Bununla birlikte, CagA'nın diğer Hp toksinleriyle beraber tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ve interleukin-6 (IL-6) iltihap yolaklarında etkili olan moleküllerin ekspresyonunu artırarak imflamasyona ve diğer sinyal yolaklarının değişimine neden olduğu bildirilmiştir (Tsuji ve ark 2003).

CagA proteini, β-catenin proteinini aktifleştirir ve bu yolla β-cateninin hedef genleri olan *LEF/TCF* genlerinin ekspresyonunu arttırır (Murata-Kamiya ve ark 2007, Kurashima ve ark 2008). LEF/TCF'in artışı hücrenin aşırı proliferasyonunu tetiklemekte ve sonunda kanserleşmeye yol açabilmektedir (Young ve ark 1998, Daniels ve Weis 2005). Bu proteinin görevini yapması için β-catenin proteinine bağlı olması gerekir, ancak ortamda CagA olduğunda β-catenin proteini E-cadherin'den ayrılır ve çekirdeğe transloke olur. Tümör baskılayıcı proteini olarak bilinen E-cadherin hücrelerin bir arada tutulmasında önemli göreve sahiptir. β-cateninin ayrılması E-cadherinin fonksiyonunu durdurmakta ve sonuçta hücre-hücre bağlantısı bozulup hücreler birbirinden ayrılabilmektedir (Kurashima ve ark 2008, Oliveira ve ark 2009, Neal ve ark 2013) (Şekil 1.2).

CagA'nin kanserleşme sürecinde sıkça görülen hücre polarite kaybı üzerine etkisi araştırılmıştır. Calışmalar CagA geninin hücre polaritesini ve morfolojik düzenini bozduğu gösterilmiştir (Bagnoli ve ark 2005, Saadat ve ark 2007). Ayrıca son çalışmalarda, Hp CagA'nın gastrik adenokarsinoma hücrelerinde Protein 53 (P53) fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir (Shibata ve ark 2002, Buti ve ark 2011). Bununla birlikte, diğer bir çalışmada ise eksojen CagA'nın *COX-2* pro-apoptotik genini aktive ederek gastrik kanser epitel hücrelerinde apopitozu tetiklediği gösterilmiştir (Targosz ve ark 2012).



Şekil 1.2. Konakcı epitel hücresinde Hp CagA proteinin genel fonksiyon şematiği. Hp CagA bakterisi IV. salgı sistemi vasıtasıyla konakcı hücre içine enjekte olur ve Src ve Abl kinaz proteinleri tarafından fosforlanar yada fosforlanmaz. Fosforlanmış CagA RAS/RAF/ERK yolağını etkileyerek hücre proliferasyonunu arttırır. Aynı zamanda bu yolağı kullanarak NF-κB yolağını aktifleştirir böylece sitokin ve kemokinlerin artışına sebep olur. Bu moleküllerin artışı sonuçta hücre imflamasyonu ve proliferasyonuna neden olur. Forforlanmış CagA cortacin fonksiyonuna müdahale ederek hücre iskeletine hasar verir (Şekil kaynağı; Jones ve ark 2010).

1.2. Unfolded Protein Response

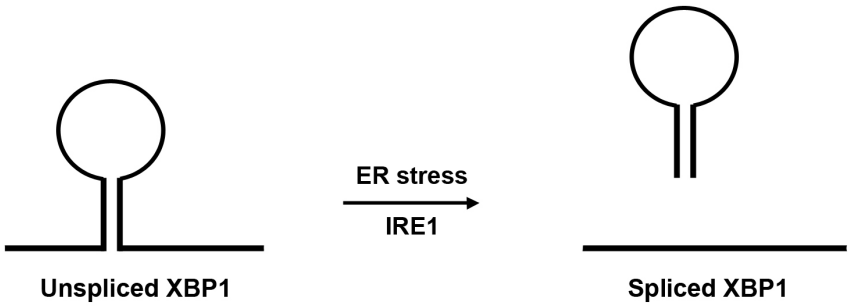
Normal bir hücrede her üretilen proteinin doğru bir şekilde işlenmesi hücre için hayati önem taşımaktadır. Mutasyonlu bir protein, katlanamaz ise “unfolding” ya da

yanlış katlanırsa “misfolding” olarak isimlendirilir. Bu proteinlerin normalde hücrede bulunmaması veya fonksiyonunun bloklanması gerekmektedir (Palade 1956, Selkoe 2003). Proteinlerin işlenmesinde Endoplazmik Retikulum (ER) merkezi bir organel olarak görev yapmaktadır (Palade 1956). Katlanmamış proteinler, ER’de işlenmesi sırasında degrade edilirler. Eğer dış etkenler ya da genetik bozukluklar sonucu, katlanmamış protein miktarı aşırı derecede sentezlenirse ya da ER yolakları normal bir şekilde çalışmaz ise ER’de katlanmamış protein birikimi ortaya çıkar (van den Berg ve ark 2000, Ron ve Walter 2007). Bu da katlanmamış protein yanıtı (unfolded protein response; UPR) ve ardından ER stresine yol açar. UPR, ER içi Ca^{2} düzenini değiştirir ve hücre içi homesostazisi bozar (Van Den Berg ve ark 2000, Schroder ve Kaufman 2005, Ron ve Walter 2007). ER homeostazinin bozulması UPR sinyal yolaklarını aktifleştirir ve sonuçta hücrenin apopitoz yoluyla ölümüne sebep olur (Van Den Berg ve ark 2000, Schroder ve Kaufman 2005, Ron ve Walter 2007). Benzer bir mekanizmanın sinir hücrelerinde de UPR ve ER stresi nörodejenerasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Ryu ve ark 2002). Bu bağlamda, UPR ve ER stresinin, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda da sık görülen bir mekanizma olduğu bildirilmiştir (Ryu ve ark 2002, Ho ve ark 2012, Hedskog ve ark 2013).

Endoplasmik Rerikulum içinde Glocose-Regulated Protein 78 kDa (GRP78) şaperonu normal şartlarda inaktif olarak kendi bağlayıcı luminal alanına bağlı kalır. Katlanmamış protein seviyesi yükseldiğinde, GRP78 şaperonu katlanmamış proteinin hidrofobik bölgesine bağlanır ve aynı zamanda önceden bağlandığı luminal reseptörden kopar (Bertolotti ve ark 2000, Reddy ve ark 2003). Bu bağlantının kopması,GRP78’i aktive eder. Aktif serbest GRP78 şaperonu ER lümeninde bulunan transmembran proteinleri Inositol-Requiring Kinase 1 (IRE1), PRKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) ve Aactivating Transcription Factor 6 (ATF6)’nın N-terminal bölgesine bağlanır. GRP78’ in ayrılması ER zarında IRE1α ve PERK’ in oligomerleşmesine neden olur (Kaufman ve ark 1999, Hendershot 2004, Lee 2005, Luo ve ark 2006).

IRE1 yaklaşık 100 kDa’luk bir transmembran protein olup bir serine/threonine protein kinaz domeyni ve bir de endoribonükleaz domeynine sahiptir (Lee 2007,

Korennykh ve ark 2011). Oligomerleşmiş IRE1, TNF Receptor-Associated Factor 2'ye (TRAF2) bağlanarak, Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1'i (ASK1) aktif hale dönüştürür. Aktif ASK1 yolağının devamında diğer kinaz enzimleri olan P38 Mitogen-Activated Protein Kinase (P38 MAPK) ve Jun N-terminal Kinase' yı (JNK) aktive eder (Urano ve ark 2000, Zhang ve ark 2001, Luo ve ark 2008). Ayrıca aktif IRE1 endo-ribonukleaz enzimatik domeynini kullanarak olgunlaşmamış X-box Binding Protein 1'in (XBP1) mRNA'sını 26 baz çifti'lik intronik parçayı çıkararak olgun mRNA formuna dönüştürür (Yoshida ve ark 2001). Bu olay sonucunda, XBP1 proteininin translasyonu olgun mRNA'dan gerçekleşir (Calfon ve ark 2002, Lee ve ark 2002, Korennykh ve ark 2011) (Şekil 1.3). XBP1 basic leucine zipper (bZIP) ailesine ait bir transkripsiyon faktörü olarak katlanmamış proteinlerin ortadan kaldırılmasında sorumlu olan genlerin ekspresyonuna neden olur (Shuda ve ark 2003, Lee ve ark 2003).



Şekil 1.3. *XBP1* genin mRNA'sının işlenmesi. UPR oluşumunda işlenmemiş (unspliced) XBP1 mRNA'sı IRE1 endoribonükleaz domeyni tarafından kesilir ve 26 baz çifti'lik intron bölgesi çıkarılır. Bu işlem'den sonra XBP1'nin translasyonu gerçekleşir.

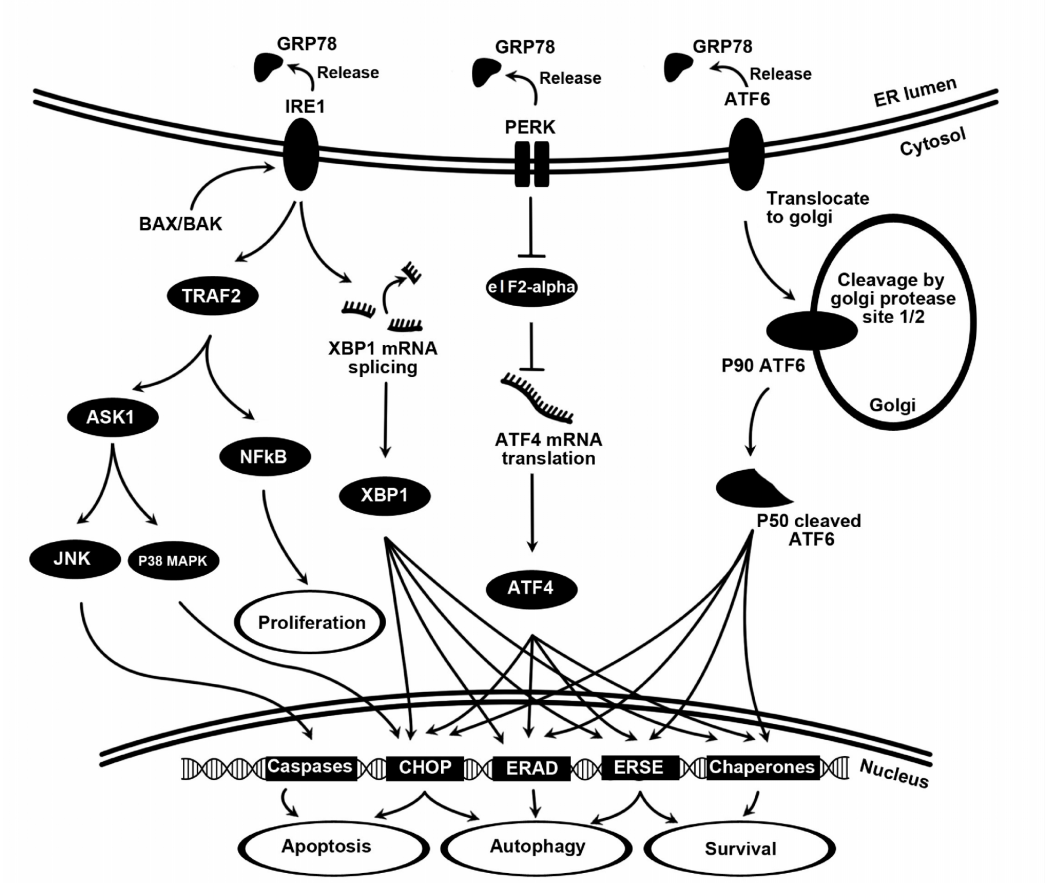
UPR sinyal yolağının başka bir sensörü serine/threonine protein kinaz olan PERK, GRP78'in ayrılmasıyla otofosforile olur ve translasyon faktörü olan Eukaryot Initiation Factor 2α'yı (eIF2α) fosforile eder ve bunun sonucunda hücre genel protein üretimi durdurulur (Farrell ve ark 1977, Teske ve ark 2011). Bu durumda, sadece ER şaperonlar ve ER ile ilgili transkripsiyon faktörleri gibi bazı gerekli faktörlerin üretimi devam eder. eIF2α, 39 kDa ağırlığında bZIP transkripsiyon faktör proteini olan Activating Transcription Factor 4 (ATF4) proteinini baskılar ve eIF2α'nin PERK

tarafından baskılanması ATF4 protein seviyesinin artmasına neden olur. ATF4, ER şaperon proteinler vebazı ER ile ilgili transkripsiyon faktörleri ve otofaji proteinlerinin ekspresyonunu artırır (Koumenis ve ark 2002, Jiang ve Wek 2005, Rzymski ve ark 2010).

ATF6 başka bir UPR sensörü ve ATF4 gibi bir bZIP transkripsiyon faktörüdür. ATF6, UPR'nin başlangıcında ER zarından kopup golgi aygıtına transloke olur, orada S1P ve S2P proteolitik tarafından kesildikten sonra C-terminus kısmi golgi aygıtında kalır, N-terminus kısmi ise hücre çekirdeğine transloke olur (Haze ve ark 1999, Shen ve ark 2002). Aktif N-terminal ATF6 transkripsyon faktörü UPR ve ER stresinde önemli rol oynayan ER-assisted degradation (ERAD) genlerinin ekspresyonunu regüle eder. Bunun yanı sıra, XBP1, ATF4 ve C/EBP homologous protein (CHOP) gen ekspresyonunu artırır (Okada ve ark 2002, Shen ve ark 2002) (Şekil 1.4).

GRP78, ER lümeninde bulunan en yaygın şaperondur ve ATP/ADP döngüsünü kullanarak proteinlerin katlanmasını düzenler (Uramoto ve ark 2005, Luo ve ark 2006). Bu protein üç farklı sinyal yolağından (IRE1α, PERK ve ATF6) UPR'yi başlatır. Birçok kanser tipinde GRP78'in arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, göz önüne alınarak son yıllarda GRP78'in bir onkogen olduğu öne sürülmektedir (Lee 2001, Li ve Lee 2006). Ayrıca GRP78'in aşırı ekspresyonu gastrik kanser dahil tümör hücresinin hayatta kalma ve büyüme sinyal proteinlerinin artışına ve tedaviye dirençliliğe neden olmaktadır (Shuda ve ark 2003, Zheng ve ark 2008, Suyama ve ark 2011). Bu bulgular sonucu GRP78'in kanser biyomarkırı olma potansiyeli taşıdığı ve kanser tedavisinde hedef molekül olarak kullanılabilmesi önerilmiştir (Arap ve ark 2004, Liu ve ark 2007, Cheng ve ark 2012, Delie ve ark 2012, Cheng ve ark 2013, Thornton ve ark 2013).

IRE1 yolağından başlayan UPR, XBP1 yoluyla protein katlanmasında rol alan bazı genlerin ve Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD)



Şekil 1.4. Hücrede endoplazmik retikulum stresi sinyal yolakları. ER'de katlanmamış protein birikimi sonucunda GRP78 şaperonu ER zarındaki ATF6, PERK ve IRE1 transmembran proteinlerinden ayrılır vebu proteinleri aktif hale dönüşür. P90 ATF6 zarda ayrılıp golgi aygıtına gider ve orada kırılır ve P50 kısmı hücre çekirdeğinde hedef genlerin ifadesini etkiler. PERK proteini transkripsiyon faktörü olan ATF4 translasyonunu baskılayan eIF2-α'yı baskılar ve bu yol ile UPR hedef genlerin ifadesini arttırır. IRE1 transkripsiyon faktörü olan XBP1 mRNA'sının proteine dönüşmesini arttırır. IRE1 ayrıca TRAF2'yi aktif eder. TRAF2, birincisi NF-κB yolağı vasıtasıyla alarm genlerin devreye girmesini sağlar, ikincisi ise MKK6/7'nin aktivasyonuna neden olur. Sonuçta MKK6/7, JNK yolağıyla appoptozis genleri ve P38 MAPK vasıtasıyla UPR önemli hedef proteini olan CHOP proteinin ifadesini arttırır. UPR kalsiyum yoğunluğunu sitoplazmada artırarak mitokondri aracılığıyla apoptotik genlerin ifadesini arttırır.

genlerinin ekspresyonunu artırmaktadır. XBP1'in UPR faktörleri arasında en önemlisi olduğu söylenebilir. XBP1 birçok tümörde aşırı ekspere olup tümör invazyonuna katkıda bulunmaktadır (Fujimoto ve ark 2003, Tirosh ve ark 2006, Zhu ve ark 2006).

