

HEK293 Hücreleri Üzerine Endoplazmik Retikulum Stresi Uyararı Tunikamisin'in Etkisi

The Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Activator-Tunicamycin on HEK293 Cells

Muhammed Abdulvahid Kalkan , Burçak Vural , Evrim Kömürçü Bayrak 

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Kalkan MA, Vural B, Kömürçü Bayrak E. The Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Activator-Tunicamycin on HEK293 Cells. Experimed 2018; 8(3): 71-8.

ÖZ

Amaç: Endoplazmik Retikulum (ER), protein katlanması ve işlenmesi yanı sıra Ca^{+2} ve glikojen deposu ve hücre membran lipidlerinin biyogenezine gibi fonksiyonlara sahiptir. Hipoksi, viral enfeksiyonlar, yanlış protein katlanmaları, protein birikimleri ve bazı kimyasallar hücrede, ER stresine sebep olarak katlanmamış protein yanıtı (UPR) sistemlerini devreye sokmaktadır. Bu kimyasallardan biri olan Tunikamisin, asparajin-bağlı glikoproteinlerin sentezinin ilk adımında görev alan GPT (GlcNAc fosfotransferaz) enzimini inhibe ederek hücrede ER stresine sebep olan bir antibiyotiktir. Bu çalışmada, ER stresini *in vitro* araştırmak için en uygun deney şartlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: HEK293 hücre hattı uygun kültür koşullarında çoğaltılarak 5 farklı dozda (0,5-1-2-5 ve 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 12 saatlik Tunikamisin uygulanmıştır. 1-2-4-8 ve 12 saatlik sürelerle ışık mikroskopunda morfolojik değerlendirilmeleri yapılmıştır. Normal HEK293 hücreleri ile 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tunikamisin uygulanan hücrelerden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Tunikamisin uygulamasının ER stres açısından değerlendirilmesi için UPR sisteminde seçilen *CHOP*, *BiP*, *GADD34*, *ATF4*, *EDEM1*, *ASK1*, *XBP1* (spliced, unspliced ve total), *TRAF2*, *HERP*, *PDIA4* genlerinin qRT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonları normal hücrelere göre kıyaslanmıştır.

Bulgular: Tunikamisin uygulamasından 1-2-4-8 ve 12 saatlik ışık mikroskopunda HEK293 hücrelerinin morfolojilerinin sadece 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda korunduğu gözlenmiştir. Diğer dozlarda ise daha ilk saatten hücrelerin morfolojik yapılarının bozulduğu gözlenmiştir. qRT-PCR yöntemi ile UPR-ilişkili genlerden *BiP*, *ASK1*, *PDIA4*, *s-xBP1*, *us-xBP1*, *t-xBP1*, *HERP* ve *CHOP* rölatif kantitasyon değerlerinde Tunikamisin uygulanmış HEK293 hücrelerin normal hücrelere göre anlamlı bir artış saptanmıştır. *ASK1* ile aynı yolaktan olmasına rağmen *TRAF2* geni rölatif kantitasyon değerinde azalma gözlenmiştir.

Sonuç: HEK293 hücrelerinde ER stresinin oluşturulabilmesinde 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik Tunikamisin uygulaması uygun bulunmuştur. Daha yüksek dozların HEK293 hücrelerini apoptoza yönlendirdiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Endoplazmik retikulum stresi, tunikamisin, HEK293 hücreleri, katlanmamış protein yanıtı

ABSTRACT

Objective: Among the functions of the Endoplasmic Reticulum (ER) are many different reactions that include the regulation of protein folding and modifications in the lumen, as well as the use of Ca^{+2} and glycogen storage, the biogenesis of cell membrane lipids. ER homeostasis becomes unbalanced and is recognized as ER stress by the cell. It triggers Unfolded Protein Response (UPR) systems. Hypoxia, viral infections, unfolded protein accumulation, and some chemicals cause ER stress. Among the chemicals, tunicamycin is an antibiotic known to induce ER stress in the cell by inhibiting the enzyme GlcNAc phosphotransferase (GPT), which is involved in the first step of synthesis of asparagine-linked glycoproteins. The aim of this study is to determine the optimal experimental conditions for investigating ER stress *in vitro*.

Material and Method: The HEK293 cells were cultured at the appropriate culture conditions and treated with five different doses (0.5, 1, 2, 5, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of tunicamycin for 12 hours. The morphology of the cells was evaluated with a light microscope for 1, 2, 4, 8, and 12 hours. The total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from normal and treated HEK293 cells with 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tunicamycin. Expressions of *CHOP*, *BiP*, *GADD34*, *ATF4*, *EDEM1*, *ASK1*, *XBP1* (spliced, unspliced and total), *TRAF2*, *HERP*, and *PDIA4* selected from the UPR system were compared to normal cells for the evaluation of ER stress via tunicamycin application by qRT-PCR

Results: After 1, 2, 4, 8, and 12 hour observations using light microscopy after treatment of tunicamycin, the morphology of HEK293 cells were preserved at concentrations of only 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In all other doses, the morphological structures of the cells were observed to be impaired within the first hour. Relative quantitation values of *BiP*, *ASK1*, *PDIA4*, *s-xBP1*, *us-xBP1*, *t-xBP1*, *HERP*, and *CHOP* were increased significantly on HEK293 cells treated with tunicamycin as compared to normal cells. Despite *ASK1* being in the same pathway, a decrease of *TRAF2* relative quantitation was observed.

Conclusion: It was found that the appropriate doses to induce ER stress with tunicamycin utilizing an HEK293 cell culture were 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Higher doses are thought to lead to cell apoptosis.