UPR'nin IRE1/XBP1 yolağının hücre farklılaşmasında, iltihapta ve lipogenezde etkili olan genlerin ifadesini regüle ettiği ve apopitoz sinyal yolaklarını etkilediği tespit edilmiştir (Lee ve ark 2003, Acosta-Alvear ve ark 2007). Ayrıca IRE1/XBP1 yolağının tümör anjiyogenezinde de etkili rol oynadığı söylenebilir. XBP1 mRNA'sının olgunlaşması, tümör büyümesini ve erken evrelerde anjiyogenez faktörlerinin eksprese olmasını tetiklemektedir. Çeşitli çalışmalarda XBP1, kanser tanı ve tedavisinde önemli bir hedef gen olarak gösterilmiştir (Fujimoto ve ark 2003, Koong ve ark 2006, Carrasco ve ark 2007, Davies ve ark 2008, Mimura ve ark 2012).

PERK/eIF2α yolağında UPR ise diğer iki yolaktaki gibi hücre tümörleşme sürecinde çok etkili bir role sahiptir. Bu yolak, UPR durumunda özellikle de hipoksik ortamda tümör hücre büyüme ve proliferasyonunu etkili bir biçimde artırır (Fels ve Koumenis 2006, Blais ve ark 2006, Ranganathan ve ark 2008, Bobrovnikova-Marjon ve ark 2010, Nagelkerke ve ark 2013). PERK/eIF2α yolağının kanser oluşumundaki rolü fare hayvan modelleri ile ispatlanmıştır (Koumenis ve ark 2002, Blais ve ark 2006).

ATF4 transkripsiyon faktörü ise hücre yaşamında ve ölümünde iki zıt role sahiptir. Bu protein UPR durumunda ER şaperonlar ve ERAD genlerin ekspresyonununu ve ardından protein sentezini regüle ederek tümörlü hücreyi UPR ve ER stresinden kaynaklanan ölümden kurtarıdığı ve tümör hücrelerinde anti-kanser kemoterapiye karşı dirençlilik sağladığı gösterilmiştir (Igarashi ve ark 2007, Pike ve ark 2013). Ayrıca ATF4'ün çevre stresi koşulları altında kalan normal doku hücrelerini bazı yolaklar ile neoplaziye götürdüğü gösterilmiştir (Ye ve ark 2010, Horiguchi ve ark 2012). Öte yandan, son çalışmalarda ATF4'ün stres koşulları altında transkripsiyon regülasyonu yaparak hücre ölümünü tetiklediği saptanmıştır (Han ve ark 2013). Buna rağmen ATF4 transkripsiyon faktörünün rol aldığı yolakların, kanser tedavisinde hedeflenebileceği yönde araştırmalar sürüdürülmektedir (Singleton ve Harris 2012).

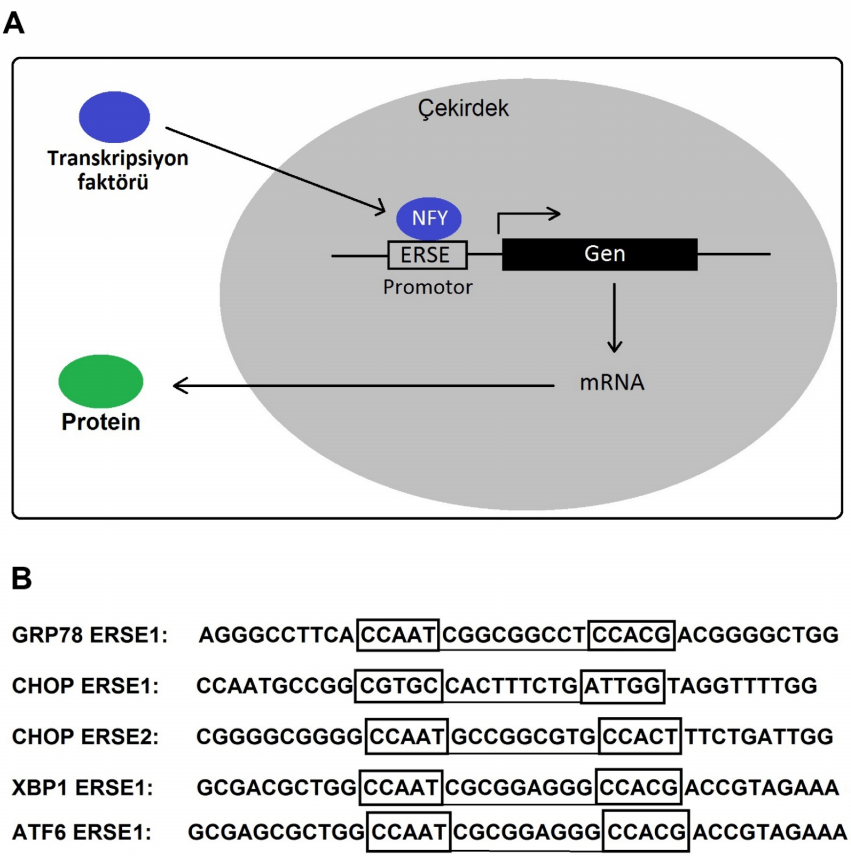
UPR'de up-regüle olan XBP1, ATF4 , ATF6 ve CHOP transkripsiyon faktörleri önemli hedef gen grubundan birisi Endoplazmik Reticulum Stress Element (ERSE) genleridir. ERSE genlerinin promotoru UPR ve ER stresi transkripsiyon faktörü

tarafından tanınan ERSE motif dizisine sahiptir. Toplamda 4 tip ERSE geni bulunmaktadır. ERSE1 tipi 5'-CCAAT-N(9)-CCACG -3', ERSE2 5'- ATTGG-N-CCACG-3', *ERSE1*-benzeri motifler 5'-CCAAT-N(n)- CCACG-3' ve *ERSE2*-benzeri motifler 5'- ATTGG-N(n)-CCACG-3' dizisini taşımaktalar (Yamamoto ve ark 2004). Vurgulanan transkripsiyon faktör proteinleri Nuclear Transcription Factor Y (NFY) domeyni ERSE motiflere bağlanarak gen transkripsiyonunu regüle eder (Yoshida ve ark 2000, Ubeda ve Habener 2000, Lee ve ark 2003, Yamamoto ve ark 2004).

UPR yolağının son hedeflerinden en önemlisi transkripsiyon faktörü olan *CHOP* gen ekspresyonunun artmasıdır. CHOP birçok hücre sinyal yolağını etkileyerek pro-apopitotik ve tümör süpresör fonksiyonuna sahiptir (Marciniak ve ark 2004, Horndasch ve ark 2006, Prasad ve ark 2011). Ayrıca CHOP NFY domeyni vasıtasıyla bazı pro-apoptotik genleri up regüle eder ve böylece tümör baskılayıcı etki yapar (Ubeda ve Habener 2000, Ohoka ve ark 2005).

XBP1, ATF4, ATF6 ve CHOP transkripsiyon faktörleri NFY domeynine sahiptir ve bu domeynini kullanarak ERSE motif'ine sahip genlerini regüle ederler. İlginç olarak *XBP1* ve *CHOP* genleri promoter'inde ERSE motif'ine sahiptir (Şekil 1.5) ve ER stesi transkripsiyon faktörleri (XBP1, ATF4, ATF6 ve CHOP) tarafindan regüle olurlar (Yamamoto ve ark 2004). Kısaca CHOP transkripsiyon faktoru XBP1 'de olduğu gibi oto-regülasyon yetkiye sahip bir transkripsiyon faktörüdür.

Araştırmalarda Hp CagA'nın hücre üzerine etkisinin araştırılması için hücre içine CagA geni transfer edilmiştir. Bu tip çalışma tasarımı CagA'nın bakteri tarafındankonakcı hücreye salgılama mekanizmasına göre yapılmıştır. Bu yüzden önceki çalışmalarda CagA geni konakçı hücre içinde eksprese olup endojen (endogenous) olarak proteini üretilip fonksiyonu araştırılmıştır.



Şekil 1.5. ERSE motifleri. (A) NFY domeynine sahip transkripsiyon faktörü spesifik olarak promotor bölgesinde ERSE motif dizisine içeren genlerin ekspresyonunu regüle eder. (B) UPR bazi genlerinin promoterlerindeki ERSE motif dizileri. Diziler kutucuk içinde gösterilmiştir. Alt çizgili diziler iki ERSE motif'in değişken dizilerdir.

Serolojik olarak Hp CagA antijeni Hp CagA pozitif hasta serumunda tespit edilmiştir ve günümüzde serolojik metodu Hp enfeksiyon teşhis yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır (Cover ve ark 1995, Donati ve ark 1997, Miehlke ve ark 1998). Patolojik boyuttan bakarak CagA pozitif Hp enfeksiyonu ve bunun sonucunda oluşan iltihap neticesinde, mide epitel hücrelerinde nekroz gelir ve hücre dışarı yayılır ve dokudaki komşu hücreler ile temas eder. Bu durumda endojen CagA proteinleri komşu normal hücrelerin dışında eksojen (exogenous) protein olarak kalır ve hücre yüzey reseptörler ile ilişki kurar (Günümüze kadar eksojen CagA protein ile hücre yüzey reseptörler arasındaki muhtemel ilişkiye dair literatür bulunmamaktadır). Bu muhtemel olaydan dolayı, mevcut projede eksojen CagA proteininin gastrik kanser hücreler

üzerine etkisinin incelenmesi planlanmıştır. Burada rekombinant C-terminus eksojen Hp CagA'yı HEK293, AGS ve MKN45 hücrelerine muamele edildi ve farklı muamele sürelerinden sonra hücre proliferasyonunu incelendi ayrıca buna paralel olarak bazı UPR faktörlerin up-regulasyonunu üzerine etkisiincelendi. Özet olarak projenin iki temel amacı: Gastrik hücreleriyle ilişkide olan Hp CagA proteinin, eksojen formunda gastrik konakçı hücrelerde proliferasyonu nasıl etkiliyor ve bu etkinin UPR faktörleri ile nasıl bir ilişkide olduğunu araştırmaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Tunicamycin ve CagA

Calışmada, pozitif etken madde olarak endoplazmik retikulum stresi uyarıcısı olan ajan Streptomyces sp.'den elde edilmiş olan Tunicamycin (5 mg) Sigma-Aldrich® (Saint Louis, ABD, #:T7765) firmasından temin edildi. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated antigen A (CagA) rekombinant protein (61-581. Amino asitlik C-terminal kısmi) Bioclone® Inc. (San Diego, ABD) firmasından temin edildi. Kullanılan CagA proteinin amino asit dizisi Şekil 2.1'de verilmiştir.

MASTTHHHHHHDTDIPTTGGGSRPDDDDKENLYFQGHMDFSKSFDEFKNGKNKDFSKSEETLKAL
KGSVKDLGINPEWISKVENLNAALNEFKNGKNKDFSKVTQAKSDLENSVKDVIINQKVTDKVDNL
NQAVSVAKATGDFSRVEQALADLKNFSKEQLAQQAQKNEDFNTGKNSALYQSVKNGVNGTLVGNG
LSKAEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNFNNNNNNGLKNSTEPIYAKVNKKKAGQAASPEEPIYAQV
AKKVNAKIDRLNQIASGLGVVGQAVGFPLKRHDKVGDLSKVGQSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKR
HDKVGDLSKVGLSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVGDLSKVGLSREQQLKQKIDNLSQAVSE
AKAGFFGNLEQTIDNLKDSAKNNPVSLWAEGAKKVPASLSAKLDNYATNSHTRINSNIQSGAINE
KATGMLTQKNPEWLKLVNDKIVAHNVGSVPLLEYDKIGFNQKSMKDYSDSFKFSTELNNAVKDVK
SGFTQFLANAFSTGYYRLAGENAEHGIKNVNTKGGFQKS

Şekil 2.1. Eksojen C-terminus Hp CagA proteininin aminoasit dizisi. EPIYA motif kutucukları kadro içinde belirtilmiştir (Bioclone® Inc. Dizi ürün kataloğundan alınmıştır).

Tunicamycin, konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde dimethyl sulfoxide (DMSO) ile sulandırıldı ve +4 °C'de saklandı. CagA proteini 0.1µg/µl olacak şekilde PBS ile sulandırıldı ve -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2. Hücre Kültürü

Mide karsinoma kökenli olan AGS, mide metastatik kanser kökenli olan MKN45 hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC)'dan ve insan embriyonik

böbrek hücre hattı HEK293 İran Pasteur Enstitüsü Hücre Bankası'ndan temin edildi. Dondurulmuş hücreler önce 37 °C de çözüldükten sonra 200 ×g'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Hücre pelleti steril PBS ile bir kez yıkandı, tekrar aynı santrifüj koşulunda çöktürüldü. AGS ve MKN45 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS; Gibco®), %1 L-glutamine ve %1 antibiyotikli (streptimycin-Penicilin 1:1; Gibco®) RPMI-1640 (Gibco®) kültür vasatında, HEK293 ise %15 fetal bovine serum (Gibco®), %1 L-glutamine ve %1 antibiyotikli (Streptomycin-Penicilin 1:1; Gibco®) RPMI-1640 (Gibco®) vasatında T75 kültür flasklarında 37 °C'de %5'li CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılarak kültür edildi (Bkz. Ek 1).

Hücreler flaskta %80'lik alanı doldurduktan sonra steril olarak %0.25 trypsin solüsyonu muamelesi ile kaldırıldı. Kaldırma işlemi şöyle geçeklestirildi: hücreler önce 5veya10 ml steril PBS ile yıkandı T25 flaskına 2 ml ve T75 flaskına 5 ml steril %0.25 trypsin solüsyonu eklendi ve 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Bundan sonra hücrelerin 100× ışık mikroskobunda incelendi ve kalkmayan hücreler mekanik darbeler ile kaldırıldı. Trypsin inaktivasyonu için yarı hacimde tam bir kültür medyumu eklenerek sağlandı ve hücre solüsyonu 12 ml'lik tüplere aktarıldı, ardından 200 ×g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 5 ml tam bir kültür medyumu içinde çözdürüldü ve hemositometri lamında (Thermo, ABD) hücre yoğunluğu sayısal olarak incelendi.

2.3. Hücre sayımı

100 µl hücre süspansiyonu 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine dilüsyon faktörü 2 olmak üzere 100 µl %0.04 trypan blue boya solüsyonu eklendi ve hafiften pipetaj yapıldı. Boyanmış hücre süspansiyonu 5 dakika oda ısısında bekletildi, daha sonra hemositometri lamına 20 µl hücre suspansiyonundan yüklendi ve canlı hücreler ışık invert mikroskop altında (100× büyütme) 5 farklı bölgede sayıldı ve sayı ortalaması alındı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül uygulanarak hesaplandı:

$$1\ \text{ml'de hücre sayısı} = \text{sayılan bölgelerin ortalama sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

İleriki çalışmalar için hücreler ayrı ayrı çoğaltıldı ve 1 ml dondurma medyumu (%10 DMSO, %90 FBS) içinde sıvı azot tankında hızlıca donduruldu ve -85°C derin dondurucuda saklandı.

2.4. Kantitatif Real Time PCR (qPCR)

2.4.1. Etken Madde Muamelesi

HEK293, AGS ve MKN45 hücrelerin her birisinden yaklaşık 10^5hücre 6'lik well platelere ekildi ve 24 saat 37 ^oC'de %5 CO_2' li etüvde inkübe edildi. Hücreleri pleytlere tutunduktan sonra, eski medyumu alındı ve steril PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra hücreler 2 µg/ml tunicamycin ve 1 µg/ml CagA ile 2 saat ve 4 saat için 4 farklı kombinasyonda muamele edildi. Hücre grupları ve kombinasyonları Çizelge 2.1' de verilmiştir. Her grup hücre için etkenli yada etkensiz 1 ml medyum verildi ve 37 °C'de, %5 CO_2'lü etüvde 2 ve 4 saat inkübe edildi.

Çizelge 2.1. Tunicamycin ve CagA muamele kombinasyonları. HEK293, AGS ve MKN45 hücreleri 2 µg/ml tunicamycin (Tm) ve/veya 1 µg/ml CagA ile farklı kombinasyonda 2 ve 4 ya da 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi.