Keywords: Endoplasmic reticulum stress, tunicamycin, HEK293 cells, unfolded protein response

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Evrim Kömürçü Bayrak **E-mail:** ebayrak@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 08.10.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 15.11.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Endoplazmik Retikulum (ER) hücre dışına salgılanan ve membran geçişli proteinlerin sentezini, uygun katlanmasını ve işlenmesini sağlayan organeldir (1). ER lümeni içerisinde homeostazın bozulmasıyla protein katlama sürecinin yavaşlaması ve hataya açık olması hücre tarafından ER stresi olarak algılanmaktadır (2). Bu strese hipoksi, viral enfeksiyonlar, yanlış protein katlanmaları, protein birikimleri ve bazı kimyasallar sebep olmaktadır (3, 4). Tunikamisin, asparajin-bağlı glikoproteinlerin sentezinin ilk adımında görev alan GPT (GlcNAc fosfotransferaz) enzimini inhibe eden bir antibiyotiktir (5). Hücrelere Tunikamisin uygulaması, glikoproteinlerin birikmesine sebep olarak ER stresine yol açarak Katlanmamış Protein Yanıtı (İng., "Unfolded Protein Response", UPR) sistemini devreye sokmaktadır (2). UPR; protein parçalayıcı enzimlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve kinazların olduğu IRE1 (İng., "Inositol-Requiring Protein 1"), PERK (İng., "PKR-like ER kinase") ve ATF6 (İng., "Activating Transcription Factor 6") proteinlerince kontrol edilen üç ana sinyal iletim yolağından meydana gelmektedir. Her üç yolak da ise BiP/GRP78 (İmmunoglobulin bağlayıcı protein/Glikoz düzenleyici protein 78) adlı şaperon protein tarafından kontrol edilmektedir. ER stresi olduğunda BiP proteininin baskısı ortadan kalkmakta ve üç ana yolak aktif hale gelmektedir (6).

IRE1, ER stresinde oto-fosforile olarak aktifleşmektedir ve C-terminal ucundaki endoribonükleaz aktivitesi sayesinde XBP1'in (X-kutu bağlayıcı protein 1) kesilerek transkripsiyon faktörüne dönüşmesini sağlamaktadır. XBP1 mRNA'sının kesimi ile protein katlanması veya degradasyonundan sorumlu ERAD (İng. "ER-associated protein degradation") genlerinden EDEM1 (İng., "ER-degradation-enhancing-a-mannidose-like protein 1"), PDIA4 (İng., "Protein Disulfide Isomerase Family A Member 4"), HERP'in (İng., "homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1") transkripsiyonunu artırmaktadır (7). IRE1-TRAF2-ASK1 kompleksi oluşumu ile apoptoz ile ilişkili Bcl proteinleri devreye girmektedir (8). RIDD (İng., "Regulated IRE1-dependent Decay") mekanizması ile IRE1 proteini, miRNA ve XBP1 mRNA'sına benzer bir katlanma gösteren mRNA'ları, CTGCAG dizilerinden kesime uğrattır (3).

Otofosforile olarak aktifleşen PERK, eIF2a'nın fosforillenmesini sağlamaktadır. Fosforile eIF2a; genel translasyonun azalmasını ve ters olarak ATF4'ün (İng., "Activation Transcription Factor 4") translasyonuna sebep olmaktadır (9). ATF4 ise apoptoza yönlendirici CHOP'u (İng. "C/EBP homologous protein, CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein") ve eIF2a'nın fosforile kalmasını sağlayan GADD34'ün (İng., "Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 34") transkripsiyonunu sağlamaktadır (10).

ATF6 (90 kDa) proteini SP1 ve SP2 proteazlarca kesilerek aktifleşmektedir. Kesilen ATF6'nın N-terminal ucu b-ZIP transkripsiyon faktörü olarak nükleusa hareket etmekte (2) ve genom üzerinde CRE, ERSE I ve ERSE II elementlerine bağlanarak CHOP, BiP ve HERP genlerinin transkripsiyonunu artırmaktadır (11).

Bu çalışmada, pek çok hastalık patogenezinin temelinde gelişen ER stresini *in vitro* araştırmak için en uygun deney şartları-

nın belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, HEK293 hücrelerinde Tunikamisin ile oluşturulacak ER stresi için uygun dozun belirlenmesi ve hücrenin ER strese yanıtındaki görev alan genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

HEK-293 (ATCC® CRL-1573) hücrelerinin kültürü ile yapılan deneysel bir çalışma olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hücre Kültürü

Morfolojisi epitel olan HEK293 hücre hattı 1973 yılında normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin Adenovirüs-5 ile transforme edilmesiyle üretilmiştir (12). Hücrelerin ışık mikroskopundaki morfolojisi birbirlerine ağımsı bağlanmalar ile bağlanmış yassı adherent tipindedir. HEK293 hücreleri, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içinde %10'luk fetal sığır serumu (FBS) ve %1'lik Anti-Anti bulunan solüsyonda 37°C ve %5 CO₂ ortam şartlarında kültüre alındı. Tunikamisin (Sigma, T7765) 1 mg/mL DMSO stok içinde çözündürüldü, DMSO'nun etkisini en aza indirmek için ara stok 100 µg/mL'lik konsantrasyonda kültür medyumunda hazırlandı.

Tunikamisin ile ER Stresi Oluşturulması

HEK293 hücreleri 24-kuyulu kültür kaplarına, hücre sayıları yaklaşık 50.000 olacak şekilde ekildi. Medyumda 0.5-1-2-5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda Tunikamisin olması için 500 µL'lik kültür medyumunda 100 µg/mL'lik Tunikamisin ara stoğundan sırasıyla 2.5-5-10-25 ve 50 µL eklendi. Kültür medyumunu ile bir gün hücrelerin 24-kuyulu plakelere yapışması beklendikten sonra medyum uzaklaştırılarak hücrelere farklı konsantrasyonlarda Tunikamisin içeren kültür medyumunu eklendi. Normal hücrelerde sadece taze kültür medyum değişimi yapıldı. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 12 saat bekletildi. 1-2-4-8 ve 12. saatlerde ışık mikroskopunda boyama yapılmaksızın 4x ve 40x merceklerle morfolojik inceleme ışık mikroskopunda (Olympus, MSAC Ltd, U.K.) yapıldı.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

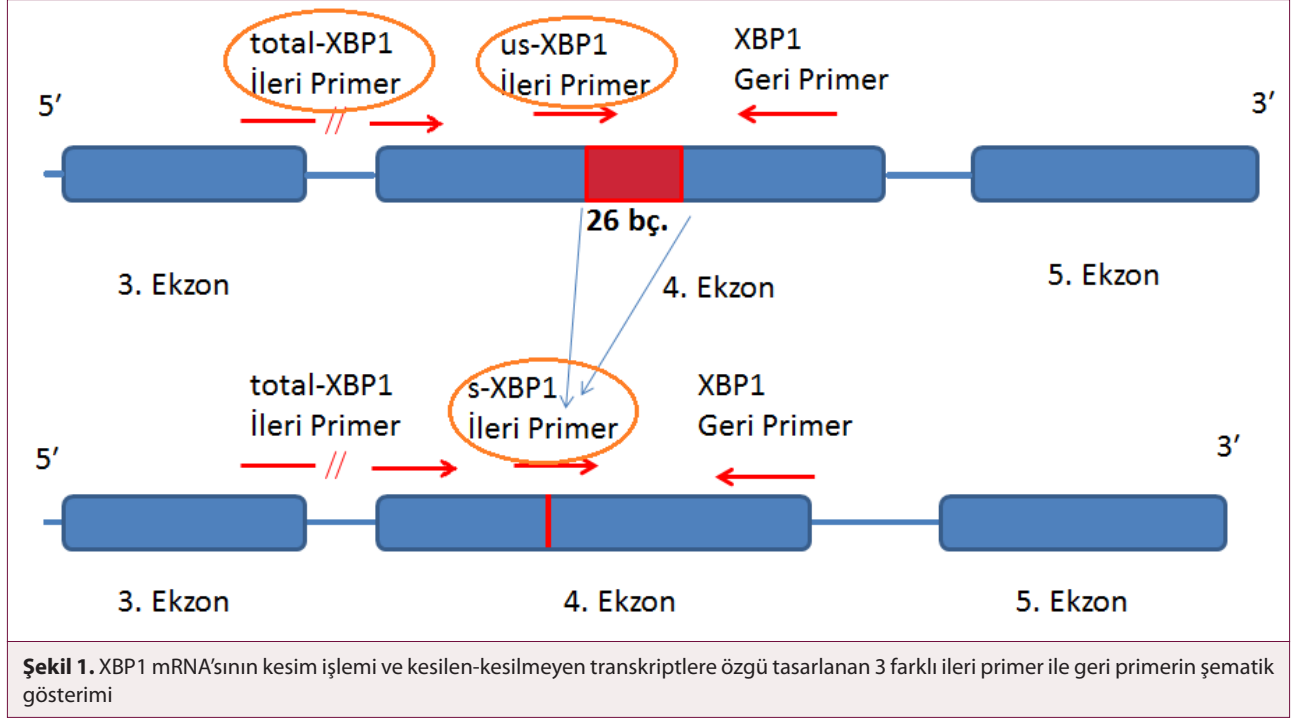
0,5 ve 1 µg/mL konsantrasyonda Tunikamisin uygulanmış hücreler ile normal hücrelerin RNA izolasyonları gerçekleştirildi. İzolasyon, GeneJET RNA Pürifikasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak, minör değişiklikler ile ticari kitin protokolüne göre uygulandı. RNA kalitesi ve miktarı Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak değerlendirildi. cDNA sentezi 100 ng total RNA ve iScript cDNA sentez kiti (Bio-rad, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi

UPR sisteminden seçilen CHOP, BiP, GADD34, ATF4, EDEM1, ASK1, XBP1 (spliced, unspliced ve total), TRAF2, HERP, PDIA4 genlerinin 0,5 ve 1 µg/mL Tunikamisin uygulaması yapılmış hücreler ile normal hücrelerdeki ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile LightCycler 480 (Roche Applied Science) cihazı ve 480 SYBR Green-I Master Kit (Roche, Mannheim, Germany) kullanılarak analiz edildi. XBP1 transkripti ER stresi durumunda IRE1 proteinin endoribonükleaz aktivitesi ile kesime uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüştüğü için bu

genin kırılma varyantı (*s-XBP1*), kesime uğramayan *us-XBP1* ve her iki transkripti tanıyan (*t-XBP1*) ileri primer dizileri, Osowski ve ark. (2) çalışmasındaki gibi sipariş edildi. Şekil 1'de gösterildiği gibi her üç ileri primere aynı geri primer ile PCR yapıldı. *XBP1* primerleri gibi *CHOP* transkriptine özgü primer dizileri de aynı kaynak çalışmadan kullanıldı (2). Diğer genlere ait primerler in-

ternet tabanlı *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche Molecular Systems, Inc., Almanya) programı ile kontrol edilerek belirlendi (13). Her bir primer dizisi internet tabanlı *OligoAnalyzer 3.1* (Integrated DNA Technologies, Inc., ABD) programındaki algoritmalara göre analiz edildi (14). Primer dizileri Tablo 1'de listelendi. Genlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması için



Tablo 1. UPR ile ilişkili ve endojen kontrol genlerin ileri ve geri primer dizileri