Etken madde kombinasyonları (gruplar)	Tunicamycin (Tm)	CagA
Tm-/CagA-	0	0
Tm+/CagA-	2 µg/ml	0
Tm+/CagA+	2 µg/ml	1 µg/ml
Tm-/CagA+	0	1 µg/ml

2.4.2. Total RNA İzolasyonu

Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra her 6'lık kuyucuğa 500 µl TRIzol® (Invitrogen, ABD, #: 15596-026) solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı. Hücre-TRIzol süspansiyonu 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı ve üzerine 300 µl kloroform eklendi. Tüp 5 kez

alt üst çevrilerek karıştırıldı ve 5 dakika oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda, karışım 14000 ×g de 10 dakika boyunca +4 °C'da santrifüj yapıldı ve faz ayrımından sonra oluşan şeffaf üst kısım alındı ve yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı. RNA karışımına 200 µl isopropanol ve 100 µl 1.2 molar'lik NaCl eklendi ve vortexlendikten sonra 10 dakika oda ısısında bekletildi. Sürenin sonunda, 14000 ×g devirde 15 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve pellete 1 ml %70'lik etanol eklendi ve 14000 ×g devirde 5 dakika boyunca +4 °C'de tekrar santifüj yapıldı. Sürenin sonunda süpernatant tamamen alındı ve RNA pelleti kurumaya bırakıldı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra RNA pelleti 50 µl ddH_2O eklenerek sulandırıldı ve 10 dakika boyunca 55 °C'de inkübe edildi. RNA konsantrasyonu mikro-spectrophotometer cihazında ölçüldü ve kalite kontrolü için Aligent 2100 Bioanalyzer® electropherogram sisteminde 0.5 µg RNA örneği yürütülerek 18S ve 28S RNA'sı görüntülendi (Aligent, ABD). İzole edilen RNA bekletilmeden cDNA sentezinde kullanıldı yada kullanılana kadar -85°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.4.3. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA oluşumu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis (Roche, Almanya, #: 05091284001) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için oda ısısında bir tüp içerisine 2 ng RNA, 50 pmol (final konsantrasyon 2.5 µM) oligo$(dT)_{18}$ primer ve 11.6 µl'ye tamamlayacak miktarda ddH_2O eklendi ve denatürasyon için 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda karışıma sıra ile 4 µl 5× RT buffer, 20 unite RNase inhibitörü, 2 µl 10 mM'lik dNTP karışımı, 1 µl dithiothreitol (DTT) ve 10 unit Reverse Transcriptase enzimi eklendi ve karışım yavaşca karıştırıldı. cDNA sentezi için karışım 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi, ardından enzim inaktivasyonu için 85°C'de 5 dakika tutuldu. Sentezlenmiş cDNA alikotlanarak kullanılıncaya kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

2.4.4. Primer Dizaynı

ATF4, *CHOP*, *GRP78*, *GRP94*, ve *GAPDH* genlerine spesifik primer Integrated DNA Technology (IDT) PrimerQuest online programı (http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index) kullanılarak dizayn edildi. Primer dizileri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Primerler Biomers Inc. (Ulm, Almanya) firması tarafından sentez edildi.

Çizelge 2.2. Real time qPCR gen ekspresyonunda kullanılan primer dizileri.

Primer ismi	**Primer Dizisi**	**GeneBank No.**
ATF4 - Forward	5′-TGGCTGGCTGTGGATGG-3′	NM_001675.2
ATF4 - Reverse	5′-TCCCGGAGAAGGCATCCT-3′	
CHOP - Forward	5′-AGAACCAGCAGAGGTCACAA-3′	NM_001195053.1
CHOP - Reverse	5′-TCTTCCTCCTCTTCCTGA -3′	
GRP78 - Forward	5′-GGTGGATCACAAGGTCAAGAG-3′	NM_005347.4
GRP78 - Reverse	5′-CTACCACGCCCAGCTAATTT-3′	
GRP94 - Forward	5′- CCCACATCTGCTCCACGTG-3′	NM_003299.2
GRP94 - Reverse	5′-CACGGCGCACATAGAGCTT-3′	
GAPDH - Forward	5′-CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3′	NM_002046.4
GAPDH - **Reverse**	5′-CTGTTGAAGTCAGAGGAGACCA-3′	

2.4.5. Real Time PCR Prosedürü

cDNA kullanılarak gen ekspresyon analizini gerçekleştirmek için Rotor Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazı kullanıldı. Bunun için buz aküsü üzerindeki tüp içerisine 12,5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Kanada) , 10 pmol (final konsantrasyon 0.3 µM) forward ve reverse primer, ≤500 ng olacak şekilde daha önceden alikotlanan ve buz üzerinde çözdürülen cDNA ilave edildi ve 25 µl'ye tamamlayacak miktarda ddH_2O eklendi. PCR' ın her bir bileşeni nazikçe tüpe ilave edildi ve örnekler cihaza yerleştirilerek program başlatıldı. Real Time RT-PCR şu programda gerçekleştirildi: ilk denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, 45 siklus olacak şekilde amplifikasyon 95 ºC'de 30 saniye, 63 ºC'de 60 saniye ve 72 ºC'de 30 saniye, melting curve analizi ise PCR ürününün spesifitesini ve özdeşliğini belirlemek için 60

ºC'den 95 ºC'ye kadar 1 derece artırılarak her derecede 5 saniye ile green filtresinde yapıldı. Bu PCR protokolünde hem housekeeping genin hem de hedef genin optimizasyonu yapıldı. Optimize deneyler 2 kez tekrarlandı.

Uygun housekeeping genin *GAPDH* olup olmadığını belirlemek için ise 93 baz çifti'lik *GAPDH* DNA, hedef cDNA'dan klasik PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Daha sonra, PCR ürünü isoproponal yöntemi ile presipite edildi ve saf 93 baz çifti uzunluğunda GAPDH DNA'sı elde edildi. GAPDH DNA miktarı spektrofotometer cihazında ölçüldü ve 800 ng/µl olarak tespit edildi. GAPDH DNA kopya sayısını ortaya koymak için aşağıdaki formül kullanıldı;

µl de DNA sayısı = konsantrasyon (ng/µl) × (6.022×10^{23}) / fragman uzunluğu (bp) × $10^{9}\times$ 650

GAPDH DNA'sı 5 farklı logaritmik konsantrasyonda sulandırıldı. Her bir dilüsyondan GAPDH spesifik primerler ile qPCR yapıldı. Optimize olan dilüsyona bağlı GAPDH qPCR bulguları standart olarak kullanılmak üzere ekspresyon standart eğrileri elde edildi. qPCR sonuçlarını dikkate alarak ekspresyon standart eğrisi çizildi ve ΔCt 'ye göre cDNA kalıp sayıları hesaplandı. Bu değer hedeflenen diğer genlerin ekspresyon analizlerinde standart olarak kullanıldı. PCR etkinlik derecesi (efficiency), *E =-1+ 10^(-1/slope)* formülü kullanılarak hesaplandı. Daha sonra rölatif gen ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı. Önce her bir grup için hedef gen ve housekeeping gen'den alınan Ct değerlerinin ortalaması alındı. Δct aşağıdaki formul ile hesaplandı:

Δct = hedef gen ortalama Ct - housekeeping gen ortalama Ct.

Bunun $2^{\Delta\Delta ct}$ 'si hesaplandı. Her bir grubun verileri elde edildi ve istatistik analizine geçilerek gruplar arasındaki ilişki araştırıldı.

2.5. XBP1 mRNA İşlenmesi

2.5.1. Primer Çifti

İşlenmiş ve işlenmemiş XBP1 mRNA'sı ortak PCR primer çifti ile çoğaltıldı. Forward primer dizisi 5'-TTACGAGAGAAAACTCATGGCC-3' ve reverse primer dizisi ise 5'-GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC-3' olarak çalışıldı. Primer dizisi literatürden elde edildi (Samali ve ark 2010) ve Biomers Inc. (Ulm, Almanya) firmasında sentez edildi.

2.5.2. PCR Protokolü

30 µl son PCR karışımında 1.5 mM Mg^{++}, 200 µM dNTP karışımı, 10 pmol primer karışımı, 100 ng cDNA ve 0.5 unite Taq polimeraz enzimi kullanıldı. Karışımın bütün maddeleri Vivantis Technologies (Vivantis, Malezya) firmasından temin edildi. PCR running protokolü şöyledir: Genel denatürasyon: 94 °C'de 3 dakika (bir döngü)-35 döngüde denatürasyonu: 94 °C'de 30 saniye, primer bağlanması: 63°C'de 30 saniye, uzatma: 72 °C'de 30 saniye -son uzatma: bir döngü72 °C'de 7 dakika.

2.5.3. SDS-PAGE Jel DNA Dikey Elektroforezi

PCR ürünü %8 yoğunluğunda poliakrilamid mini jelde yürütüldü ve 263 baz çifti'lik işlenmiş ve 289 baz çifti'lik işlenmemiş XBP-1 fragmanları incelendi. %8 jel için 15 ml ddH_2O, 7.5 ml 1.5 M'lik Tris-HCl, pH 8.8, 0.15 ml %20'lik SDS, 8 ml %30'lik akrilamid, 0.15 ml %10'lik ammonium persulfate (PSA) ve 20 ul TEMED karışımı hazırlandı ve 1.0 mm kalınlıkta mini jel kabına (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., #: 165-8001) yüklendi. Jel tutunduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve 2 µg (4 µl) PCR ürünü 4 ul 6× loading dye ile karistirldiktan sonra her kuyucuğa toplam 8 µl örnek yüklendi ve 40 mA elektrik akımında yaklaşık 1 saat boyunca yürütüldü. Sürenin sonunda jel kabından çıkarıldıve 5 dakika dH_2O'da yıkandı ve 15 dakika boyunca oda ısısında 50 ml 1 µg/ml ethidium bromide solüsyonunda boyandı. Boya işleminden sonra jel 5 dakika distile suda yıkandı ve jel dökümantasyon cihazında (Bio-Rad Laboratories, Inc., ABD) UV ışık altında

görütülenlendi. Kantitatif bant yoğunluğu ImageJ v.1.47 (NIH, ABD) programını kullanılarak elde edildi.

2.6. İmmünofloresans Assay

Her deney için 2 steril immunofloresans slayt, 12'lik well plate'lere yerleştirildi ve üzerine 5×10^4 hücre 0.5 ml tam bir kültür medyum içinde ekildi. Hücreler 24 saat 37 °C'de %5 CO_2'li slayt üzerine tutununa kadar inkübe edildi. Yirmi saat sonra hücreler PBS ile iki kez yıkandı ve üzerine etkenli maddeli/etken maddesiz 0.5 ml medyum eklendi, 2 ve 4 saat aynı kültür koşullarında inkübe edildi. Her hücre tipi için 8 farklı etken kombinasyonu uygulandı. Deney grupları ve etken madde kombinasyonu tablo 2.1' de verilmiştir. İki ve 4 saatler sonunda slaytlar iki kez PBS ile yıkandı ve %100 soğuk metanol içinde 15 dakika -20 °C'de inkübe edildi. Fiksasyon sonrası slaytlar 3 kez 5 er dakikalık 1x TBST (10x TBS: 30 g Tris, 88 gr NaCl, 5 ml Tween20, 950 ml dH_2O, pH 7.4) içinde yıkandı ve %1 BSA (1 g BSA, 100 ml TBST) solüsyonunda bir saat boyunca oda ısısında ve 50 rpm ajitasyonda bloklama işlemi gerçekleşti. Bloklama sonrası slaytlar 3 kez 5'er dakikalık TBST içinde yıkandı ve 2 µg/ml konsantrasyonlu rabbit anti ATF6 (N-terminous) IgG antibadi (Santa Cruz Biotechnology, Inc., #:sc-22799) solüsyonunda gece boyunca +4 °C de ve 50 rpm ajitasyonda inkübe edildi. Ertesi gün slaytlar tekrar 3 kez 5'er dakikalık TBST içinde yıkandı ve bu sefer 2 µg/ml goat anti-rabbit IgG FITC konjugeli antibadi (Santa Cruz Biotechnology, Inc., #:sc-2012) solüsyonunda oda ısısında 2 saat boyunca, 50 rpm ajitasyonda ve karanlık ortamda inkübe edildi. Sürenin sonunda slaytlar 3 kez 5'er dakikalık TBST içinde yıkandı ve 10 µl 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile boyandı ve fluoresan mikroskop (Nikon, Japonya) altında 200× büyütmede incelendi ve fotograflarıalındı.

2.7. MTT Assay Proliferasyon Analizi

Yaklaşık 10^4 hücre 100 µl kültür medyumu içinde 96'lik well plate'e eklendi ve 48 saat 37°C, %5 CO_2 etüvde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda eski medyum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, farklı kombinasyonlu etken

madde içeren 100 µl medyum ile 24, 48 ve 72 saat muamele edildi (etken madde kombinasyonları tablo 2.1' de verilmiştir). Süre sonunda her kuyucuğa 10 µl 12 mM' lik Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT; Sigma Aldrich® #: M2128) solüsyonu eklendi ve 4 saat 37 °C, %5 CO_2 etüvde inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı ve yerine 50 µl DMSO eklendi ve 37 °C, %5 CO_2 etüvde 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası karışım yumuşakça pipetaj yapılarak mavi kristallar çözüldü ve micro-plate reader cihazında (Biotek, ABD) 490 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü**.**

2.8. Trypan Blue Canlılık Testi

Yaklaşık 4 × 10^5 HEK293 hücresi 24 well-plate'lere ekildi ve komplet RPMI1640 medyomda 24 saat 37 °C/%5'li etüvde inkübe edildi. Hücreler tabana tutunduktan sonra eski medyom atıldı ve farklı kombinasyonda 2 µg/ml Tm ve 1 µg/ml CagA içeren 500 µl taze medyom hücrelere eklendi ve 24 saat ayni inkübasiyon koşullarında kültür edildi. Süre sonunda eski medyom atildi ve 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra her Well icin 500 µl %0.25 tripsin enzimi eklenerek hücreler kaldırıldı. Her Well'e 500 µl komplet medyom eklenerek tripsin nötrleştirildi. Hücre suspansyonu 1.5 ml'lik tuplere aktarıldı ve 200 ×g'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Supernatant atildi ve hücre peleti 1 ml PBS ile bir kez yıkandı ve aynı devide santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı ve hücre peletine 100 µl medyom eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Hücre suspansyonu üzerine 100 µl %0.04 trypan blue boyasi eklendi ve yukarıda bahs edilmiş yöntem ile toplam, canlı ve ölü hücre sayısı hesaplandı (Bkz. bölüm 2.3).

2.9. İstatistik Analizleri

Etken madde ile muamele edilmiş çalışma grupları negative kontrol olan muamelesiz gruplar ile istatistiki karşılaştırma yapıldı ve anlamlılık *P* değeri hesaplanarak incelendi. Gruplar içi farklılık student's *t* testi (two-tailed distribution) ve gruplar arası farklılık varyans analizi (ANOVA) uygulanarak araştırıldı. Bütün istatistik

işlemleri GraphPad Prism® V.5.00 (GraphPad software Inc.) programı kullanılarak gerçekleştirildi. $P<0.05$ istatistiksel fark olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

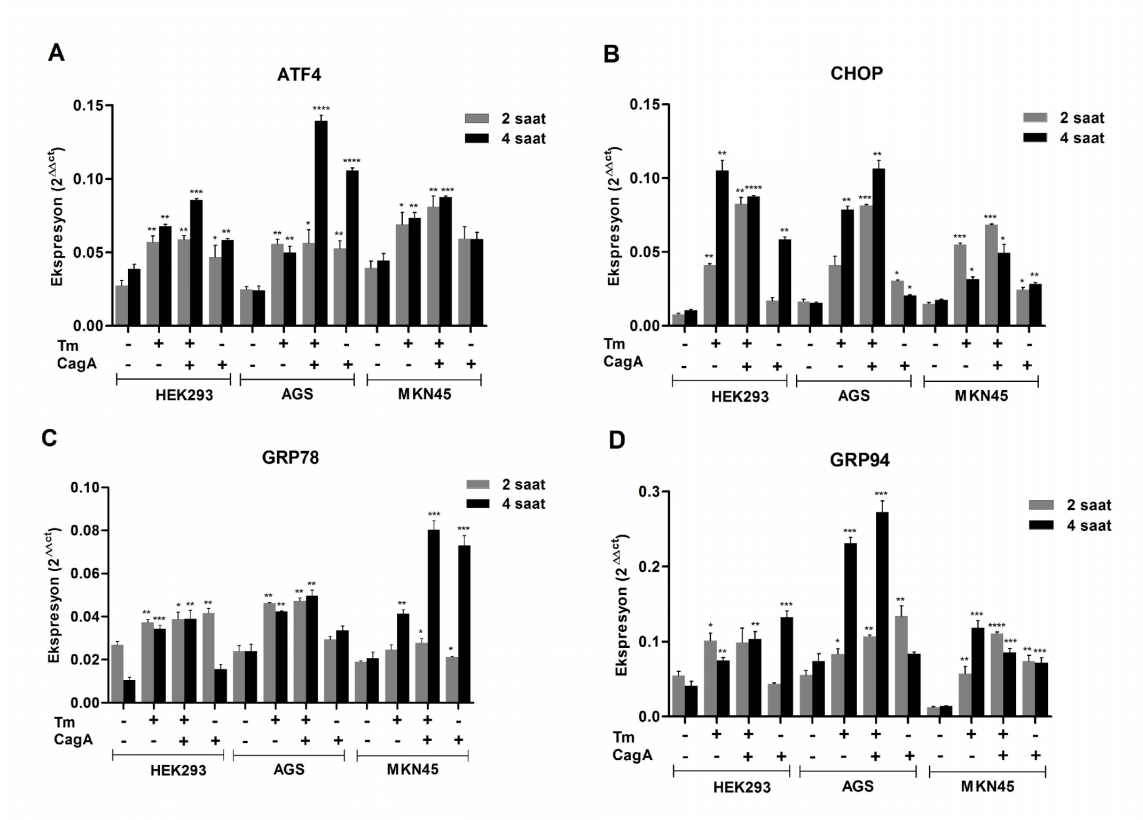
3.1. Eksojn CagA UPR Genlerin Transkripsyonunu Artırır

RNA izolasyon işleminin doğruluğunu kontrol etmek için HEK293 hücresinden izole edilmiş total RNA %0.75 agaroz jel elekteroforez ve Bioanalyser® electropherogram sisteminde yürütüldü ve görüntüsü alındı. RNA kalite kontrolü için 28S ve 18S RNA kullanıldı (Bkz. EK 2). Şekilde göründüğü gibi 28S ve 18S RNA net bir şekilde görülmektedir. Bu durum, total RNA izolasyonun sağlam ve güvenilir şekilde gerçekleştiğini ve intakt RNA elde edildiğini göstermektedir (Ek 2).

ATF4, *CHOP*, *GRP78*, *GRP94* ve *GAPDH* genlerinin mRNA amplifikasyon, primer etkinliği ve konsantrasyon standart eğrisi Ek3'de verilmiştir (Bkz. Ek 3). Standart eğrilere göre Ct ve hedef cDNA konsantrasyonu arasında ters ilişki görülmektedir. Bu durum, kantitatif çalışmaların güvenirliği olduğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Ek 3).

UPR sinyal yolağında up–regule olan *ATF4* ve *CHOP* genleri ve bu yolağının hedefi olan ER şaperonları *GRP78*, *GRP94* ve gen ekspresyonu, sinyalin aktif olduğu durumda artar. Mevcut çalışmada UPR yolağı aktivasyonuna belirteç olarak bu genlerin mRNA ekspresyon seviyesi tunicamycin ve CagA ile muamele edilmiş hücrelerde incelenmiştir. Bu genlerinin kantitatif real time PCR gen ekspresyon sonuçları grafik olarak şekil 3.1'de verilmiştir.

Pozitif kontrol olarak sırf 2 µg/ml tunicamycin (Tm+/CagA-) ile muamele edilmiş pozitif kontrol gruplarında *ATF4* ($P < 0.001$), *CHOP* ($P < 0.01$), *GRP78* ($P < 0.01$) ve *GRP94* ($P < 0.001$) gene transkripsiyonu artmıştır (Şekil 3.1). Ayrıca 2 µg/ml tunicamycin ve 1 µg/ml CagA'yı birlikte verdiğimiz hücre gruplarında (Tm+/CagA+) ilgili genlerin transkripsiyon seviyesi sadece tunicamycin verdiğimiz gruplara (Tm+/CagA-) benzer bir değişiklik gözlenmiştir ($P > 0.05$) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1.UPR hedef genlerin kantitatif real time PCR ekspresyon düzeyi. HEK293, AGS ve MKN45 hücreleri 2 µg/ml tunicamycin (Tm) ve 1 µg/ml CagA protein ile farklı kombinasyonda 2 ve 4 saat boyunca muamele edildi, daha sonra total RNA TRIzol® ile izole edildi ve oligo $(dt)_{28}$ primeri kullanilarak RT-PCR ile cDNA'ya cevirildi ve ATF4 (A), CHOP (B), GRP78 (C) ve GRP94 (D) mRNA miktarı real time PCR tekniği kullanılarak incelendi. Sıfır doz (-) tunicamycin ve sıfır doz (-) CagA negatif kontrol olarak kullanıldı. Deneyler 3'şerli çalışılmıştır. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

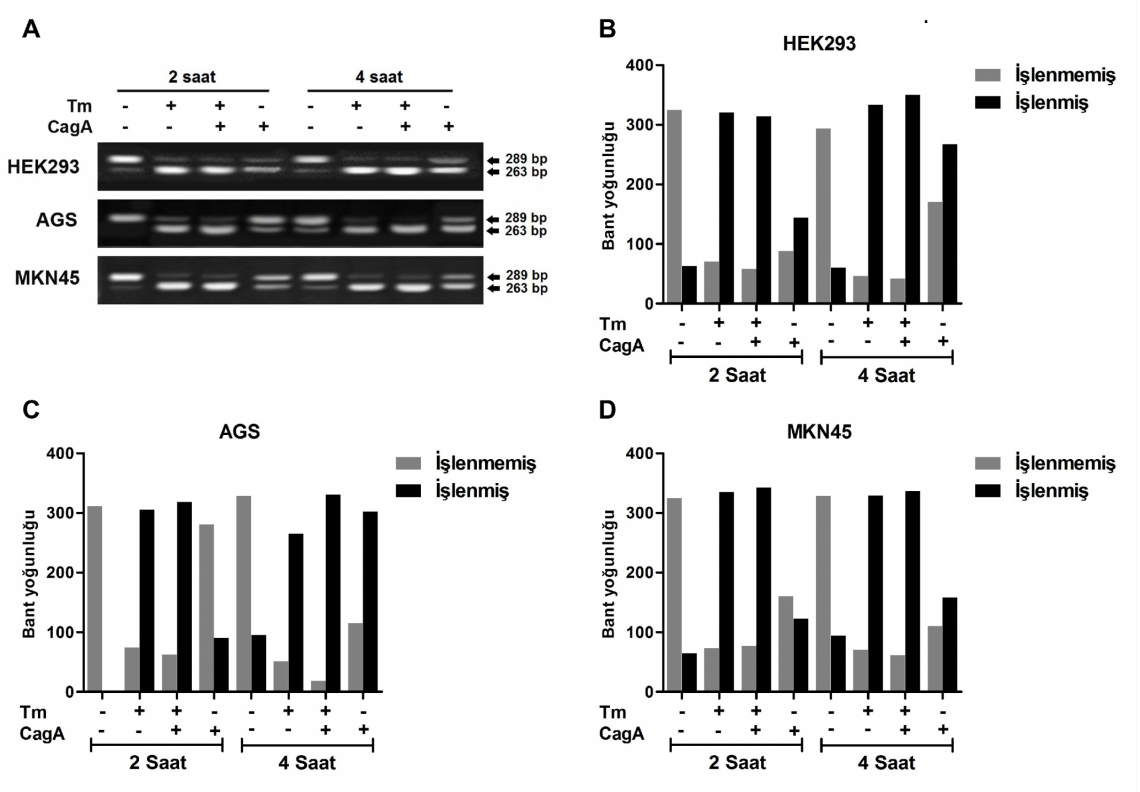
Sırf CagA ile 2 saat muamele edilmiş HEK293 hücrelerinde (Tm-/CagA+) *ATF4* ($P = 0.0113$) ve *GRP78* ($P = 0.0053$) genlerin transkripsiyonu artmıştır (Şekil 3.1A ve C) ancak diğer genlerin transkripsiyonunda anlamlı bir artış gözlenmedi ($P > 0.05$) (Şekil 3.1B, D ve E). Bu hücrelerde, 4 saat muamele sonunda ise *ATF4* ($P = 0.0040$), *CHOP* ($P = 0.0011$) ve *GRP94* ($P = 0.0005$) genlerinin transkripsiyonunun yüksek bir derecede arttığı (Şekil 3.1A, B ve D) ancak *GRP78* gen transkripsiyonunda anlamlı bir seviyede artış olmadığı tespit edildi ($P > 0.05$) (Şekil 3.1C).

Sadece CagA ile muamele yapılmış AGS hücrelerinde ise (Tm-/CagA+) 2 saat muamele sonunda *ATF4* ($P = 0.0070$) *CHOP* ($P = 0.0125$) ve *GRP94* ($P = 0.0060$) gen transkripsiyon seviyesinin yükseldiği tespit edildi (Şekil 3.1A, B, ve D) ancak *GRP78* transkripsiyonunda anlamlı bir fark saptanmadı ($P > 0.05$). Ayrıca 4 saat muamele sonunda, sadece *ATF4* ($P < 0.0001$) ve *CHOP* ($P = 0.0194$) transkripsiyonunun artışı tespit edildi (Şekil 3.1A ve B) ancak genlerde herhangi bir artiş söz gözlenmedi ($P > 0.05$).

MKN45 hücrelerinde ise 2 saat boyunca sadece CagA ile muamele edilmiş gruplarda (Tm-/CagA+) *CHOP* ($P = 0.0283$), *GRP78* ($P = 0.0249$) ve *GRP94* ($P = 0.0012$) transkripsiyonunda arttığı (Şekil 3.1B, C ve D) ancak diğer genlerde ise anlamlı bir ekspresyon farkı olmadığı saptandı ($P > 0.05$). Dört saat muamele sonunda ise *CHOP* ($P = 0.0095$), *GRP78* ($P = 0.0007$), ve *GRP94* ($P = 0.0009$) genlerinin transkripsiyon seviyelerinde artış tespit edildi (Şekil 3.1B, C ve D) ve *ATF4* için anlamlı bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$).

3.2. Eksojn CagA XBP1mRNA İşlenmesini Tetikler

UPR sinyali yolağı aktif olduğu zaman, önemli transkripsiyon faktörü olan *XBP1* genin mRNA'sı IRE1 proteini tarafından işlenir ve 26 baz çiftlik parça çıkarıldıktan sonra olgunlaşmamış XBP1 mRNA olgun mRNA'ye ve proteine dönüşür (Şekil 1.3). Burada XBP1 mRNA işlenmesi tunicamycin ve CagA ile muamele edilmiş hücreler de PCR yöntemi kullanılarak incelendi. PCR sonucunda 263 baz çifti'lik işlenmiş ve 289 baz çifti'lik işlenmemiş XBP1 çoğaltıldı ve SDS-PAGE yöntemi ile tespit edildi. Deney sonuçları şekil 3.2'de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, 2 ve 4 saat etken madde muamelesiz (Tm-/CagA-) negatif kontrol hücrelerinde XBP1 mRNA'sı işlenmemiş (289 bp) haldeki formunun işlenmiş formundan daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 3.2). Bunun aksine, UPR pozitif kontrol olan 2 µg/ml tunicamycin ile muamele edilmiş hücrelerde (Tm+/CagA-) işlenmiş XBP1 (263 bp) işlenmemiş formundan daha fazla olduğu saptandı. Ayrıca tunicamycin ve CagA ile birlikte hücrelere verildiğinde (Tm+/CagA+) pozitif kontrole benzer sonuçlar elde edildi.

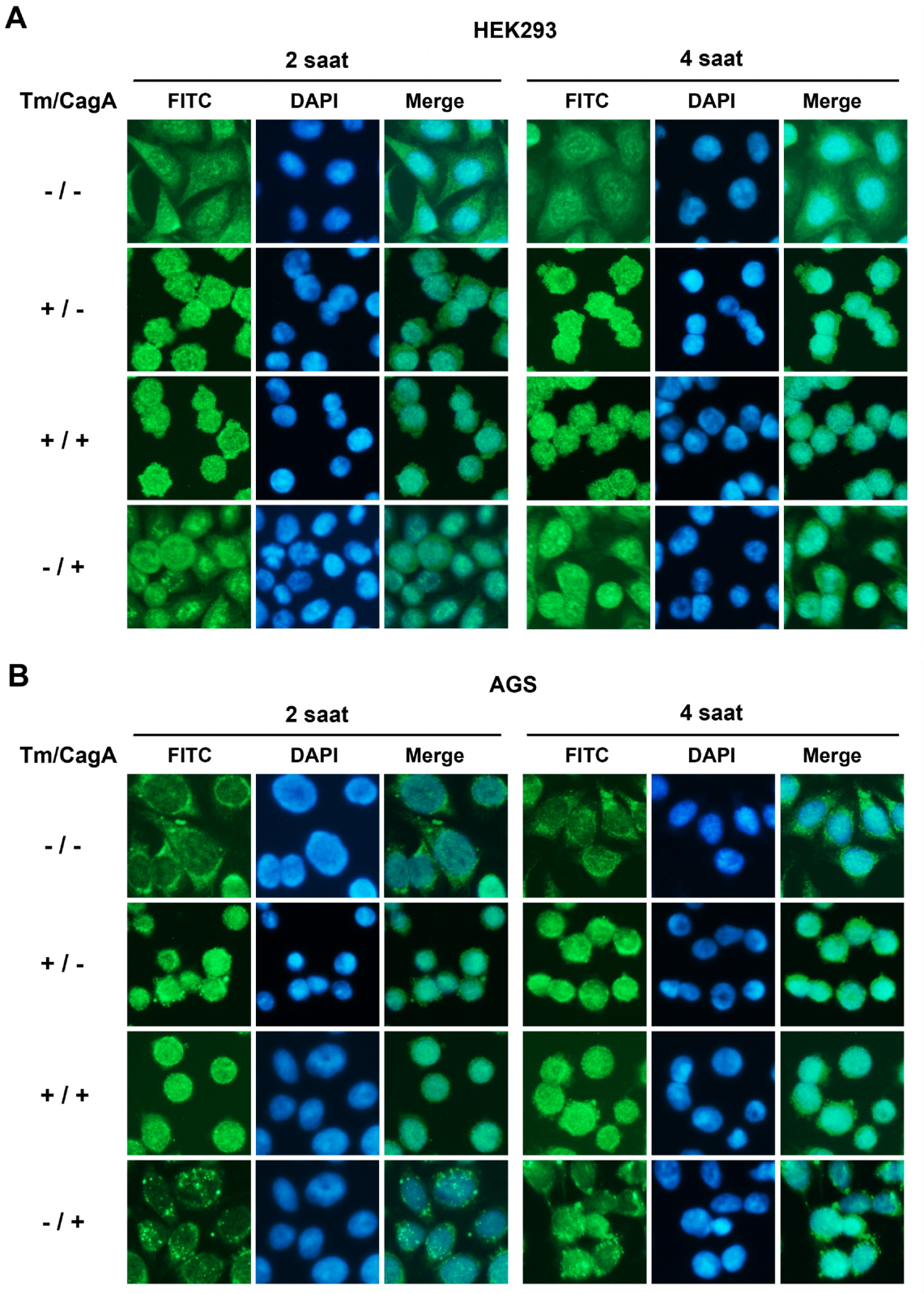


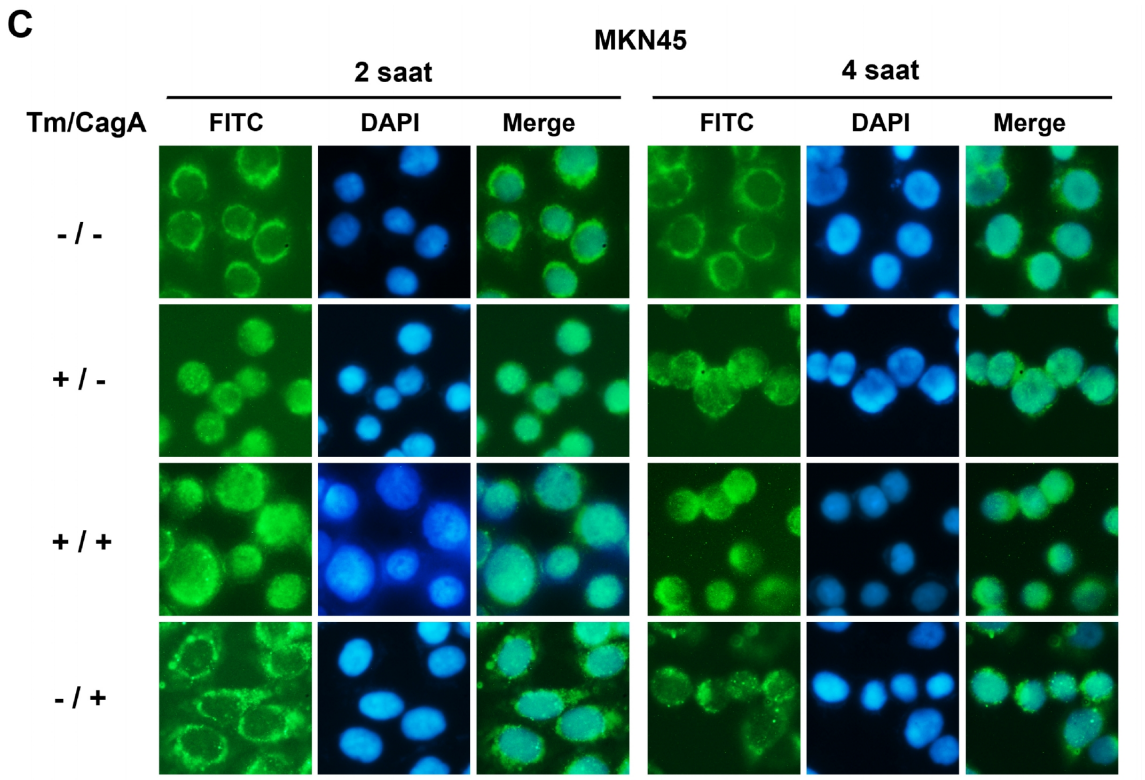
Şekil 3.2. XBP1 mRNA'sının işlenmesi. (A) HEK293, AGS ve MKN45 hücreleri 2 µg/ml tunicamycin (Tm) ve 1 µg/ml CagA protein ile farklı kombinasyonda 2 ve 4 saat boyunca muamele edildi ve total RNA'sı TRIzol® ile izole edildi ve oligo $(dt)_{18}$ primeri ile RT-PCR yapılarak cDNA'ya çevrildi. XBP1 DNA'si PCR yapılarak 289 baz çifti'lik (işlenmemiş) ve 263 baz çifti'lik (işlenmiş) uzunluğunda XBP1 fragmanı çoğaltıldı. Fragmanlar arasındaki 26 baz çifti farkı saptama amacıyla PCR ürünü %15 SDS-PAGE jelinde dikey elektroforez yapıldı ve UV transilüminatörde görüntülendi. (B) HEK294, (C) AGS ve (C) MKN45 hücrelerinde işlenmiş ve işlenmemiş XBP1 kantitatif mRNA mktarı. Sıfır doz (-) tunicamycin ve sıfır doz (-) CagA negatif kontrol olarak kullanıldı.