Transkriptler	İleri Primer	Geri Primer	Ürün Uzunluğu
<i>BIP</i>	gct gag gct tat ttg gga aag	tta ggc cag caa tag ttc cag	112 bç.
<i>CHOP</i>	aga acc agg aaa cgg aaa cag a	tct cct tca tgc gct gct tt	67 bç.
<i>GADD34</i>	gaa acc cct act cat gat ccg	aaa tgg aca gtg acc ttc tcg	83 bç.
<i>ATF4</i>	ggg tct cca gcg aca agg	tcc aac atc caa tct gtc cc	118 bç.
<i>EDEM1</i>	tct acc cac tga gac cag ag	cgt acc cac act tga ctt ttg	135 bç.
<i>PDIA4</i>	gcg agt ttg tca ctg ctt tc	atg gag tca aag gtc ttt ccc	118 bç.
<i>TRAF2</i>	aag att gaa gcc ctg agt agc	cag atg aag acc cca tcg tag	131 bç.
<i>ASK1</i>	cac cat tac cga aga gaa ggg	gcg tag act atc cca taagt c	135 bç.
<i>HERP</i>	ggg tta agg caa agg gaa gttc	aaa gct gaa gcc acc cat ag	142 bç.
<i>s-XBP1</i>	ctg agt ccg aat cag gtg cag	atc cat ggg gag atg ttc tgg	59 bç.
<i>us-XBP1</i>	cag cac tca gac tac gtg ca	atc cat ggg gag atg ttc tgg	76 bç.
<i>t-XBP1</i>	agc caa ggg gaa tga agt gag	atc cat ggg gag atg ttc tgg	123 bç.
<i>GAPDH</i>	tgg gtg tga acc atg aga ag	gag tcc ttc cac gat acc aaa g	125 bç.
<i>β-Aktin</i>	gac cca gat cat gtt tga gac c	tgg tgg tga agc tgt agc c	252 bç.

GAPDH ve β -Aktin endojen kontrol genlerinin ekspresyon seviyelerinin ortalaması kullanıldı. Tunikamisin uygulanmış hücrelerin normal HEK293 hücrelere göre rölatif kantitasyon (değişim katsayısı; "fold change" değerleri) değerleri, 2^{Δ} -Ortalama Delta Delta Ct değeri hesabı ile elde edildi.

Hedef genlerin ifade düzeyleri, 2'li gruplarda "student-t" testi ile istatistiksel olarak SPSS yazılımı Versiyon 21.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, USA) kullanılarak karşılaştırıldı. Anlamlılık için $p < 0,05$ değeri alındı.

BULGULAR

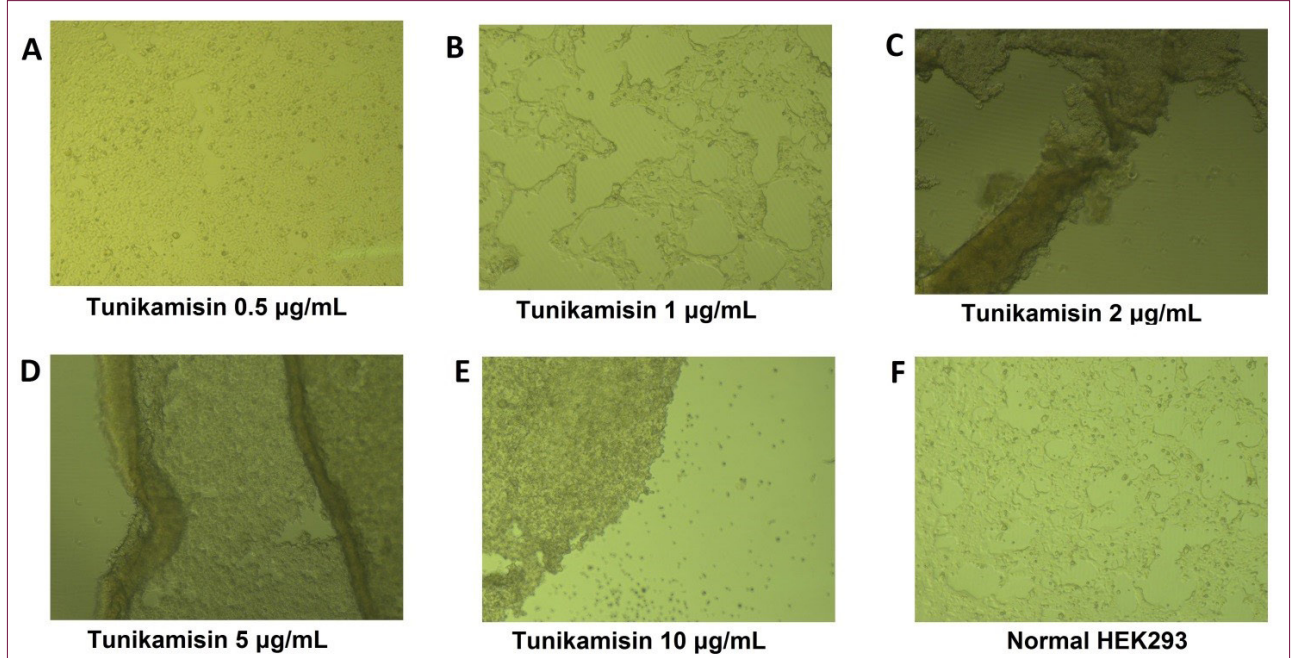
Hücrelerin 1-2-4-8 Saatlik Morfolojik Görüntüleri

Tunikamisin uygulaması yapıldıktan 1 saat sonra alınan ilk görüntülerde yalnızca 0,5 ve 1 μ g/mL dozlarındaki hücrelerin yaşamlarını sürdürdüğü ve HEK293 hücrelerine özgü morfolo-

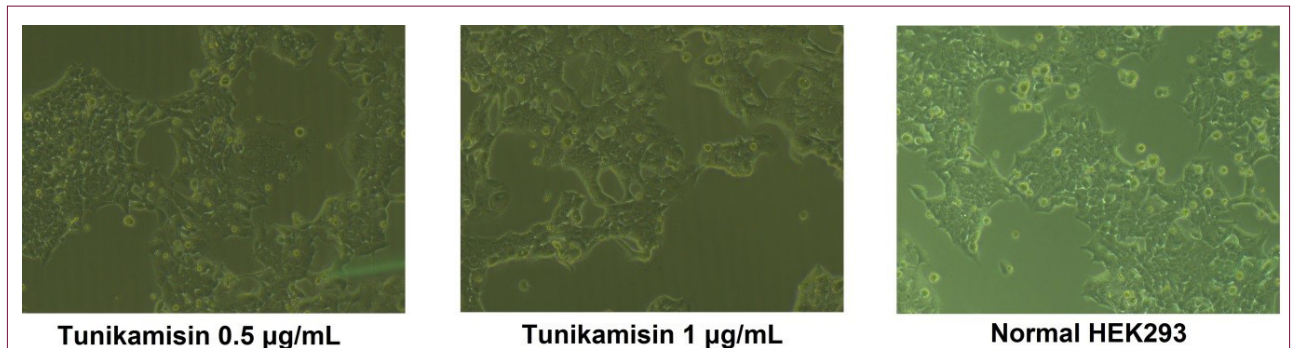
jilerini devam ettirdikleri saptandı (Şekil 2). 2, 4, 8 ve 12 saatlik süreçlerde de hücrelerde morfolojik bir değişim saptanmadı. Total RNA izolasyonu için morfolojileri stabil kalan 0,5-1 μ g/mL konsantrasyonlarda Tunikamisin uygulanmış hücreler ile normal HEK293 hücreleri kullanıldı (Şekil 3).

UPR ile İlişkili Genlerin qRT-PCR Yöntemi ile Analizi

Tunikamisin uygulaması ile ER stresi oluşturuldu. Tunikamisin 0,5 ve 1 μ g/mL doz uygulanmış hücrelerin normal hücrelere göre sırayla UPR sistemi genlerinden *BiP* (24 ve 33 kat), *us-XBP1* (7 ve 10 kat), *s-XBP1* (8 ve 14 kat), *t-XBP1* (6 ve 9 kat), *ASK1* (1,5 ve 4 kat), *ATF4* (1 μ g/mL'de 2 kat), *PDIA4* (14 ve 40 kat), *HERP* (14 ve 28 kat) ve *CHOP* (20 ve 112 kat) ifade düzeylerinde artış saptandı. *TRAF2* geni ifade düzeyinde her iki dozda da 5 katlık azalma saptandı (Tablo 2).



Şekil 2. Tunikamisin uygulamasından 1 saat sonra hücrelerin ışık mikroskopundaki 4x büyütmedeki görüntüleri. 0,5 μ g/mL (a) ve 1 μ g/mL (b) Tunikamisin uygulanmış hücrelerde morfolojik değişim gözlenmedi. Diğer dozlarda ise (c, d, e) ise morfolojilerini kaybettikleri ve yüzeye tutunmadıkları gözlemlendi



Şekil 3. Tunikamisin uygulamasından 12 saat sonra RNA izolasyonu için seçilen hücrelerin ışık mikroskopundaki 40x büyütmedeki görüntüleri

Her üç ana yolağın kontrolünü sağlayan BiP geninin mRNA ifade düzeyinde, Tunikamisin uygulaması (0,5 ve 1 µg/mL) yapılmış hücrelerde kontrole göre yaklaşık 25 ve 33 katlık artış saptandı (Şekil 4) (p<0,01).

IRE1 ve ATF6 yollarının kontrolünde bulunan *XBP1* mRNA'sının kesilmemiş (*us-XBP1*), kesilmiş (*s-XBP1*) ve her iki formuna özgü (*t-XBP1*) ifade düzeylerinin her birinde Tunikamisin uygulaması yapılmış hücrelerde (0,5 ve 1 µg/mL) yaklaşık sırasıyla 6-14 kat arasında değişen artış saptandı (p<0.01). *s-XBP1/us-XBP1* mRNA ifade düzeyleri oranında, 1 µg/mL Tunikamisin uygulaması yapılmış hücrelerde kontrole göre yaklaşık 1,5 kat artış saptanırken (p<0,05), 0,5 µg/mL dozda anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Şekil 5).

Tablo 2. UPR ile ilişkili genlerin Normal HEK293 hücrelerine göre rölatif ekspresyon değerleri

Normal HEK293 hücrelere göre rölatif kantitasyon değerleri		
Transkriptler	Tunikamisin 0,5 µg/mL	Tunikamisin 1 µg/mL
BiP	24,05**	33,19**
ATF4	1,32	2,21**
ASK-1	1,68*	4,47**
GADD34	1,48	1,16
EDEM1	1,5	2,49
PDIA4	14,47**	40,42**
s-XBP1	8,25**	13,98**
us-XBP1	7,23*	9,76**
t-XBP1	5,80**	8,52**
HERP	13,90**	28,25**
TRAF2	0,25**	0,28**
CHOP	20,45**	112,63**