(Şekil 3.2). Sırf 1 µg/ml CagA ile muamele edilmiş hücrelerde (Tm-/CagA+), negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 263 baz çifti uzunluğunda işlenmiş XBP1 miktarının arttığı tespit ediddi (Şekil 3.2). CagA etkisi altında XBP1 mRNA'sının işlenmesi, 4 saat muamele sonrasında ise daha bariz görülmüştür (Şekil 3.2). Bu bulgular, 1 µg/ml CagA proteini HEK293, AGS ve MKN45 hücrelerinde XBP1 mRNA işlenmesinin artırtığını göstermektedir.

3.3. Eksojen CagA ATF6 Protein Translokasyonunu Tetikler

UPR yolağının önemli yolaklarından birisi ATF6 transmembran proteinin transkripsiyon faktörü olan N-terminus ATF6 hücre ER zarından çekirdeğe transloke olmasıdır (Şekil 1.3). Mevcut çalışmada, ATF6 translokasyonu, ATF6 N-terminus epitopuna spesifik birinci antibadi ve FITC (yeşil flüoresan boya) ile konjuge ikinci antibadi kullanarak immunofloresans tekniği ile incelendi. Şekil 3.3'de ATF6 immünofloresans boyama sonuçları gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak tunicamycin ve CagA ile muamele edilmeyen (Tm-/CagA-) bütün hücre tipinde ve 2 ve 4 saat muamele süresinde ATF6 proteini hücre ER zarında bulunmaktadır (ER organel boyaması yapılmamıştır) ve sitoplazmada yayılmış durumda görülmektedir. Bu görüntü ATF6 translokasyonunun gerçekleşmediğini göstermektedir (Şekil 3.3). UPR pozitif kontrol olarak, 2 µg/ml tunicamycin ile 2 ve 4 saat muamele edilmiş hücrelerde (Tm+/CagA-), ATF6 proteininin hücre çekirdeğine tam bir şekilde transloke olduğu şeklinde değerlendirilmektedir. İki µg/ml tunicamycin ve 1 µg/ml CagA kombinasyon muamelesi yapılmış hücrede (Tm+/CagA+) ise benzer bir şekilde ATF6 tam translokasyonu her üç hücre tipinde de tespit edilmiştir (Şekil 3.3). Ayrıca bu gruplarda negatif kontrola (Tm-/CagA-) göre ATF6 ekspresyonunda bir artış söz konusudur (kantitatif analizi yapılmamıştır). Sırf CagA ile muamele edilmiş tüm hücre hatlarında (Tm-/CagA) hem 2 ve hem 4 saat muamele sürelerinde translokasyon saptanmıştır (Şekil 3.3).

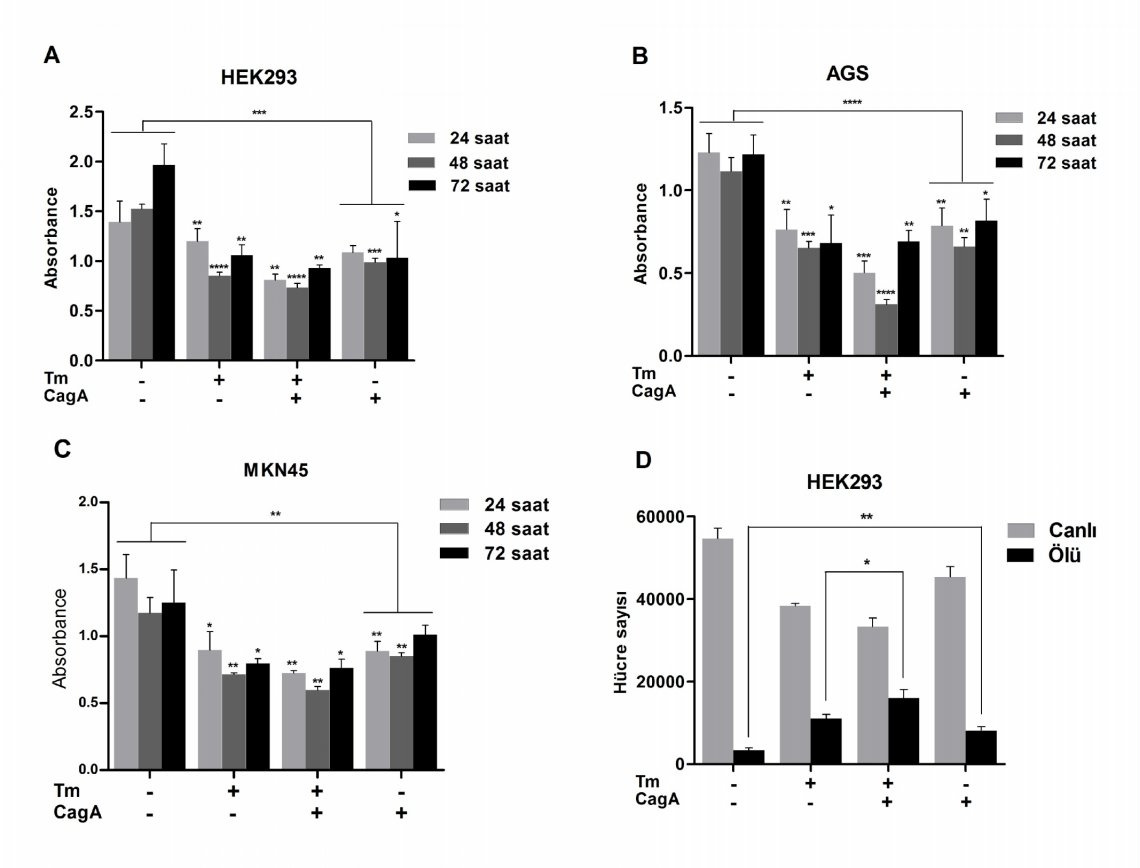

A
HEK293
2 saat
4 saat
Tm/CagA
FITC
DAPI
Merge
FITC
DAPI
Merge
- / -
+ / -
+ / +
- / +
B
AGS
2 saat
4 saat
Tm/CagA
FITC
DAPI
Merge
FITC
DAPI
Merge
- / -
+ / -
+ / +
- / +



Şekil 3.3. ATF6 protein translokasiyonu. HEK293 (A), AGS (B) ve MKN45 (C) hücreleri lamel üzerinde kültür edildi. Daha sonra 2 µg/ml tunicamycin (Tm) ve 1 µg/ml CagA protein ile farklı kombinasyonda 2 ve 4 saat boyunca muamele edildi. Sürenin sonunda metanolile fiksasyon yapıldı. Ardından hücreler birinci antibadi olarak anti-ATF6 IgG ve ikinci antibadi olarak da FITC (yeşil flöresan boya) konjugeli IgG ile reaksiyonu muamele edildi. Çekirdek DAPI ile boyandı ve 400× büyütmede immünofloresans mikroskopta incelendi. Sıfır doz (-) tunicamycin ve sıfır doz (-) CagA negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.4. Eksojen CagA Hücre Proliferasyonunu Baskılar

HEK293, AGS ve MKN45 hücreleri tunicamycin ve CagA ile farklı kombinasyonda 24, 48 ve 72 saat muamele edildi proliferasyon durumu MTT assay tekniği ile incelendi. Pozitif kontrol olarak 2 µg/ml tunicamycin ile muamele edilmiş (Tm+/CagA-) her üç hücrede negatif kontrole (Tm-/cagA-) göre proliferasyonunun 24 ($P < 0.01$), 48 ($P < 0.001$) ve 72 ($P < 0.01$) saat muamele sonunda azaldığı tespit edildi



Şekil 3.4. Hücre canlılık ve ölüm seviyesi . Yaklaşık 10^4 sayıda AGS (A), MKN45 (B) ve HEK293 (C) hücreleri üçerli gruplarda 96'lık well plate'lere ekildi ve 24 saat sonra 2 µg/ml tunicamycin (Tm) ve 1 µg/ml CagA protein ile farklı kombinasyonda 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. Süre sonunda canlı hücre miktarı MTT assay uygulaması ile 490 nm dalga boyunda absorbansı incelendi. (D) 24 saat Tm ve CagA ile muamele edilmiş HEK293 hücrelerin Trypan Blue assay sonucundaki canlı ve ölü hücre sayıları. Sıfır doz (-) tunicamycin ve sıfır doz (-) CagA negatif kontrol olarak kullanıldı. Deneyler 3'şerli çalışılmıştır. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001.

(Şekil 3.4A, B ve C). Muamele süresinden bağımsız olarak bu gruplar karşılaştırdığımızda ciddi bir proliferasyon düşüşü gözlenmiştir (HEK293 P = 0.0001, AGS P < 0.0001, MKN45 P = 0.0003).

Tunicamycin ve CagA bileşimini birlikte verildiğinde de (Tm+/CagA+) 24 ($P < 0.01$), 48 ($P < 0.0001$) ve 72 saat ($P < 0.01$) muamele neticesinde proliferasyon düşüşü tespit edilmiştir. Muamele süresinden bağımsız olarak hücre proliferasyon farkı her üç hücre tipinde anlamlı bir azalma gözlendi (HEK293 $P < 0.0001$; AGS $P < 0.0001$; MKN45 $P < 0.0001$) (Şekil 3.4A, B ve C).

Ayrıca HEK293 hücrelerine sırf CagA verildiğinde (Tm-/CagA+) 24 saat sonrasında proliferasyonunda anlamlı bir değişik gözlenmedi ($P > 0.05$), ancak 48 ($P = 0.0001$) ve 72 ($P = 0.0182$) saat muamele sonucunda proliferasyonda anlamlı bir düşüş tespit edildimiştir (Şekil 3.4A). AGS hücrelerinde ise 24 ($P = 0.0077$), 48 ($P = 0.0014$) ve 72 ($P = 0.0170$) saat CagA ile muamelesi neticesinde proliferasyon düşüşü saptanmıştır (Sekil 3.4B). Proliferasyonda azalma MKN45 hücreleri için 24 ($P = 0.0077$) ve 48 ($P = 0.0090$) saat muamelesi sonucunda görülmüştur (Şekil 3.4C). Bununla birlikte, tüm hücrelerde muamele süresinden bağımsız olarak CagA etkisi sonucunda hücre proliferasyonunda ciddi bir azalma tespit edildimiştir (HEK293 $P = 0.0001$; AGS $P < 0.0001$; MKN45 $P = 0.0015$) (Şekil 3.4A, B ve C).

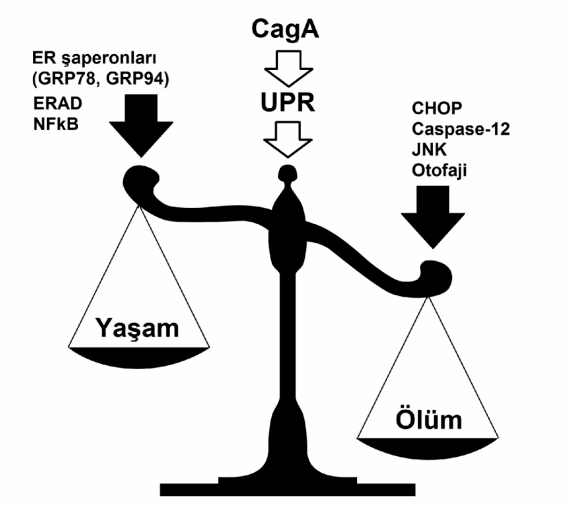
Bu proliferasyon azalmanın hücre ölümu sonucunda gerçekleşdiğini araştırmak için aynı Tm ve CagA kombinasyonu ile 24 saat boyunca muamele edilmiş HEK293 hücreleri üzerine trypan blue canlılık testi uygulndı. Sonuçta hem Tm ($P = 0.0003$) ve hem de CagA ($P = 0.0022$) muamelesi neticesinde hücre ölümü tespit edildi (Şekil 3.4D). Ayrıca Tm ve CagA bileşimi ile muamele edilmiş hücrelerde sadece Tm ile muamele edilmiş hücrelere göre daha fazla hücre ölümü saptanmıştır ($P = 0.0179$) (Şekil 3.4D).

4. TARTIŞMA

Literatürde Hp CagA'nın mide hücrelerini nasıl tümörleşmeye sevk ettiği ile ilgili bazı mekanizmalar ortaya konmuştur. Ancak bu mikrobiyal onko-proteinin hücre UPR üzerinde etkisi perde arkasında kalmış, herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Peptik ülser ve onun ardından gastrik kanser oluşumunda Hp'nin moleküler patolojisine temeline bakacak olursak, CagA proteinin bakteri tarafından IV. salgı sistemi ile konakçı mide epitel hücre içine salgılanır (Backert ve ark 2000). Mevcut tez çalısmasında eksojen rekombinant C-terminus Hp CagA'nın gastrik kanser kökenli AGS ve MKN45 hücreleri ve aynı zamanda kontrol hücre hattı olan HEK293 hücresinde UPR yolağı araştırıldı. Bunun için IRE1 yolağını XBP1 mRNA'sının işlenmesi, PERK yolağını ATF4 ekspresyonu ve ATF6 yolağını N-terminus ATF6'nın translokasyonunun inceledik. Ayrıca bu yolakların hedef genleri olan *ATF4*, *CHOP*, *GRP78* ve *GRP94* genlerinin transkripsiyon seviyesi kantitatif olarak incelendi.

Unfolded Protein Response yolağı tümörleşme sürecinde hücreler için risk aynı zamanda hücreyi koruyan bir sistem olduğu tartışma konusudur. Normal hücre fizyolojisinde ER lümeninde birikmiş olan katlanmamış proteinlerden kurtuluşu ve hücrenin hayata tutunması için UPR yolağının hedef genlerinin up-regülasyonu gerekmektedir (Schroder ve Kaufman 2005, Ron ve Walter 2007). UPR yolağında ER şaperon genleri aracılığıyla hücreyi hayatta tutma ve CHOP ve ATF4 transkripsiyon faktörları aracılığıyla da hücreyi ölüme götürmektedir. Böylece UPR, aynı zamanda yaşam ve ölüm sistemlerini birlikte harekete geçirerek yaşam ve ölüm arasındaki dengeyi sağlar ve bu dengenin sonucunda hücre aşırı çoğalması ve gereksiz yere ölümü engellenmiş olur (Haze ve ark 1999, Shen ve ark 2002, Okada ve ark 2002). Bizim sonuclara göre ise eksojen CagA, hücrede UPR uyarmaktadir. Bu durum, eksojen CagA ile muamele edilmiş hücrelerde *ATF4*, *CHOP*, *GRP78*, ve *GRP94* genlerinin ekspresyonunun artışı, XBP1 mRNA işlenmesi ve N-terminus ATF6 proteini'nin translokasyonu ile görmekteyiz (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3). Bu bulguların yanısıra hücre proliferasyon ve HEK293 ölüm seviyesi sonuclarını (Şekil 3.4) dikkata alarak, eksojen

CagA'nın hücre yaşam ve ölüm dengesini ölüm nafine bozdugu ve hücreyi ölüme sevk ettigi seklinde yorum getirilebilir. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Eksojen CagA hücrelerde UPR'yi uyarır ve yaşam ve ölüm dengesini ölüm yönünde bozar.