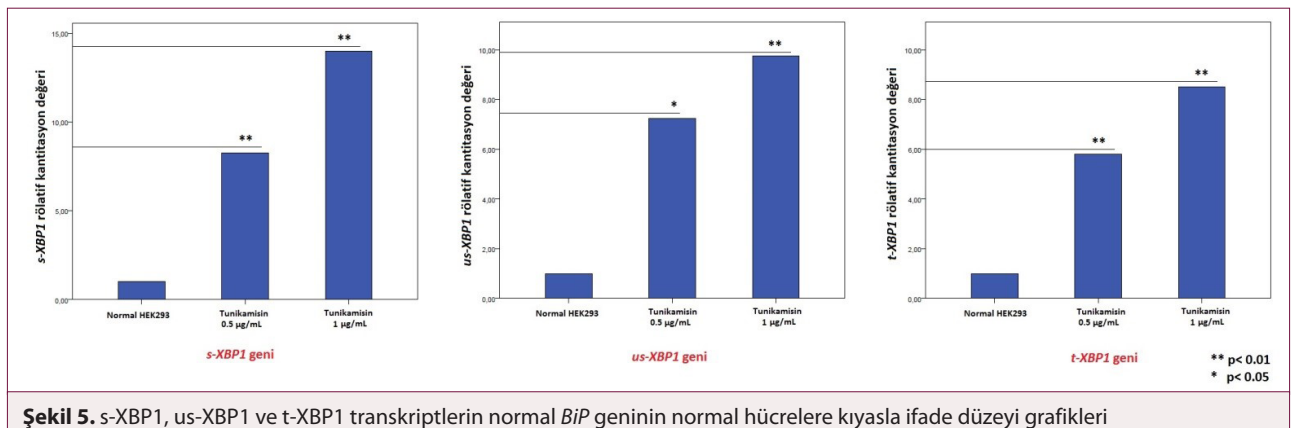
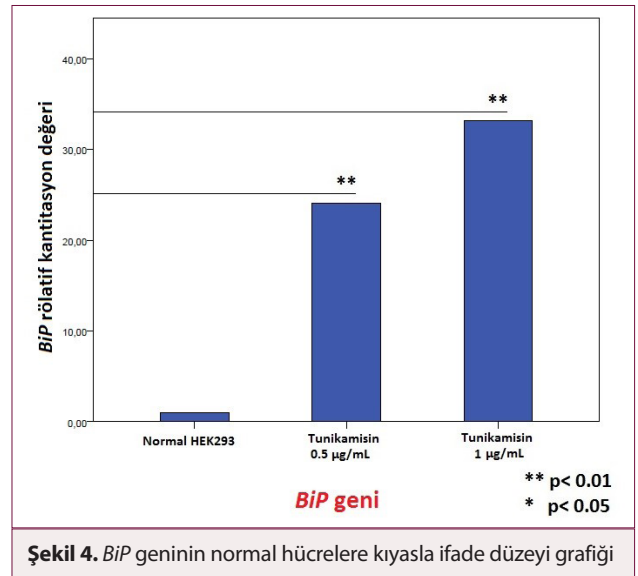
**p<0,01; *p<0,05

IRE1 yolağından seçilen ERAD mekanizmasında görevli *HERP* ve *PDIA4* mRNA ifade düzeylerinde Tunikamisin dozları ile doğru orantıda yaklaşık 14-28 ve 14-40 katlık artış saptandı (Şekil 6) (p<0,01).

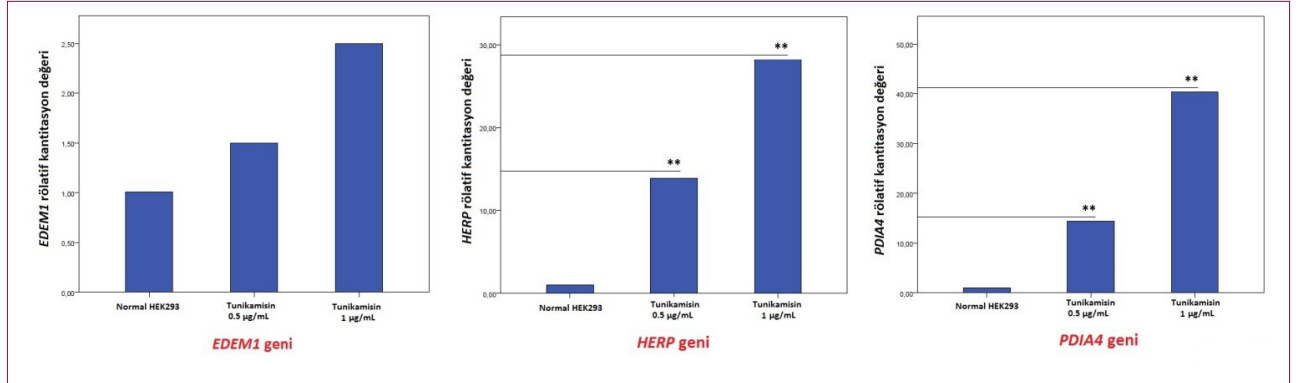
ASK1 mRNA ifade düzeyinde ise Tunikamisin uygulaması (0,5 ve 1 µg/mL) yapılmış HEK293 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık 2 ve 5 katlık artış saptandı (sırasıyla p<0,01 ve p<0,05). *ASK1* ile aynı mekanizmada görev alan *TRAF2* mRNA ifade düzeyinde normal hücrelere göre yaklaşık 5 katlık azalma saptandı (Şekil 7) (p<0,01).

PERK ve ATF6 yolağının kontrolündeki *CHOP* mRNA ifade düzeyinde, Tunikamisin uygulaması (0,5 ve 1 µg/mL) yapılmış hücrelerde kontrole göre yaklaşık 20 ve 112 katlık artış saptandı (Şekil 8) (p<0,01).

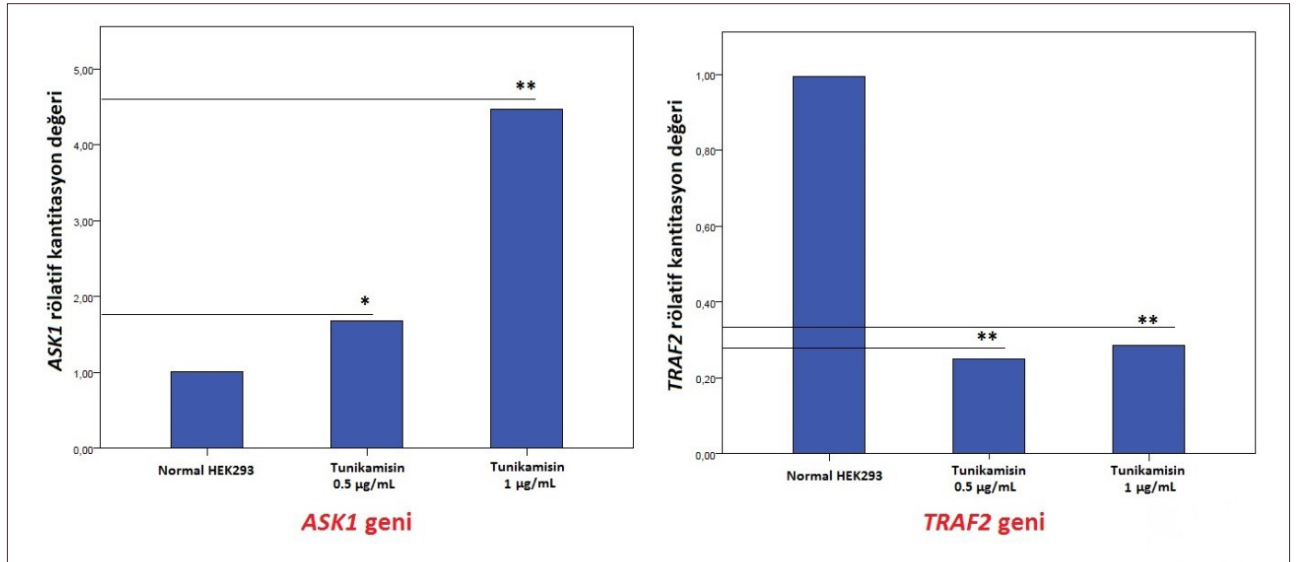
EDEM1 ve *GADD34* genlerinin ifade düzeyleri her iki doz Tunikamisin uygulamasında da anlamlı bir değişim oluşturmadığı saptandı (Şekil 6 ve Şekil 8). *ATF4* mRNA ifade düzeyinde, 0,5 µg/mL Tunikamisin uygulanmış HEK293 hücrelerinde anlamlı bir değişim saptanmamışken, 1 µg/mL'lık dozda kontrole göre yaklaşık 2 katlık artış saptandı (Şekil 8) (p<0,01).



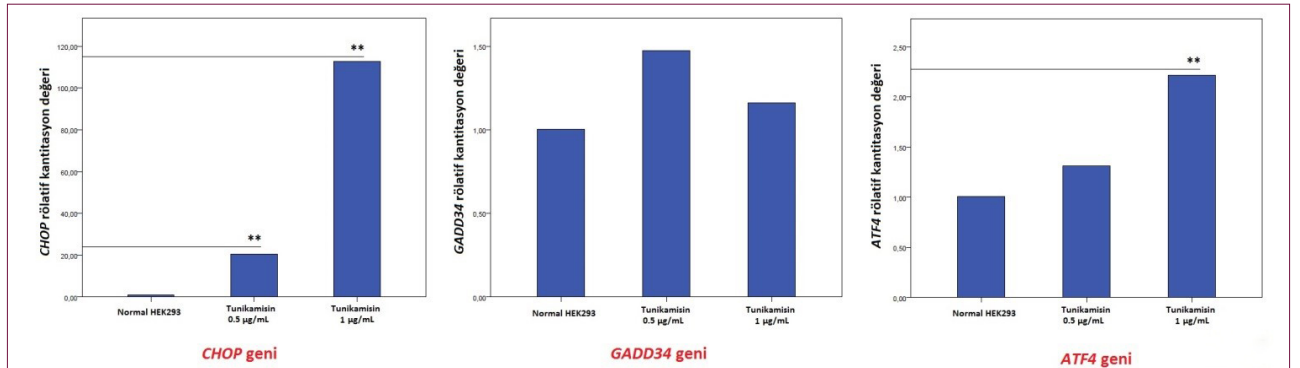
Şekil 5. s-XBP1, us-XBP1 ve t-XBP1 transkriptlerin normal *BiP* geninin normal hücrelere kıyasla ifade düzeyi grafikleri



Şekil 6. ERAD genlerinden EDEM1, HERP ve PDIA4 genlerinin normal hücrelere kıyasla ifade düzeyi grafikleri



Şekil 7. IRE1 proteini kontrolündeki ASK1 ve TRAF2 genlerinin normal hücrelere kıyasla ifade düzeyi grafikleri



Şekil 8. PERK proteini kontrolündeki CHOP, GADD34 ve ATF4 genlerinin normal hücrelere kıyasla ifade düzeyi grafikleri

TARTIŞMA

Bu çalışmada tasarlanan *in vitro* modelde, ER stresi aktivatörü olarak kullanılan Tunikamisin uygulamasının (0,5 ve 1 µg/mL) ile HEK293 hücrelerinin ER stresine yanıt verip vermediği kontrol edilmiştir. Bu amaçla yapılan qRT-PCR yöntemi ile UPR-iliş-

kili genlerden *BiP*, *ASK1*, *PDIA4 s-xBP1*, *us-xBP1*, *t-xBP1*, *HERP* ve *CHOP* rölatif kantitasyon değerlerinde Tunikamisin uygulanmış HEK293 hücrelerin normal hücrelere göre anlamlı artışların olduğu saptandı. *ASK1* ile aynı yoldan olmasına rağmen *TRAF2* geni rölatif kantitasyon değerinde azalma gözlenmiştir. *TRAF2*'nin fosforile halinin UPR sistemde rol oynayarak apoptozu indükeldi-

ği bilinmektedir (15). TRAF2'nin transkripsiyonundaki azalmanın ER strese bağımlı apoptozun IRE1-TRAF2-ASK1 yolu üzerinden gerçekleşmediği düşünülmektedir. Shinjo ve ark. (16) yaptıkları bir araştırmada, Tunikamisin uygulama sonuçlarına göre, 1 µg/mL Tunikamisin UPR sistemini aktive etmek için yeterli olduğu belirlenmişken, 10 µg/mL konsantrasyonun HEK293 hücreleri için öldürücü olduğu ortaya konmuştur. Neuber ve ark. (17) yaptıkları bir başka çalışmada ise, CHOP ile aynı yoldan olan ATF4 geninin 2,5 µg/mL doz ve 24 saat Tunikamisin uygulaması ile ifade düzeyinde artış gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada ise 1 µg/mL ve 12 saatlik Tunikamisin uygulamasında ATF4'ün ifade düzeyinde artış saptanamamasının nedeni, doz ve zamana bağlı olabileceği öngörülmüştür.