Mevcut çalışmada, eksojen CagA proteininin, ER şaperonların seviyesini artırdığı görülmüştür (Şekil 3.1). Eksojen CagA'nin bu özelliği, gastrik kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır. Zira GRP78 ve GRP94 önemli bir ER şaperonu olarak gastrik tümör hücrelerinde over-eksprese bir gendir ve tümör hücrelerini UPR tarafından gelen ölüm tehditlerini baskılar (Zheng ve ark 2008, Suyama ve ark 2011). Bu nedenle, GRP78 hem tümör gelişiminde bir marker protein ve hem tedavisinde bir hedef geni olabileceği vurgulanmıştır (Cheng ve ark 2012, Delie ve ark 2012, Thornton ve ark 2013, Cheng ve ark 2013). Bu yüzden,eksojen CagA, GRP78 ve GRP94 şaperonların seviyesini yükselterek gastrik tümör hücrelerinin hayatta kalma ve proliferasyon yeteneğini arttırmaktadır.

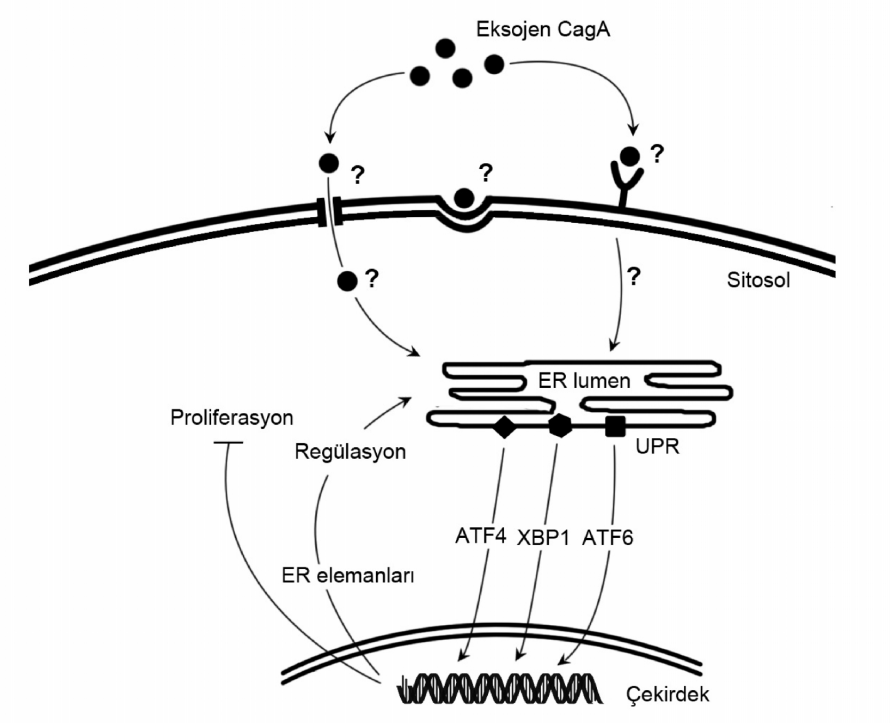
XBP1 geninin primer ürününün işlenmesi yani kesimi, UPR yolağında IRE1'in önemli bileşenidir. IRE1/XBP1 sinyal yolağının kanser hücrelerinde up-regüle olduğu ve tümör hücresinin hayatta kalma ve proliferasyonun kapasitesini artırdığı bildirilmektedir (Lee ve ark 2003, Davies ve ark 2008). Mevcut çalışmamızın

bulgularına göre, eksojen CagA proteinin her üç hücre tipinde ve her iki uygulanan sürede (2 ve 4 saat) XBP1 RNA'sının işlenmesini tetiklediği tespit edildi (Şekil 3.2). Bu bulgu çerçevesinde, hem kontrol hücre (HEK293) hem non-metastatik AGS hem de metastatik MKN45 kanser hücrelerinde XBP1 işlenmesindeki artış eksojen CagA proteinin hızlı ve sürekli bir şekilde bu yolağı up-regüle ettiği görülmektedir. Öte yandan XBP1 kendisi bir ERSE genidir ve promotorunda ERSE motif'ine sahiptir (Şekil 1.5), bundan dolayı UPR diğer transkripsiyon faktörü tarafından daha da up-regüle olur. UPR'nin up-regülasyonu kanserli hücrelerin hayatta kalıp proliferasyonunun devamına, normal hücrelerin ise kanserleşme sürecini Tetikler olabilir.

Ayrıca eksojen CagA, hücrelerde ATF4 transkripsiyon faktörünün transkripsyonu (Şekil 3.1) ve önceki çalısmamızda protein ekspresyon (Bkz. TÜBİTAK 112S357 numaralı proje raporu şekil 3.1) seviyesini arttırdığını tespit ettik. UPR ve ER stresinın PERK yolağı diğer iki yolaktan (IRE1 ve ATF6) sonra aktif hale gelmektedir. PERK yolağı daha çok hücre ölümü yönünde hareket ettiğinden hücre programında en son seçenek olarak kullanılmaktadır (Ma ve ark 2010). ATF4'un bu fonnksyonunun yanısıra, ER şaperon (*GRP78* ve *GRP94* dahil) ve ERSE (*GRP78*, *XBP1* ve *CHOP* dahil) genlerinin de ekspresyonunu artırmaktadır. Bu yolla tümör hücrelerinin hayatta kalma ve proliferasyonunda önemli role sahiptir (Horiguchi ve ark 2012, Pike ve ark 2013). Bu durum, benzer fonksiyonları olan ATF6 için de geçerlidir. Mevcut çalışmada, eksojen CagA ile muamele edilen tüm hücrelerde ATF6 proteini, ER zarından hücre çekirdeğine transloke olduğu gösterildi (Şekil 3.3). ATF6 translokasyonu UPR olayının gerçekleşdiğinin bir göstergesidir ve ER şaperonları olan GRP78 ve GRP94 gibi ekspresyonunun artışına neden olur.

UPR yolağının önemli downstream faktörlerinden birisi, CHOP proteinidir. CHOP transkripsiyon faktörü pro-apoptotik genleri uyarır ve diğer bir takım fonksiyonlar ile hücreyi ölüme yönlendirir (Marciniak ve ark 2004). Mevcut calışmamızda, direk olarak hem *CHOP* geninin mRNA ekspresyonu real time qPCR analizi ile ve bu genin düzenleyicileri olan XBP1 mRNA'sının işlenmesi, ATF4 ekspresyonu ve ATF6 proteinin translokasyonu incelendive bu faktörün eksojen CagA

etkisiyle up-regulasyonun gerçekleştiği tespit edildi. CHOP proteinin up-regüle olması hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (Marciniak ve ark 2004). Bu çerçevede, mevcut çalışmamızda CagA'nın hücre proliferasyonu üzerine etkisinin ortaya koymak için eksojen CagA proteini ve tunicamycin kombinasyonları uygulanması sonucunda, tunicamycin ve CagA ayrı ayrı proliferasyonu azalttığı, ancak ikisinin beraberliğinde ise proliferasyonun daha da düştüğü tespit edildi (Şekil 3.4).



Şekil 4.2. Eksojen CagA'nın UPR üzerindeki etkisi. Eksojen CagA proteini hücre UPR uyarır ve ER elemanlarının up-regülasyonuna ve hücre proliferasyonunun down-regülasyonuna neden olur

Mevcut çalışmada, eksojen Hp CagA'nın hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterildik (Şekil 3.4A, B ve C). Ayrıca Hücre ölümünün gerçekleşdiğini Trypan Blue canlılık testi ile inceledik ve hücrelerin bir kısmı muamele sonucunda öldüğünü gördük (Şekil 3.4D). Sistematik olarak hücre ölümü ve dolayısiyle proliferasyon azalışı üç mekanizma ile gerçekleşmektedir: "apotozis, otofaji ve nekroz". Burada, eksojen CagA'nın hangi mekanizma kullanarak hücre proliferasyonu baskıladığı ortaya konması

gerekmektedir. Bununla birlikte, apotoz ve otofaji mekanizmasını başlatan faktörlerden brisi olan UPR yolağının özelliklede UPR ve hücre ölüm mekanismaların arasındaki bağı kuran *ATF4* ve *CHOP* genlerin up-regüle olduğu gösterildi (Şekil 4.2). Bu bulguya dayanarak eksojen CagA'nın hücre proliferasyonunu baskılaması, bu faktörün *ATF4* ve *CHOP* genlerini aktivasyonu üzerinden gerçekleştirebileceği dikkata alınacak bir konudur.

Literatürde CagA'nın fonksiyonu ile ilgili in vitro ve in vivo çalışmalarda bu proteinin ya Hp bakterisi ile hücreler ko-kültür edilerek yada CagA'yı kodlayan genin vektöre klonlanması ve hücrelere transfekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ancak Hp CagA antijeni, serolojik olarak enfekte bireylerin serumunda tespit edilmiştir. Bu yöntem halen klinik tanı laboratuarlarında, Hp tanısında kullanılmaktadır. Ayrıca, Hp CagA proteininin eksojen olarak doku hücreleri ile direk temasta olduğunu göstermektedir (Cover ve ark 1995, Donati ve ark 1997, Miehlke ve ark 1998). Bu bulgu çerçevesinde, mevcut çalışmada eksojen CagA proteinini denedik gerçi daha önce Targosz ve ark. (2012) CagA proteinini eksojen olarak hücre üzerinde denemişlerdir. CagA'yı MKN45 hücrelerine vererek apopitoz üzerine etkisini incelemiş ve eksojen CagA'nın HSP70 proteinini baskılandığını ve *COX*-2' nin ekspresyonunu yükselttiğini göstermişlerdir (Targosz ve ark 2012). Ayrıca hücre içindeki ve hücrelerin bulunduğu ortamda CagA protein miktarı bilinmediğinden mevcut çalışmada eksojen CagA proteini tek düsük doz (1 µg/ml) kullanılarak gerçekleştirildi. Targosz ve ark. çalışmasında ise bu dozun onkatı miktarı (10 µg/ml) kullanılmıştır (Targosz ve ark 2012).

Hali hazırda eksojen CagA'nın Hp IV. Salgı sistemi olmadan hücre içine girip girmediği, giriyor ise giriş mekanizması dair net bilgi bulunmamaktadır. Öte yandan son yayınlanan çalışmalarda ise, UPR yolağı ile ilgili olarak hücre zarında bazı reseptörlerin bulunduğu ve bunların UPR ile ilişkisi ortaya konmuştur (Dalal ve ark 2012, Galan ve ark 2012, Yemelyanov ve ark 2012). Mevcut çalışmanın bulguları CagA'nın UPR yolağını uyardığını göstermektedir. Ancak bu uyarının, CagA proteininin hücre içine

girerek mi yoksa ligand gibi görev alıp öne sürülen reseptörler aracılığıyla mı gerçekleştiği bilinmemektedir (Şekil 4.1).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut çalışmada, *Helicobacter pylori* CagA proteinninin eksojen formunda mide kanser hücrelerindae UPR üzerindeki etkisini araştırdık. Sonuçta eksojen CagA'nın hücrelerde UPR uyardığını ve bu yolağın transkripsyon faktorleri vasıtasıyle ER şaperonlarının ekspresyonunun arttığını tespit ettik. Ayrıca, eksojen CagA'nın hücre proliferasyonunu baskıladığını gösterdik. Ayrıca CagA proteininin "endojen" formunda oldugu gibi "eksojen" formunda da insan hücreleri üzerinde etkili olduğu gösterildi. Burada CagA etkisi altında hücre UPR ve proliferasyonunun azalışı arasında ilişkiyi ortaya koyma amaclı apopitoz ve otofaji incelemeleri de yapılarak bu mekanizmalar üzerindeki etkileri ortaya konabilir. Günümüze kadar CagA ile ilgili araştırmalar endojen formunda yapılmış, ancak eksojen CagA'nın da hücresel mekanizmaları özellikle hücre yüzey reseptörler üzerindeki etkisinin incelenmesi önerilmektedir.

Kanserlerin tedavisinde,UPR sinyal yolağı önemli bir yolaktır. Son yıllarda UPR faktörlerinin baskılayarak in vitro ve in vivo kanser tedavi araştırmalarında olumlu sonuç alınmıştır. Halihazırda, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı proteazom inhibitörü "bortezomib", multiple myeloma hastaların tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Bortezomib tümör hücrede proteozom oluşumunu engelleyerek ER'da katlanmamış protein birikimine neden olmaktadır. Bu birikim ise, UPR üzerinden hücrenin ölümüne sebep olur (Richardson ve ark 2006). Ayrıca ERAD inhibitörü olan "Eeyarestatin I" (EerI) deneme aşamasında olup, UPR sinyal yolağı üzerinden kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Bu ilaç tümör hücrede ER ile ilgili önemli faktörleri olan ERAD genlerini bloke ederek UPR olayını up-regüle eder ve epigenetik mekanizma ile apopitoz yolaklarını aktive eder (Cross ve ark 2009, Wang ve ark 2009). Hp CagA proteiniyle up-regüle olmuş UPR yolağında bu iki ilacın etkisinin incelenmesi için Hp+ gastrik kanserli hayvan modellerin geliştirilmesi ve klinik olarak bu iki ilacın etkisinin araştırılması gerekmektedir.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Helicobacter pylori CagA proteininin hücre Unfolded Ptotein Response (UPR) sinyal yolağı üzerine etkisinin incelenmesi

Babak NAMI MOLLALOU

Tibbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2013

Gastrik (mide) kanser dünyada dördüncü sık görünen ve ikinci ölümcül kanser tipidir. Gastrik kanser oluşumunda *Helicobacter pylori* (Hp) CagA proteini birçok hücre içi fizyolojisine müdahale ederek mide hücre tümörleşmesinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca unfolded protein response (UPR) olayı, hücre tümörleşmesindeki rolü ispatlanmıştır. Ancak eksojen CagA proteinin UPR yolağı üzerindeki etkisine dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Gastrik kanser gelişiminde ve progresyonunda etkisi bilinen Hp CagA proteinin hücrede UPR yolağı üzerindeki etkisi incelenmesi amaçlanmıştır.

Mevcut projemizde, eksojen CagA proteinin, normal hücre hattı olan HEK293 ve gastrik kanser kökenli non metastatik AGS ve metastatik MKN45 hücrelerinde Unfolded Protein Response (UPR) üzerinde etkisi incelendi. Bu yolak üzerindeki temel elamanlar moleküler biyolojik ve genetik yöntemler kullanılarak incelendi. Bunun için; hücrelere 2 ve 4 saat 1 µg/ml rekombinant C-terminus CagA ile muamele edildi ve UPR faktörleri *ATF4,CHOP*, *GRP78* ve *GRP94* gen ekspresyonunu real time qPCR ile incelendi. Ayrıca XBP1 mRNA işlenmesini PCR-elektroforez sistemi ve ATF6 proteinin translokasyonu ise immünofloresans boyama yöntemi ile araştırıldı. Hücre proliferasyonu 24, 48 ve 72 saat muamele sonunda MTT assay uygulanarak değerlendirildi. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre eksojen CagA proteini, UPR elemanlarının ekspresyonunu artırdığı tespit edildi. Aynı zamanda, eksojen CagA bütün hücrelerde *XBP1* genin mRNA işlenmesi ve HEK293 ve AGS hücrelerinde ATF6 translokasyonu gerçekleştirdiği tespit edildi. Bu bulgular, eksojen CagA'nın UPR genleri up-regüle ettiğin gösterildi. Ayrıca, MTT analizi sonucu, eksojen CagA'nın hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edildi.