Weichert ve ark. (18) yaptıkları çalışmada, XBP1 geninin UPR sistemindeki etkinliğinin hesaplanabilmesi için s-XBP1/us-XBP1 oranlaması yapılmıştır. Bu çalışmada, 0,5 µg/mL dozda s-XBP1/us-XBP1 oranında anlamlı bir değişim olmaması ve 1 µg/mL dozda 1,5 katlık artış (p<0,05) olması ER stresinde XBP1 mRNA'sının kesilmesinin yanı sıra mRNA üretiminin de devam ettiğini göstermektedir. XBP1 mRNA'sının kesim ürünü yanı sıra yeni XBP1 üretiminin devam etmesi ATF6 yolağının aktivasyonunu düşündürmektedir.

2, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonundaki Tunikamisin uygulamasında hücrelerin morfolojik değerlendirmelerinde hücre bütünlüklerinin bozulduğu gözlenmiştir. Ancak bu çalışmanın önemli bir kısıtlılığı, 0,5-1-2-5-10 µg/mL Tunikamisin uygulamasının HEK293 hücrelerinde doz-zaman açısından apoptoz belirleme yöntemlerince (19) değerlendirilememiş olmasıdır.

Sonuç olarak, Tunikamisin maddesi HEK293 hücre hattında 0.5 ve 1 µg/mL konsantrasyonlarında ER strese sebep olmaktadırken 2-5-10 µg/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığının sürdürülemediği saptanmıştır. Bu konsantrasyonlardaki Tunikamisine karşı hücrenin verdiği cevapla IRE1 ve PERK yolağını aktive olarak BiP, ATF4, PDIA4, CHOP ve ASK1 genlerinin ifade düzeylerinde doz miktarıyla uyumlu olarak artış olduğu saptanmış ve ER stresini *in vitro* araştırmak için en uygun deney şartları bu çalışma ile gösterilmiştir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.K., B.V.; Tasarım - E.K.B., B.V., M.A.K.; Denetleme - E.K.B., M.A.K.; Kaynaklar - B.V., E.K.B.; Gereçler - E.K.B., B.V.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - M.A.K., E.K.B.; Analiz ve/veya Yorum - M.A.K., E.K.B., B.V.; Literatür Taraması - M.A.K.; Yazan - M.A.K., E.B.; Eleştirel İnceleme - M.A.K., E.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2017-27803 ve TDP-2017-22581). Ayrıca, kısmi olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 115S137).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval is not required because of the nature of cell culture study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.K., B.V.; E.K.B., B.V., M.A.K.; Supervision - E.K.B., M.A.K.; Resource - B.V., E.K.B.; Materials - E.K.B., B.V.; Data Collection and/or Processing - M.A.K., E.K.B.; Analysis and/or Interpretation - M.A.K., E.K.B., B.V.; Literature Search - M.A.K.; Writing - M.A.K., E.B.; Critical Reviews - M.A.K., E.B.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: TYL-2017-27803 and TDP-2017-22581). Also, it was supported in part by TÜBİTAK (Project No: 115S137).

KAYNAKLAR

1. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 79-94. [CrossRef]
2. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol* 2011; 490: 71-92. [CrossRef]
3. Martins AS, Alves I, Helguero L, Domingues MR, Neves BM. The Unfolded Protein Response in Homeostasis and Modulation of Mammalian Immune Cells. *Int Rev Immunol* 2016; 35: 457-76. [CrossRef]
4. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; 18: 3066-77. [CrossRef]
5. Takatsuki A, Arima K, Tamura G. Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)* 1971; 24: 215-23. [CrossRef]
6. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 2007; 274: 630-58. [CrossRef]
7. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 89-102. [CrossRef]
8. Tong Q, Wu L, Jiang T, Ou Z, Zhang Y, Zhu D. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-activated IRE1 α -TRAF2-caspase-12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 2016; 776: 106-15. [CrossRef]
9. Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 716-31. [CrossRef]
10. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 739-89. [CrossRef]
11. Wakabayashi S, Yoshida H. The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Comput Struct Biotechnol J* 2013; 6: e201303010. [CrossRef]
12. Yirell DL, Roome AP, Darville JM, Ashley CR, Harbour J. Comparison of the continuous cell line 293 with human embryo kidney cells and human embryo fibroblast cells for the cultivation of ocular viruses. *J Clin Pathol* 1983; 36: 996-9. [CrossRef]
13. RocheMolecularSystems. Universal ProbeLibrary Assay Design Center 09.07.2018; Erişim 18.07.2018, <https://lifes->

- science.roche.com/en_tr/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center.
14. IntegratedDNATechnologies. OligoAnalyzer 3.1. 01.05.2018; Erişim 18.07.2018, <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.
 15. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-5. [\[CrossRef\]](#)
 16. Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77: 729-35. [\[CrossRef\]](#)
 17. Neuber C, Uebeler J, Schulze T, Sotoud H, El-Armouche A, Eschenhagen T. Guanabenz interferes with ER stress and exerts protective effects in cardiac myocytes. *PLoS One* 2014; 9: e98893. [\[CrossRef\]](#)
 18. Weichert N, Kaltenborn E, Hector A, Woischnik M, Schams A, Holzinger A, et al. Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells. *Respir Res* 2011; 12: 4. [\[CrossRef\]](#)
 19. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 2: 73-8.