Elde edilen bulgulara göre eksojen CagA, gastrik kanser hücrelerinde UPR yolağını up-regüle ederek hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bu bulgular çerçevesinde,CagA'nın eksojen formunda başka hücre yolakları üzerine etkisinin araştırılması ve ER hedefli kemoterapi ilaçlarınının in vitro hücre sistemlerinde etkisinin incelenmesi ve de Hp CagA+ gastrik kanser hayvan modellerinde araştırılmasını gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Gastrik kanser; Helicobacter pylori; CagA; UPR; ER stresi

7. SUMMARY

Effects of *Helicobacter pylori* CagA on the cellular Unfolded Protein Response (UPR) signaling pathway

Gastric cancer is the fourth common and second deadliest cancer type worldwide. *Helicobacter pylori* (Hp) CagA has a key role in development of gastric cancer by intrusion in many cellular processes regarding to cell death and survival. Unfolded protein response (UPR) is an essential process for protein regulation and prevents tumorgenesis by promotion apoptosis that failure is associated with many cancers. However, in the literature, there are no reports regarding to the effects of the CagA proteinon the pathways of UPR and ER stress in cancer models cells and normal cells. In this project, it was hypothesized that there was an effect of CagA protein, which was known the development and progression of gastric cancer, on the cellular UPR.

In this study, we aimed to investigate exogenous Hp CagA effects on the UPR signaling of gastric cancer cells as well as normal cell line. The cells were treated with 1 µg/ml of CagA for 2 and 4 hours and then transcriptional expression analysis of *ATF4*, *CHOP*, *GRP78* and *GRP94* genes were carry out by applying real time qPCR technique. The mRNA splicing of XBP1 was investigated by using PCR and SDS-PAGE systems and ATF6 protein translocation was analyzedby by using the immunofluorescence assay. The effect of CagA protein on the cell proliferation rate was also determined by using the MTT assay.

The results showed that exogenous CagA could promote expression of, *ATF4*, *CHOP*, *GRP78*, and *GRP49,* genes in cancer cell lines. The mRNA splicing of XBP1 was also determined in the cells, which were treated with exogenous CagA protein. Addionally, translocation of ATF6 protein was detected only in HEK293 and AGS cells. Moreover, reduced proliferation rate under the influence of exogenous CagA was determined in all cell types. All results suggest that exogenous CagA protein up-regulatesthe signal of UPR and also actuated the cells to death through promotion UPR. We suggest that the examine of exogenous form of HP CagA on human cells also assisment of UPR targeted drugs in in vitro cells and Hp+ animal models with gastric cancer may give more prospering outcomes.

Key Words: Gastric cancer; Helicobacter pylori; CagA; UPR; ER stress

8. KAYNAKLAR

1. Ackerman LV. The pathology of carcinoma of the stomach. J Natl Med Assoc. 1948;40:236-41.

2. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon C J, Kluger Y, Dynlacht BD. XBP1 controls diverse cell type and condition-specific transcriptional regulatory networks. Mol Cell. 2007;27:53-66.

3. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. Gastroenterology. 2008;134:306-23.

4. Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, Pasqualini R. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. Cancer Cell. 2004;6:275-84.

5. Atherton JC. H. pylori virulence factors. Br Med Bull. 1998;54:105-20.

6. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis. Cell Microbiol. 2008;10:1573-81.

7. Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF. Translocation of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. Cell Microbiol. 2000;2:155-64.

8. Bagnoli F, Buti L, Tompkins L, Covacci A, Amieva MR. Helicobacter pylori CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:16339-44.

9. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol. 2000;2:326-32.

10. Blais JD, Addison CL, Edge R, Falls T, Zhao H, Wary K, Koumenis C, Harding HP, Ron D, Holcik M, Bell JC. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. Mol Cell Biol. 2006;26:9517-32.

11. Blaser MJ. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases, EMBO Rep. 2006;7:956-60.

12. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, Zhang F, Ye J, Koumenis C, Cavener D, Diehl JA. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. Oncogene. 2010;29:3881-95.

13. Buti L, Spooner E, Van der Veen AG, Rappuoli R, Covacci A, Ploegh HL. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:9238-43.

14. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. Nature. 2002;415:92-6.

15. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, Zheng M, Mani M, Henderson J, Pinkus GS, Munshi N, Horner J, Ivanova EV, Protopopov A, Anderson KC,

Tonon G, DePinho RA. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. Cancer Cell. 2007;11:349-60.

16. Cheng CC, Huang CF, Ho AS, Peng CL, Chang CC, Mai FD, Chen LY, Luo TY, Chang J. Novel targeted nuclear imaging agent for gastric cancer diagnosis: glucose-regulated protein 78 binding peptide-guided 111In-labeled polymeric micelles. Int J Nanomedicine. 2013;8:1385-91.

17. Cheng CC, Lu N, Peng CL, Chang CC, Mai FD, Chen LY, Liao MH, Wang WM, Chang J. Targeting to overexpressed glucose-regulated protein 78 in gastric cancer discovered by 2D DIGE improves the diagnostic and therapeutic efficacy of micelles-mediated system. Proteomics. 2012;12:2584-97.

18. Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, Burette A, Tummuru MK, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Serologic detection of infection with cagA+ Helicobacter pylori strains. J Clin Microbiol. 1995;33:1496-500.

19. Cross BC, McKibbin C, Callan AC, Roboti P, Piacenti M, Rabu C, Wilson CM, Whitehead R, Flitsch SL, Pool MR, High S, Swanton E. Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. J Cell Sci. 2009;122:4393-400.

20. Dalal S, Foster CR, Das BC, Singh M, Singh K. B-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis. Mol Cell Biochem. 2012;364:59-70.

21. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. Nat Struct Mol Biol. 2005;12:364-71.

22. Davies MP, Barraclough DL, Stewart C, Joyce KA, Eccles RM, Barraclough R, Rudland PS, Sibson DR. Expression and splicing of the unfolded protein response gene XBP-1 are significantly associated with clinical outcome of endocrine-treated breast cancer. Int J Cancer. 2008;123:85-8.

23. Delie F, Petignat P, Cohen M. GRP78 Protein Expression in Ovarian Cancer Patients and Perspectives for a Drug-Targeting Approach. J Oncol. 2012;468615.

24. Donati M, Moreno S, Storni E, Tucci A, Poli L, Mazzoni C, Varoli O, Sambri V, Farencena A, Cevenini R. Detection of serum antibodies to CagA and VacA and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with Helicobacter pylori-induced gastritis. Clin Diagn Lab Immunol. 1997;4:478-82.

25. Drewett V, Devitt A, Saxton J, Portman N, Greaney P, Cheong NE, Alnemri TF, Alnemri E, Shaw PE. Serum response factor cleavage by caspases 3 and 7 linked to apoptosis in human BJAB cells. J Biol Chem. 2001;276:33444-51.

26. Eslick GD, Lim LL, Byles JE, Xia HH, Talley NJ. Association of Helicobacter pylori infection with gastric carcinoma: a meta-analysis, American Journal of Gastroenterology. 1999;94:2373–9.

27. Farrell PJ, Balkow K, Hunt T, Jackson RJ, Trachsel H. Phosphorylation of initiation factor elF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. Cell. 1977;11:187-200.

28. Fels DR, Koumenis C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. Cancer Biol Ther. 2006;5:723–8.

29. Feng W, Brown RE, Trung CD, Li W, Wang L, Khoury T, Alrawi S, Yao J, Xia K, Tan D. Morphoproteomic profile of mTOR, Ras/Raf kinase/ERK, and NF-kappaB pathways in human gastric adenocarcinoma. Ann Clin Lab Sci. 2008;38:195-209.

30. Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2006;20:633–49.

31. Fujimoto T, Onda M, Nagai H, Nagahata T, Ogawa K, Emi M. Upregulation and overexpression of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) gene in primary breast cancers. Breast Cancer. 2003;10:301-6.

32. Galan M, Kassan M, Choi SK, Partyka M, Trebak M, Henrion D, Matrougui K.A novel role for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and its downstream endoplasmic reticulum stress in cardiac damage and microvascular dysfunction in type 1 diabetes mellitus. Hypertension. 2012;60:71-80.

33. Graham DY, Yamaoka Y.H. pylori and cagA: relationships with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. Helicobacter. 1998;3:145-51.

34. GenBank. NCBI. [cited November 4, 2013]. Avaliable from URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

35. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. Nat Cell Biol. 2013;15:481-90.

36. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. Nat Rev Cancer. 2004;4:688-94.

37. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell. 1999;10:3787-99.

38. Hedskog L, Pinho CM, Filadi R, Rönnbäck A, Hertwig L, Wiehager B, Larssen P, Gellhaar S, Sandebring A, Westerlund M, Graff C, Winblad B, Galter D, Behbahani H, Pizzo P, Glaser E, Ankarcrona M. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:7916-21.

39. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. Mt. Sinai J. Med. 2004;71:289-97.

40. Higashi H, Nakaya A, Tsutsumi R, Yokoyama K, Fujii Y, Ishikawa S, Higuchi M, Takahashi A, Kurashima Y, Teishikata Y, Tanaka S, Azuma T, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. J Biol Chem. 2004;279:17205-16.

41. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of Helicobacter pylori virulence factor CagA in mammalian cells. J Biol Chem. 2005;280:23130-7.

42. Hirata Y, Maeda S, Mitsuno Y, Tateishi K, Yanai A, Akanuma M, Yoshida H, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Helicobacter pylori CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. Gastroenterology. 2002;123:1962-71.

43. Ho YS, Yang X, Lau JC, Hung CH, Wuwongse S, Zhang Q, Wang J, Baum L, So KF, Chang RC. Endoplasmic reticulum stress induces tau pathology and forms a vicious cycle: implication in Alzheimer's disease pathogenesis. J Alzheimers Dis. 2012;28:839-54.

44. Horiguchi M, Koyanagi S, Okamoto A, Suzuki SO, Matsunaga N, Ohdo S. Stress-regulated transcription factor ATF4 promotes neoplastic transformation by suppressing expression of the INK4a/ARF cell senescence factors. Cancer Res. 2012;72:395-401.

45. Horndasch M, Lienkamp S, Springer E, Schmitt A, Pavenstädt H, Walz G, Gloy J. The C/EBP homologous protein CHOP (GADD153) is an inhibitor of Wnt/TCF signals. Oncogene. 2006;25:3397-407.

46. Hou CH, Lin J, Huang SC, Hou SM, Tang CH. Ultrasound stimulates NF-kappaB activation and iNOS expression via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in cultured preosteoblasts. J Cell Physiol. 2009;220:196-203.

47. Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH, Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology. 1998;114:1169-79.

48. Hunt RH. The role of Helicobacter pylori in pathogenesis: the spectrum of clinical outcomes. Scand J Gastroenterol Suppl. 1996;220:3-9.

49. Igarashi T, Izumi H, Uchiumi T, Nishio K, Arao T, Tanabe M, Uramoto H, Sugio K, Yasumoto K, Sasaguri Y, Wang KY, Otsuji Y, Kohno K. Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. Oncogene. 2007;26:4749-60.

50. Jiang HY, Wek RC. Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. J Biol Chem. 2005;280:14189-202.

51. Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A Tale of Two Toxins: Helicobacter Pylori CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. Front Microbiol. 2010;1:115.

52. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter pylori infection: a clinical overview. Dig Liver Dis. 2008;40:19-26.

53. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev. 1999;3:1211-33.

54. Koong AC, Chauhan V, Romero-Ramirez L. Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy. Cancer Biol Ther. 2006;5:756-9.

55. Korennykh AV, Korostelev AA, Egea PF, Finer-Moore J, Stroud RM, Zhang C, Shokat KM, Walter P. Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1. BMC Biol. 2011;9:47.

56. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters B G. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. Mol Cell Biol. 2002;22:7405–16.

57. Kurashima Y, Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Higashi H, Azuma T, Kondo S, Hatakeyama M. Deregulation of beta-catenin signal by Helicobacter pylori CagA requires the CagA-multimerization sequence. Int J Cancer. 2008;122:823-31.

58. Kusters JG,van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection, Clin Microbiol Rev. 2006;19:449-90.

59. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:9946-51.

60. Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. Cancer Res. 2007;67:3496-9.

61. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. Trends Biochem. Sci. 2001;26:504-10.

62. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. Genes Dev. 2002;16:452-66.

63. Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. Eur J Neurosci. 2004;19:3375-81.

64. Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. Curr Mol Med. 2006;6:45-54.

65. Liu Y, Steiniger SC, Kim Y, Kaufmann GF, Felding-Habermann B, Janda KD. Mechanistic studies of a peptidic GRP78 ligand for cancer cell-specific drug delivery. Mol Pharm. 2007;4:435-47.

66. Luo D, He Y, Zhang H, Yu L, Chen H, Xu Z, Tang S, Urano F, Min W. AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response. J Biol Chem. 2008;283:11905-12.

67. Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. Mol Cell Biol. 2006;26:5688-97.

68. Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ, Jin Y, Hendershot LM. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. Cell Stress Chaperones. 2010;15:281-93.

69. Makola D, Peura DA, Crowe SE. Helicobacter pylori infection and related gastrointestinal diseases. J Clin Gastroenterol. 2007;41:548-58.

70. Marciniak S J, Ron D. Endoplasmic reticulumstress signaling in disease. Physiol Rev. 2006;86:1133-49.

71. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. Genes Dev. 2004;18:3066-77.

72. Miehlke S, Go MF, Kim JG, Graham DY, Figura N. Serologic detection of Helicobacter pylori infection with cagA-positive strains in duodenal ulcer, gastric cancer, and asymptomatic gastritis. J Gastroenterol. 1998;10:18-21.

73. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai YT, Cirstea D, Santo L, Hu Y, Fabre C, Minami J, Ohguchi H, Kiziltepe T, Ikeda H, Kawano Y, French M, Blumenthal M, Tam V, Kertesz NL, Malyankar UM, Hokenson M, Pham T, Zeng Q, Patterson JB, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. Blood. 2012;119:5772-81.

74. Murai K, Treisman R. Interaction of serum response factor (SRF) with the Elk-1 B box inhibits RhoA-actin signaling to SRF and potentiates transcriptional activation by Elk-1. Mol Cell Biol. 2002;22:7083-92.

75. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM Jr, Azuma T, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. Oncogene. 2007;26:4617-26.

76. Nagelkerke A, Bussink J, Mujcic H, Wouters BG, Lehmann S, Sweep FC, Span PN. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. Breast Cancer Res. 2013;15:R2.

77. Neal JT, Peterson TS, Kent ML, Guillemin K. H. pylori virulence factor CagA increases intestinal cell proliferation by Wnt pathway activation in a transgenic zebrafish model. Dis Model Mech. 2013;6:802-10.

78. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. EMBO J. 2005;24:1243-55.

79. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. Biochem J. 2002;366:585-94.

80. Oliveira MJ, Costa AM, Costa AC, Ferreira RM, Sampaio P, Machado JC, Seruca R, Mareel M, Figueiredo C. CagA associates with c-Met, E-cadherin, and p120-catenin in a multiproteic complex that suppresses Helicobacter pylori-induced cell-invasive phenotype. J Infect Dis. 2009;200:745-55.

81. Palade GE. The endoplasmic reticulum. J Biophys Biochem Cytol. 1956;2:85-98.

82. Palli D, Masala G, Del Giudice G, Plebani M, Basso D, Berti D, et al,. CagA+ Helicobacter pylori infection and gastric cancer risk in the EPIC-EURGAST study. Int J Cancer. 2007;120:859-67.

83. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, CA Cancer J Clin. 2005;55:74-108.

84. Parsonnet J, Friedman GD,Vandersteen DP,Chang Y,Vogelman JH,Orentreich N,Sibley RK. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma.N Engl J Med. 1991;325:1127–31.

85. Petersen AM, Krogfelt KA, Helicobacter pylori: an invading microorganism? A review, FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;36:117-26.

86. Pike LR, Singleton DC, Buffa F, Abramczyk O, Phadwal K, Li JL, Simon AK, Murray JT, Harris AL. Transcriptional up-regulation of ULK1 by ATF4 contributes to cancer cell survival. Biochem J. 2013;449:389-400.

87. Prasad S, Yadav VR, Ravindran J, Aggarwal BB. ROS and CHOP are critical for dibenzylideneacetone to sensitize tumor cells to TRAIL through induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins. Cancer Res. 2011;71:538-49.

88. Ranganathan AC, Ojha S, Kourtidis A, Conklin DS, Aguirre-Ghiso JA. Dual function of pancreatic endoplasmic reticulum kinase in tumor cell growth arrest and survival. Cancer Res. 2008;68:3260-8.

89. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. J Biol Chem. 2003;278:20915-24.

90. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. Annu Rev Med. 2006;57:33-47.

91. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8:519-29.

92. Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. J Neurosci. 2002;22:10690-8.

93. Rzymski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, Pires I, Hammond E, Ragoussis I, Harris AL. Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. Oncogene. 2010;29:4424-35.

94. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. Nature. 2007;447:330-3.

95. Samali A, Fitzgerald U, Deegan S, Gupta S. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. Int J Cell Biol. 2010;830307.

96. Schroder M, Kaufman R. J. ER stress and the unfolded protein response. Mutat. Res. 2005;569:29–63.

97. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. The Helicobacter pylori CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. EMBO J. 2003;22:515-28.

98. Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways. Nature. 2003;426:900-4.

99. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Dev Cell. 2002;3:99-111.

100. Shibata A, Parsonnet J, Longacre TA, Garcia MI, Puligandla B, Davis RE, Vogelman JH, Orentreich N, Habel LA. CagA status of Helicobacter pylori infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. Carcinogenesis. 2002;23:419-24.

101. Shou Y, Li N, Li L, Borowitz JL, Isom GE. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. J Neurochem. 2002;81:842-52.

102. Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O, Yamamoto N, Yamamoto M. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. J Hepatol. 2003;38:605-14.

103. Singleton DC, Harris AL. Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. Expert Opin Ther Targets. 2012;16:1189-202.

104. Su B, Ceponis PJ, Sherman PM. Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to Helicobacter pylori infection. J Med Microbiol. 2003;52:861-7.

105. Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T, Imai K, Kuzuhara T, Nishizono A, Fujiki H. TNF-alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from H. pylori, enters gastric cancer cells. Int J Cancer. 2008;123:117-22.

106. Suyama K, Watanabe M, Sakabe K, Okada Y, Matsuyama D, Kuroiwa M, Mochida J. Overexpression of GRP78 protects glial cells from endoplasmic reticulum stress. Neurosci Lett. 2011;504:271-6.

107. Targosz A, Brzozowski T, Pierzchalski P, Szczyrk U, Ptak-Belowska A, Konturek SJ, Pawlik W. Helicobacter pylori promotes apoptosis, activates cyclooxygenase (COX)-2 and inhibits heat shock protein HSP70 in gastric cancer epithelial cells. Inflamm Res. 2012;61:955-66.

108. Tegtmeyer N, Backert S. Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the Helicobacter pylori CagA protein. Eur J Cell Biol. 2011;90:880-90.

109. Teske BF, Wek SA, Bunpo P, Cundiff JK, McClintick JN, Anthony TG, Wek RC. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell. 2011;22:4390-405.

110. Thornton M, Aslam MA, Tweedle EM, Ang C, Campbell F, Jackson R, Costello E, Rooney PS, Vlatković N, Boyd MT. The unfolded protein response regulator GRP78 is a novel predictive biomarker in colorectal cancer. Int J Cancer. 2013;133:1408-18.

111. Tirosh B, Iwakoshi NN, Glimcher LH, Ploegh HL. Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. J Biol Chem. 2006;281:5852-60.

112. Tsuji S, Kawai N, Tsujii M, Kawano S, Hori M. Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis: a perigenetic pathway. Aliment Pharmacol Ther. 2003;18:82-9.

113. Ubeda M, Habener JF. CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. Nucleic Acids Res. 2000;28:4987-97.

114. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med. 2001;345:784-9.

115. Ulivi V, Giannoni P, Gentili C, Cancedda R, Descalzi F. p38/NF-kB-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes. J Cell Biochem. 2008;104:1393-406.

116. Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Yoshimastu T, Morita M, Yasumoto K. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. Lung Cancer. 2005;49:55-62.

117. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science. 2000;287:664-6.

118. van den Berg B, Wain R, Dobson CM, Ellis RJ. Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. EMBO J. 2000;19:3870-5.

119. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. Mol Cell Biol. 1999;19:5923-9.

120. Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, Perez-Galan P, Wolford C, Hai T, Ron D, Chen W, Trenkle W, Wiestner A, Ye Y. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:2200-5.

121. World Health Organization, Cancer fact sheet N°297, [cited 2012 February]. Available from URL http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/

122. Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of H. pylori infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. World J Gastroenterol. 2001;7:801-4.

123. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. J Biochem. 2004;136:343-50.

124. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010;7:629-41.

125. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Ron D, Koumenis C. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. EMBO J. 2010;29:2082-96.

126. Yemelyanov A, Bhalla P, Yang X, Ugolkov A, Iwadate K, Karseladze A, Budunova I. Differential targeting of androgen and glucocorticoid receptors induces ER stress and apoptosis in prostate cancer cells: a novel therapeutic modality. Cell Cycle. 2012;11:395-406.

127. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell. 2001;107:881-91.

128. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol. 2000;20:6755-67.

129. Young CS, Kitamura M, Hardy S, Kitajewski J. Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts. Mol Cell Biol. 1998;18:2474-85.

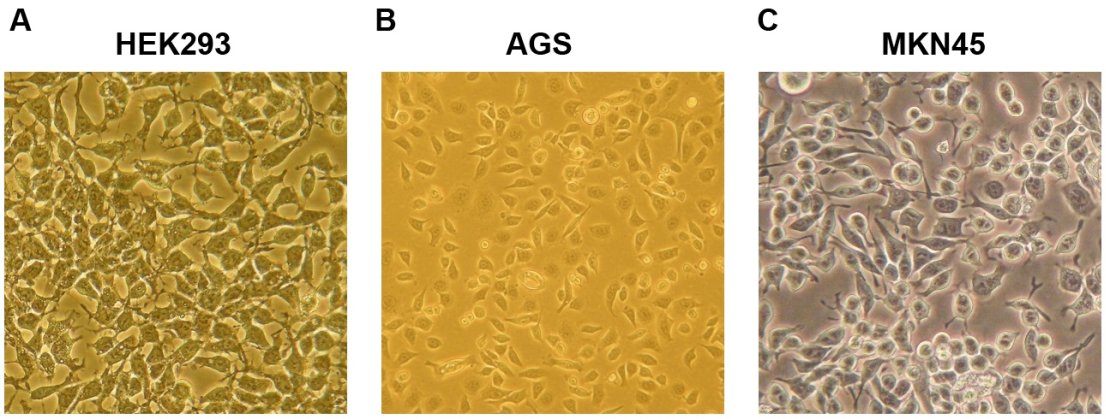
130. Zhang C, Kawauchi J, Adachi MT, Hashimoto Y, Oshiro S, Aso T, Kitajima S. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. Biochem Biophys Res Commun. 2001;289:718-24.

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

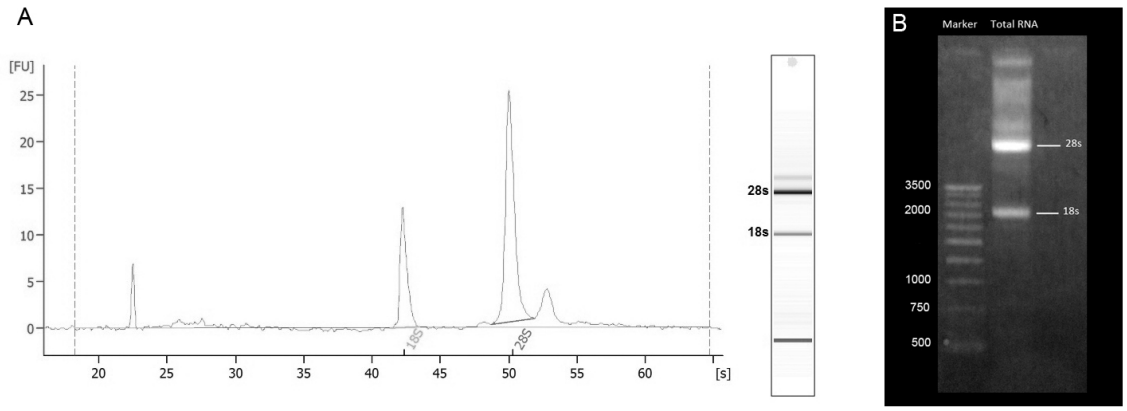
132. Zhu Y, Singh B, Hewitt S, Liu A, Gomez B, Wang A, Clarke R. Expression patterns among interferon regulatory factor-1, human X-box binding protein-1, nuclear factor kappa B, nucleophosmin, estrogen receptor-alpha and progesterone receptor proteins in breast cancer tissue microarrays. Int J Oncol. 2006;28:67-76.

9. EKLER

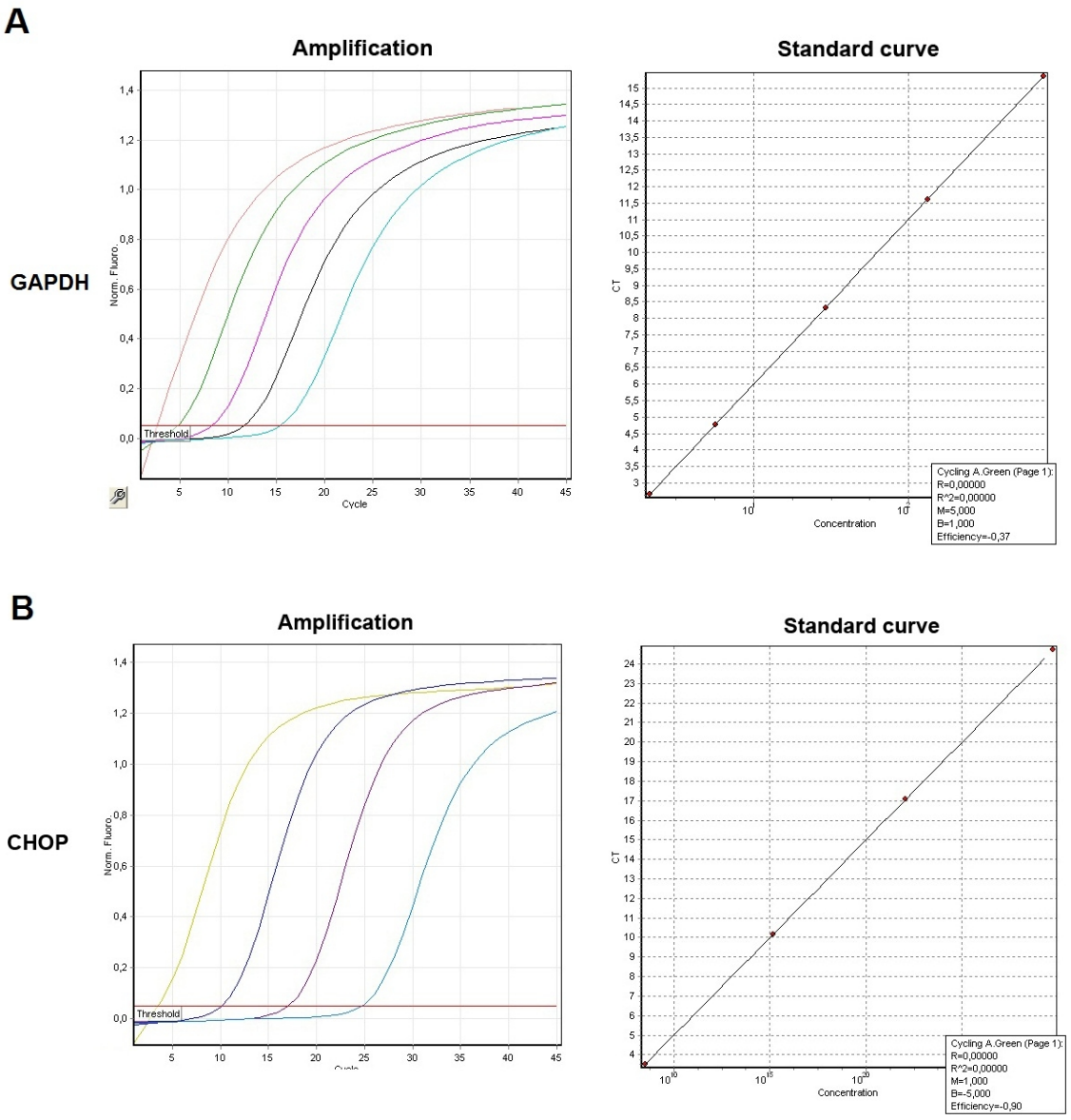
Ek 1. Kullanılan hücre hatları. (A) İnsan embryonik böbrek kökenli HEK293 hücre hattı (200× büyütme), (B) Mide kanser kökenli AGS hücre hattı (200× büyütme) ve (C) Metastatik mide kanser kökenli MKN45 hücre hattı (400× büyütme).



Ek 2. Total RNA Bioanalyser® electrogram görüntüsü. HEK293 hücrelerinden TRizol® yöntemi ile total RNA izole edildi ve 1 µg Aligent 2100 Bioanalyzer® electropherogram sisteminde (A) ve %0.75 konsantrasyonlu agaroz jelde (B) yürütüldü.

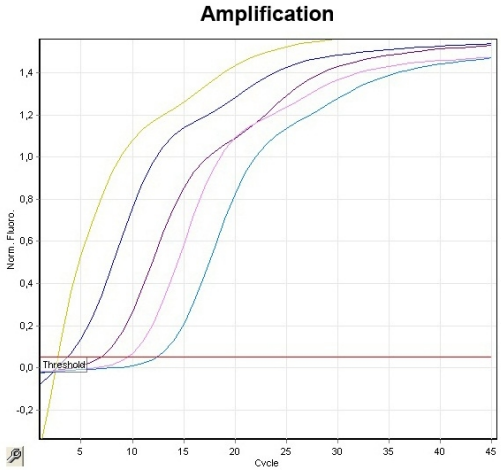


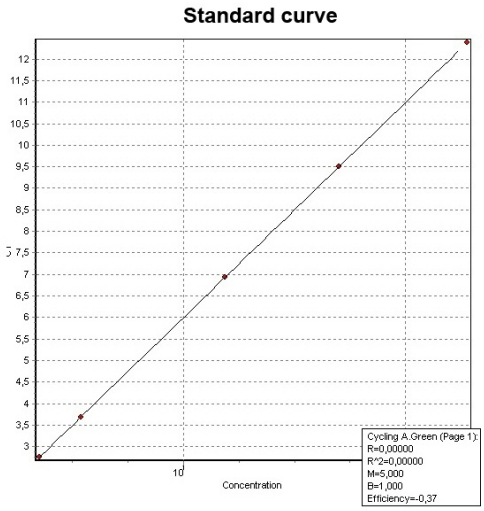
Ek 3. Kantitatif real time PCRamplifikasyon ve standart eğrisi. (A) *GAPDH*, (B) *CHOP*, (C) *GRP78* ve (D) *EDEM1* genleri PCR ile çoğaltıldı ve amonyum asetat-alkol yöntemiyle pürifiye edildikten sonra 1, 0.1, 0.01, 0.001 ve 0,0001 ng miktarında cDNA kalıp olarak spesifik primerle ve SYBR-Green boyası ile quantitative real time PCR'daincelendi ve uygun standart eğri elde etmek için optimize edildi.



C

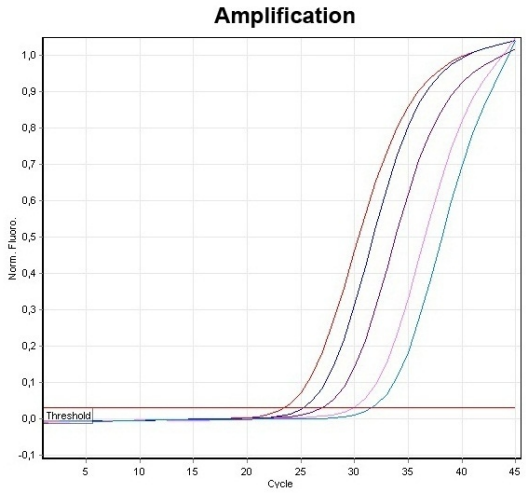
GRP78

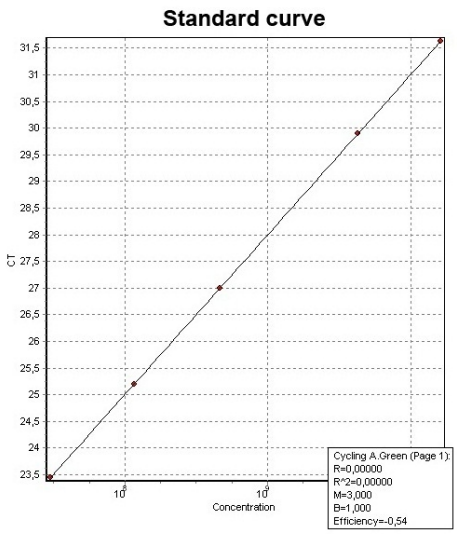




D

EDEM1





10. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İRAN'nın kuzey batısındaki Parsabad şehirinde doğdu, ilk, orta ve yüksek öğrenimini "Deneysel Bilimleri" dalında tamamladı. 2005 yılında Lahijan Azad Üniversitesi Fen Fakültesinde "Mikrobiyoloji" bölümünde lisans programına başladı ve 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü lisans üstüprogramı çerçevesinde Tıp Fakültesi "Tıbbi Genetik" Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı.