



IRE1 α İNHİBİTÖRÜ GSK2850163'ÜN NÜKLEOZİT METABOLİK İNHİBİTÖRÜ KAPESİTABİN ÜZERİNDEKİ GÜÇLENDİRİCİ ROLÜNÜN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF THE BOOSTER ROLE OF IRE1 α INHIBITOR GSK2850163 ON NUCLEOSIDE METABOLIC INHIBITOR CAPECITABINE IN COLON CANCER CELLS

Yalçın ERZURUMLU^{1,2*} , Yağmur DOĞANLAR¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 32200, Isparta-Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İlaç Araştırma ve Geliştirme Anabilim Dalı, 32200, Isparta-Türkiye

ÖZ

Amaç: Kapesitabin kolon kanseri tedavisine yönelik yaygın olarak kullanılan etkili ajanlardan birisidir. Ancak sistemik yan etkiler ve direnç gelişimi gibi olumsuz durumlar tedavi etkinliğini sınırlandırabilmektedir. Çalışmamızın amacı, UPR sinyal yolunun IRE1 α /XBP-1 dalının seçici inhibitör olan GSK2850163 aracılı inhibe edilmesinin kolon kanseri hücrelerinde kapesitabine olan duyarlılığa olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmalarımızda insan kolon kanseri hücreleri olan Caco-2 ve HT-29 hücreleri kullanılmıştır. Kapesitabin ve GSK2850163'ün hücre canlılığı üzerine olan etkileri WST-1 testi ile incelendi. Takiben belirlenen etkin konsantrasyonlarda kombinasyon çalışmaları ile canlılık analizlerine devam edildi. GSK2850163'ün IRE1 α /XBP-1 yolu üzerindeki inhibe edici etkisi immünoblotlama çalışmaları ile doğrulandı. Kapesitabin ve GSK2850163 eş uygulama tedavisinin hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneği üzerine olan etkileri yara iyileşme ve matrijel-kaplı Boyden-chamber invazyon testi ile değerlendirildi.

Sonuç ve Tartışma: Çalışmamızda IRE1 α /XBP-1'in GSK2850163 aracılı inhibisyonunun kolon kanseri hücrelerinin canlılığını, migrasyon ve invazyon kapasitesini önemli ölçüde sınırladığı belirlendi. Kapesitabin ve GSK2850163'ün eş uygulama tedavisinin yalnız başına kapesitabin veya GSK2850163 uygulamalarına kıyasla kolon kanseri hücreleri üzerinde daha etkili olduğunu gözlemlendi. Araştırma bulgularımız, kolon kanserine yönelik IRE1 α /XBP-1 sinyal yolunun farmakolojik olarak hedeflenmesinin etkili tedavi yaklaşımları sunabileceğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: GSK2850163, IRE1 α , kapesitabin, kolon kanseri, UPR

ABSTRACT

Objective: Capecitabine is one of the widely used potent agents for the treatment of colon cancer. However, adverse events, such as systemic side effects and resistance development, may limit the effectiveness of the treatment. Our study aimed to investigate the impact of GSK2850163-mediated selective inhibition of the IRE1 α /XBP-1 branch of the UPR signaling pathway on the sensitivity of colon cancer cells to capecitabine.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Yalçın Erzurumlu
e-posta / e-mail: yalcin.erzurumlu@gmail.com, Tel. / Phone: +905448878439

Material and Method: Human colon cancer cells Caco-2 and HT-29 were used in our studies. The effects of capecitabine and GSK2850163 on cell viability were examined by WST-1 test. Viability analyses were continued with combination studies to determine effective concentrations. The inhibitory effect of GSK2850163 on the IRE1 α /XBP-1 pathway was confirmed by immunoblotting studies. The impact of capecitabine and GSK2850163 co-administration treatment on the migration and invasion ability of cells was evaluated by wound healing and matrigel-coated Boyden-chamber invasion test.

Result and Discussion: Our study determined that GSK2850163-mediated inhibition of IRE1 α /XBP-1 significantly limited the viability, migration and invasion capacity of colon cancer cells. We observed that co-administration of capecitabine and GSK2850163 was more effective on colon cancer cells compared to capecitabine or GSK2850163 alone. Our research findings suggest that pharmacological targeting of the IRE1 α /XBP-1 signaling pathway for colon cancer may offer effective treatment approaches.

Keywords: Capecitabine, colon cancer, GSK2850163, IRE1 α , UPR

GİRİŞ

Kolorektal kanser kolonda ve/veya rektumdaki dokuların kanserleşmesi nedeniyle ortaya çıkan ve günümüzde özellikle değişen beslenme alışkanlıkları nedeniyle sıklıkla teşhis edilen kanser türlerinden birisidir [1]. Amerika Birleşik Devletleri'nde kolorektal kanser, erkeklerde kanserle ilişkili ölümlerin üçüncü, kadınlarda ise dördüncü önde gelen nedenidir. Amerikan Kanser Derneği'nin 2025 yılı tahminlerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde 107.320 yeni kolon kanseri vakası gözleneceği ön görülmektedir. 2025 yılında yaklaşık 52.900 bireyin yaşamını yitirmesine neden olması beklenmektedir [2]. Günümüzde cinsiyet, yaş, diyet, obezite, sigara kullanımı, alkol tüketimi, sedanter yaşam tarzı, bağırsak mikrobiyotası ve kalıtsal hastalıklar gibi çeşitli risk faktörlerinin kolorektal kanserle ilişkili olduğu tespit edilmiştir [3]. Kolon kanseri tedavisinde çoğunlukla lokal tedavi olarak cerrahi girişim, ablasyon ve embolizasyon, radyoterapi, sistemik tedavi olarak ise kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi gibi yaklaşımlardan faydalanılmaktadır [4].

Kapesitabin oral olarak kullanılan pirimidin analogu olarak bilinen 5-Fluorourasil (5-FU)'in ön ilacıdır ve 5-FU ile aynı hücresel etki mekanizmasını sergileyerek metabolitlerinin DNA ve RNA'ya dahil edilmesi yoluyla antikanser etkiler sergilemektedir [5,6]. Kapesitabin, yaygın olarak kolon kanseri tedavisinde monoterapi, adjuvan tedavi ve metastatik veya ilerlemiş kanserler için diğer ajanlarla kombinasyon tedavisi olarak kullanılmaktadır [7]. Kapesitabin doz-sınır toksisiteeleri arasında diyare, karın ağrısı, bulantı, stomatit ve el-ayak sendromu bulunmaktadır [8]. Bununla birlikte kapesitabin'in yarattığı yan etkiler ve hastalarda gelişen ilaç direnci gibi olumsuz durumlar tedavideki kullanımını sınırlandırabilmektedir [6,9]. Son 10 yılda yapılan çalışmalar, hücrelerdeki endoplazmik retikulum (ER) stresi, katlanmamış protein cevabı (UPR) ve proteostaz kontrolünün kanser ilerlemesi ve kazanılmış ilaç direncinde önemli mekanizmalar olduğuna işaret etmektedir [10,11]. Bu nedenle fizyolojik öneme sahip bu mekanizmaların farmakolojik olarak hedeflenmesi kanser araştırmalarında daha da ilgi çekici hale gelmiştir.

ER; lipid, karbonhidrat ve kolesterol metabolizması gibi önemli fizyolojik biyokimyasal süreçlere ev sahipliği yapmasının yanı sıra ökaryotik hücrelerde protein sentezi için önemli merkezlerden birini teşkil etmektedir [12,13]. Bununla birlikte ER, proteinlerin katlanması, ko- ve post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştirilmesi ve bu proteinlerin olgun formlarına ulaştırılmasının hassas bir şekilde denetlendiği protein kalite kontrolü süreçlerine ilişkin sofistike mekanizmalara ev sahipliği yapan hayati bir organdır [14]. ER'nin kapasitesinin aşılması, genotoksik etkiler, oksidatif stres gibi çeşitli etkenler proteinlerin katlanmasında aksamalara ve bozulmalara neden olarak yanlış katlanmış ve katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesiyle karakterize olan ER stresi adı verilen bir hücresel süreci tetikleyebilmektedir [15]. ER stresinin aşılmasında ve bu yol ile ER homeostazisinin yeniden kurulmasındaki başlıca mekanizma UPR sinyalizasyonudur [15].

Proteostaz koşulları altında moleküler şaperon BiP/GRP78 proteini, ER-membranında lokalize transmembranal özellikteki üç ER stres sensör proteini olan; inozitol gerektiren enzim 1 alfa (IRE1 α), protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 alfa (ATF6 α)'yı inaktif olarak tutmaktadır. ER stresi altında hatalı katlanan proteinler için daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olan BiP/GRP78, bağlı olduğu sensör proteinlerinden ayrılarak UPR

sinyalizasyonunun uyarımına aracılık eder [16]. Bu süreç bir seri sinyal kaskatını aktive ederek transkripsiyonel ve translasyonel düzeydeki adaptif sinyal yollarını uyarmaktadır [16-18]. Son yıllardaki çalışmalar, UPR'nin IRE1 α /XBP-1 sinyal kolunun aktivitesindeki değişimlerin kanser de dahil olmak üzere birçok patoloji ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [17,18].

IRE1 α , sitozolde bir kinaz domainine ve ER'de bir endoribonükleaz domainine sahiptir. IRE1 α 'nın uyarımı oligomerizasyonuna ve oto-fosforilasyonuna neden olmaktadır. Aktive olan IRE1 α endoribonükleaz aktivitesi ile X-box-binding protein 1 (XBP-1u) mRNA'sından 26 bp'lik bir intron splice edilerek aktif bir transkripsiyon faktörü, XBP1'in splice edilmiş formu (XBP-1s) oluşur. Bu oluşum UPR hedef genlerinin ekspresyonunu seçici olarak modüle etmektedir [19,20]. Yapılan çalışmalarda IRE1 α /XBP-1 sinyal yolu modülasyonunun prostat kanseri, meme kanseri ve kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş olup birçok kanser türünde kanser gelişimi ve metastaz ile ilişkisi gösterilmiştir. IRE1 α /XBP-1 kolunun kanser hücre biyolojisindeki süreçlerle ilişkili olması kanser tedavileri için umut verici bir hedef olabileceğinden bu yolağa özgü birçok terapötik ajan geliştirilmiştir [19-23].

Literatürde gerek deneysel açıdan ve gerekse klinik uygulamalarda kanser tedavisine yönelik birçok olası ilaç kombinasyonlarının kullanımları mevcuttur [24,25]. Bu bağlamda antikanser ilaçların kombine kullanımlarının sistemik sitotoksik etkilerden kaçınılmasında, daha etkili yanıtların elde edilmesinde ve gelişen ilaç direncinin üstesinden gelmesinde yaygın olarak araştırılmaktadır [25]. Bu açıdan UPR'nin IRE1 α sinyal kolunun modülasyonu kansere yönelik geliştirilecek yeni terapötik yaklaşımlar açısından önemli bir hedef haline gelmektedir. GSK2850163 fosforile IRE1 α 'ya bağlanarak IRE1 α 'nın endoribonükleaz aktivitesinin inhibisyonu yolu ile XBP-1 splicing sürecini inhibe eder [26]. 2022 yılında yayınlanan bir çalışmada GSK2850163 kullanılarak IRE1 α /XBP-1 yolunun inhibe edilmesinin meme kanseri hücrelerinde tamoksifene karşı duyarlılığı geliştirdiği raporlanmıştır [27].

Bu çalışmada, GSK2850163'ün Caco-2 ve HT29 insan kolon kanseri hücrelerinde kapesitabin üzerindeki iyileştirici etkisinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda kolon kanseri hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi kanser ile ilişkili önemli özellikleri üzerindeki etkileri çeşitli *in vitro* deney modelleri ile test edilmiştir. Ek olarak apoptotik hücre ölümü yolu ile ilişkili bazı genlerin ifade düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız, GSK2850163'ün kapesitabin ile birlikteki eş uygulanmasının, kapesitabin'in Caco-2 ve HT29 hücrelerindeki antikanser etkilerini önemli ölçüde geliştirdiğini göstermiştir. Bulgularımız kolon kanseri hücrelerinde kapesitabin uygulaması ile UPR sinyalinin de farmakolojik olarak eş zamanlı modülasyonunun etkili yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesinde umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyaller

GSK2850163 (#SML1684) ajanı Sigma-Aldrich, kapesitabin (sc-205618) ise Santacruz Biotechnology firmasından temin edildi. Hücre kültürü çalışmalarda kullanılan plastik malzemeler Corning firmasından temin edildi. Hücre kültürü çalışmalarındaki büyüme ortamı, fetal sıgır serumu (FBS) ve diğer büyüme takviyeleri iler hücre kültürü sıvı materyallerinin tamamı Capricorn Scientific firmasından satın alındı. Tavşan poliklonal antikorlar XBP-1u (25997-1-AP) (1:2500) ve XBP-1s (24868-1-AP) (1:2500) Proteintech firmasından temin edildi. Fare monoklonal beta-aktin antikor (A5316) (1:10000) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. HRP-konjuge anti-fare (#31430) (1:500) veya anti-tavşan (#31460) (1:500) IgG (H+L) ikincil antikorlar Thermo Fisher Scientific'ten temin edildi. Thapsigargin (#12758) ajanı Cell Signaling Technology firmasından temin edildi. Hücre kültürü kalitesindeki dimetil sülfoksit (DMSO) (#20385.01) SERVA firmasından satın alındı.

Hücre Kültürü

Caco-2 (HTB-37TM) ve HT29 (HTB-38TM) insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edildi. Caco-2 hücreleri %10 FBS ve 2 mM L-glutamin içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), HT29 hücreleri ise %10 FBS ve 2 mM L-glutamin içeren McCoy's 5a medium kullanılarak konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37 °C ve %5 CO₂ bulunan hücre kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Hücrelerin mikoplazma içermediği

Biological Industries firmasından temin edilen EZ-PCR™ Mikoplazma Tespit Kiti (#20-700-20) kullanılarak rutin olarak doğrulandı.

Hücre Canlılık Analizi

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir kuyucukta 10.000 hücre konsantrasyonunda ekildi. 24 saat sonra hücrelere 48 saat süre ile kapesitabin ve GSK2850163 veya kombinasyonları uygulandı. Kontrol uygulaması olarak hücrelere eş hacimde çözgen uygulaması gerçekleştirildi. Hücrelere uygulanan GSK2850163 DMSO'da kapesitabin ise steril dH₂O'da 1000x konsantre olarak hazırlandı. Hücrelere uygulanan DMSO'nun final konsantrasyonu % 0.05'i aşmamaktadır. 48 saat sonra hücre canlılık düzeyleri WST-1 hücre proliferasyon reaktifi (#MK400) (Takara) kullanılarak üreticinin önerdiği protokol adımları takip edilerek gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 20 µl WST-1 ajanı eklendi ve 2 saat süre ile 37 °C'de inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Takiben mikropilaka okuyucu (BioTek, Epoch 2)'da 450nm dalga boyunda absorbans okuması gerçekleştirildi. Her bir örnek 3 teknik ve 3 biyolojik tekrar şeklinde çalışıldı ve sonuçlar grafikte % canlılık olarak sunuldu. IC₅₀ konsantrasyonları GraphPad Prism 8.0 kullanılarak hesaplandı.

İmmünoblotlama

İmmünoblotlama çalışmaları daha önceki çalışmalarımızda rapor edildiği gibi yürütülmüştür [28]. Basitçe, deney sonlandığında pellet haline getirilen hücreler %1 memeli proteaz inhibitörü içeren radyoimmünopresipitasyon testi (RIPA) tamponu ile lizatlandı. Takiben örnekler 4 °C'de 20 dakika boyunca 14.000 r.p.m' de santrifüj edildi ve total protein içeriğini barındıran süpernatant sonraki adımlarda kullanılmak üzere saklandı. Örneklerdeki total protein içeriğinin belirlenmesi amacıyla bikinkoninik asit protein tahlil yöntemi (BCA) (#23225) (Thermo Scientific) kullanıldı. Çalışmalarda 30 µg protein örneği kullanıldı. Protein örnekleri 4x Laemmli tamponu içerisinde 95 °C'de 5 dakika kaynatılarak proteinler denatüre edildi. El dökümü olarak hazırlanan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jellerine protein örnekleri yüklenerek 2 saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutuldu. Takiben ayrıştırılan protein örnekleri Immun-Blot® poliviniliden diflorür (PVDF) (#1620177) (Bio-Rad) membrana transfer edildi. Bu işlem sonrasında membran sırasıyla bloklama, birincil antikor uygulanması, yıkama işlemi, HRP-konjuge ikincil antikor uygulanması, yıkama işlemi ve kemiluminesans görüntüleme işlemlerine tabi tutuldu. Protein bantlarının görüntülenmesi için Clarity™ Western ECL substrat (#1705061) (Bio-Rad) solüsyonu kullanıldı ve protein bantları Fusion Pulse (Vilber Lourmat) sisteminde görüntülendi.

Yara İyileşme Deneyi

Hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 3.5x10⁵ hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi. 24 saat sonra steril 200 µl mikropipet ucu yardımıyla yara alanları oluşturuldu. Besi ortamı uzaklaştırılarak hücreler steril 1xPBS ile iki kez yıkandı ve taze besiyeri eklendi. Hücreler 72 saat boyunca bileşiklerle tedavi edildi. Yara alanları 0. günde ve 72. günde kamera sistemine sahip olan faz-kontrast mikroskop ile fotoğraflandı (Sunny SopTop microscope). % yara kapanma düzeyleri ImageJ yazılımı (<http://imagej.nih.gov/ij/>) ile analiz edildi. Her bir örnek 3 teknik ve 3 biyolojik tekrar şeklinde çalışıldı ve sonuçlar grafikte % yara kapanma alanı olarak sunuldu.

İnvazyon Analizi

İnvazyon analizleri daha önce tanımlandığı şekilde gerçekleştirildi [33]. Bu kapsamda Matrigel (BD Biosciences) ve serumsuz besiyeri bir tüpte bir araya getirildi (1:8). Karışımdan 45 µl alınarak 8 µm por boyutuna sahip transwell (Sarstedt) yüzeyine uygulandı ve 37 °C'de inkübe edildi. Takiben transwell'in üst bölümüne 100 µl serumsuz besiyeri eklendi ve 30 dakika yeniden inkübe edildi. Her bir transwell'de 10.000 hücre olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirildi. Transwell'in alt bölümü ise %20 FBS içeren besiyeri tamamlandı. Hücrelere ajan uygulaması gerçekleştirildi ve 72 saat sonra göç eden hücreler fikse edilip kristal viyole ile boyanarak hücre sayımı gerçekleştirildi. Her bir örnek 3 teknik ve 3 biyolojik tekrar şeklinde çalışıldı ve sonuçlar % invazyon olarak grafikte sunuldu.

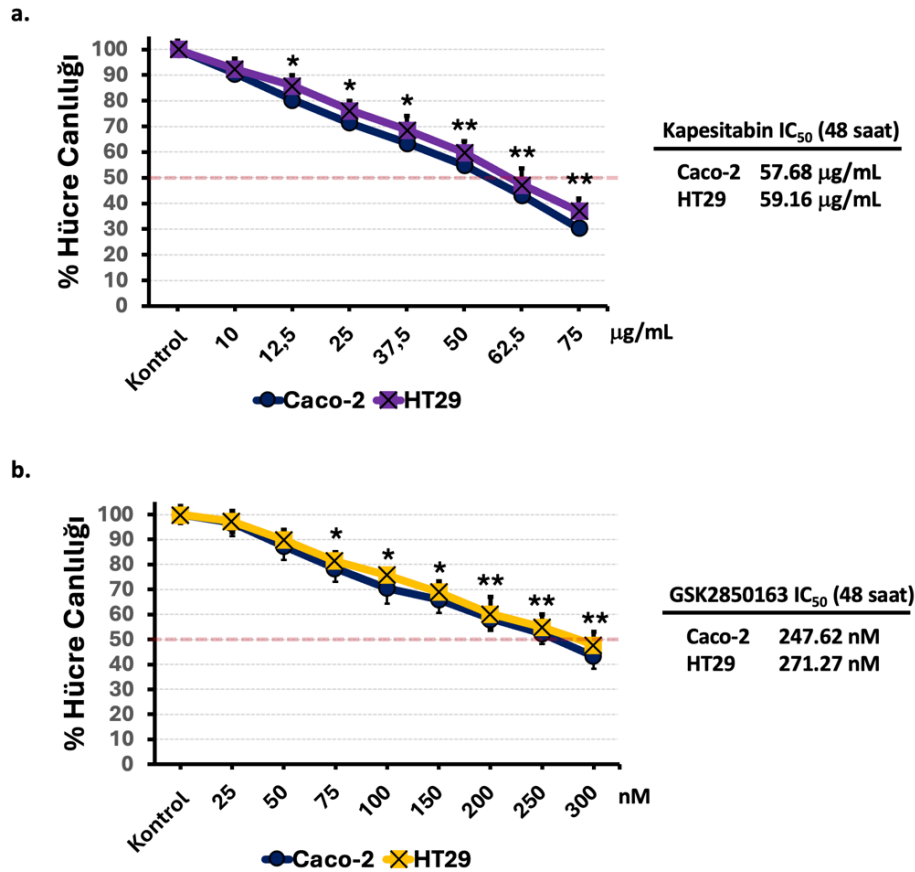
İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılığı GraphPad Prism 8.0 kullanılarak en az %95 güven aralığı ile iki taraflı eşit varyanslı Student t-testi veya tek yönlü ANOVA analizleri ile belirlendi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu.

SONUÇ VE TARTIŞMA

GSK2850163, Kapesitabin'in Kolon Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisini Geliştirdi

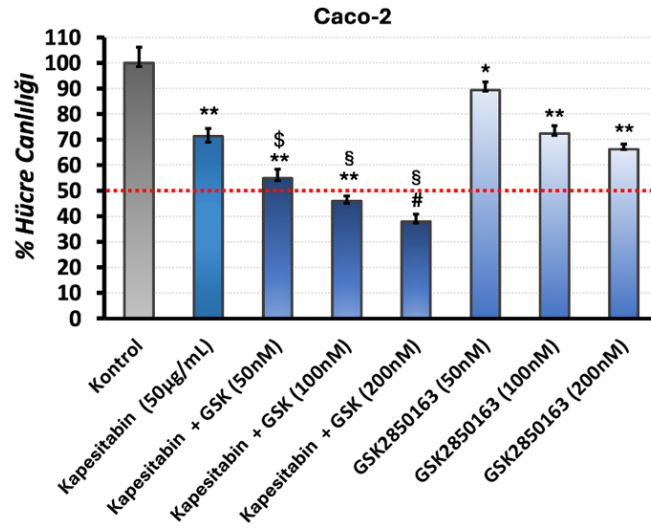
Caco-2 ve HT29 hücrelerinde kapesitabin ve GSK2850163'ün hücre canlılığı üzerine olan etkilerini WST-1 temelli hücre canlılık testleri ile incelenmiştir. Bu amaçla literatür bilgiside dikkate alınarak hücreler 48 saat süreyle 10, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 ve 75 $\mu\text{g/ml}$ kapesitabin ve 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 nM GSK2850163 ile muamele edildi. Takiben WST-1 canlılık analizi gerçekleştirildi. Ayrıca her iki ajan için de IC_{50} konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlarımız her iki ajanında konsantrasyon bağımlı olarak her iki kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığını baskıladığını gösterdi (Şekil 1a ve Şekil 1b). Caco-2 ve HT29 hücrelerinde kapesitabin için IC_{50} konsantrasyonları sırasıyla 57.8 ve 59.16 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi. GSK2850163 için ise 247.62 ve 271.27 nM olarak hesaplandı.



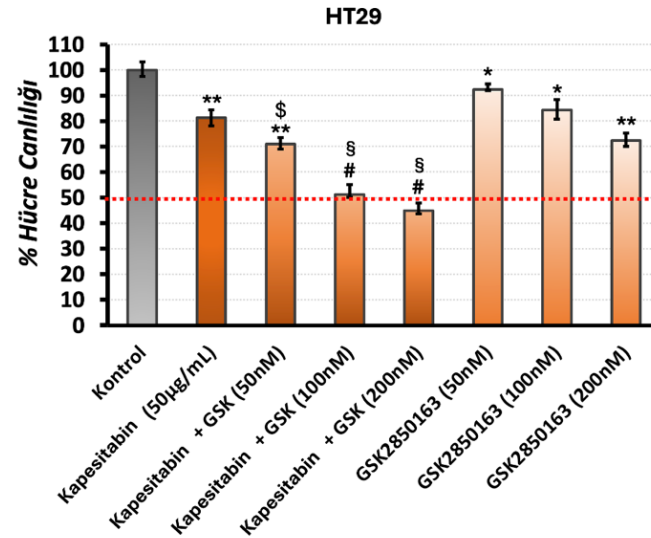
Şekil 1. Kapesitabin ve GSK2850163'ün Caco-2 ve HT29 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin ve bu hücrelerdeki IC_{50} konsantrasyonlarının belirlenmesi. Caco-2 ve HT29 hücreleri **a.** 10, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 ve 75 kapesitabin ve **b.** 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 nM GSK2850163 ile 48 saat süre ile muamele edildi. Takiben hücre canlılığı WST-1 testi ile belirlendi. Her deney üç bağımsız biyolojik ve üç teknik tekrar ile gerçekleştirildi. IC_{50} konsantrasyonları GraphPad Prism 8.0 kullanılarak hesaplandı (Kontrol ile kıyaslamalar * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

GSK28153'ün kolon kanseri hücrelerinde kapesitabin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisine olan katkısını değerlendirmek üzere 50, 100 ve 200 nM konsantrasyonlarındaki GSK2850163 ve 50 µg/ml konsantrasyonundaki kapesitabin ile eş uygulamalarının etkilerini değerlendirdik. Kapesitabin için her iki hücre hattında belirlenen IC₅₀ konsantrasyonu dikkate alınarak 50 µg/ml tercih edildi. Benzer şekilde GSK2850163 için de IC₅₀ konsantrasyonunun altındaki değerler kat artışı olacak şekilde etkileri değerlendirilmek üzere tercih edildi. Sonuçlarımız yalnız başına kapesitabin veya GSK2850163 uygulamasına kıyasla GSK2850163 ile kapesitabin'in kombine uygulanmasının hücre canlılığını daha güçlü düzeyde baskıladığı belirlendi (Şekil 2a ve Şekil 2b). Bu sonuçlar GSK2850163 ile kapesitabin'in eş uygulamasının kolon kanseri hücreleri üzerinde daha güçlü antikanser etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

a.



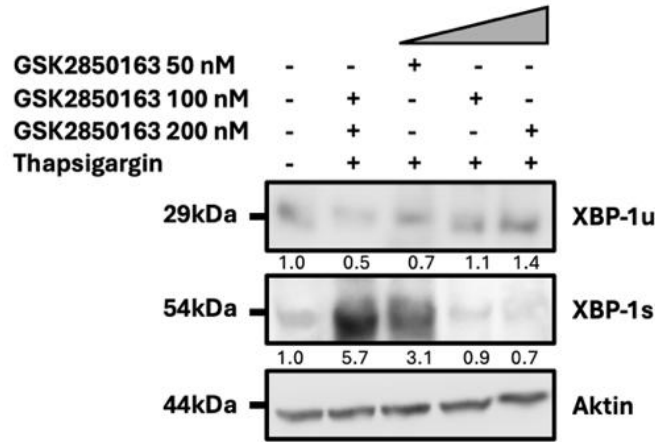
b.



Şekil 2. Kapesitabin ve GSK2850163'ün kolon kanseri hücrelerinin canlılığı zerine olan etkilerinin incelenmesi. **a.** Caco-2 ve **b.** HT29 hücreleri 50, 100 ve 200 nM GSK2850163 ve 50 µg/ml kapesitabin veya kombinasyonları ile 48 saat süre ile muamele edildi. Sonuçlar kontrol grubuna kıyasla % canlılık değişimi olarak grafikte sunuldu. Her deney üç bağımsız biyolojik ve üç teknik tekrar ile gerçekleştirildi (Kontrol ile kıyaslamalar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, # $p < 0.001$, Kapesitabin ile kıyaslamalar; \$ $p < 0.05$, § $p < 0.01$)

GSK2850163'ün IRE1 α 'nın Endonükleaz Aktivitesi Üzerindeki Etkinliğinin Doğrulanması

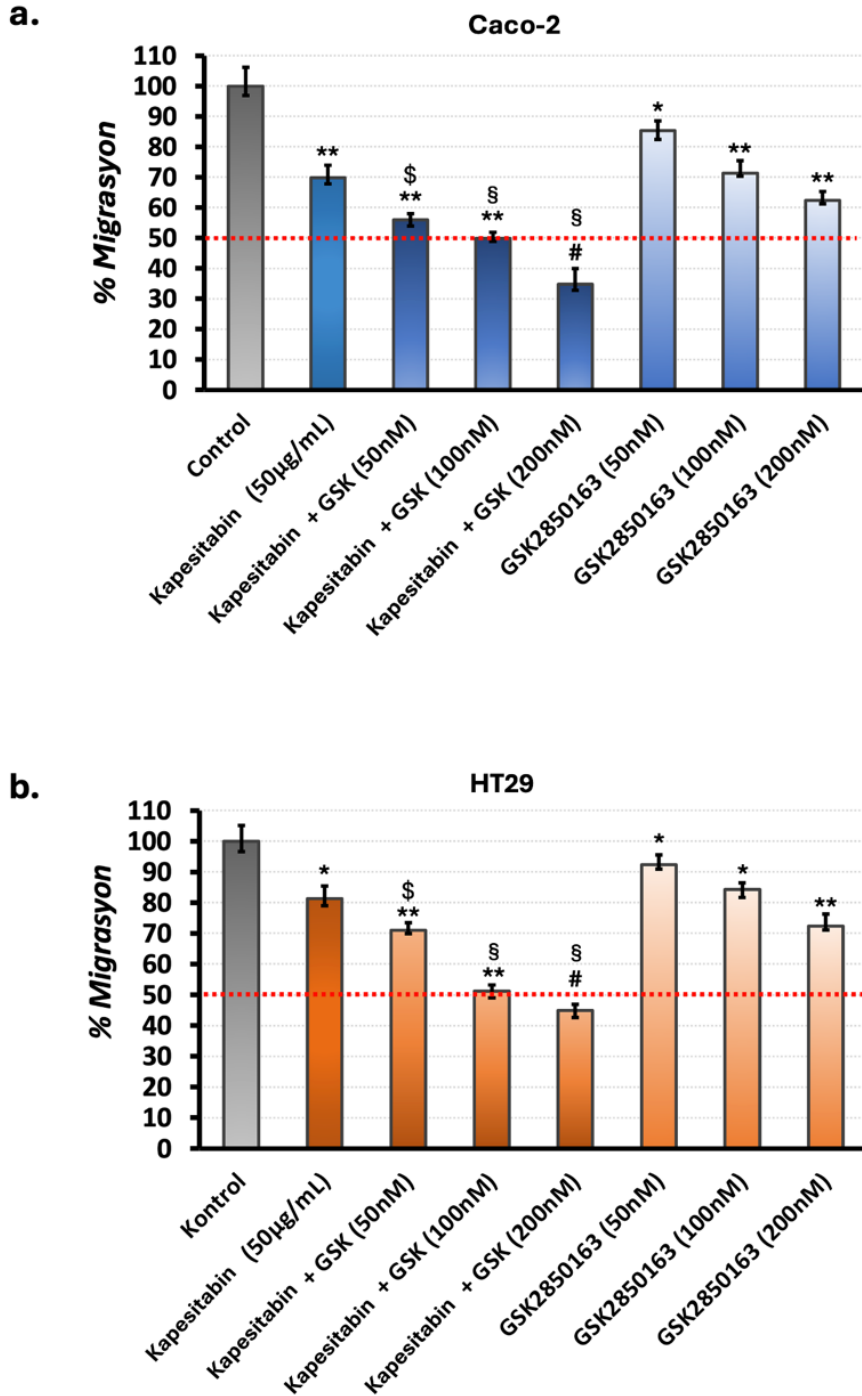
GSK2850163'ün IRE1 α sinyalizasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisini doğrulamak amacıyla XBP-1u ve XBP-1s'nin test edildiği immünoiblotlama çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çalışmalarda pozitif kontrol olarak ER stresini indüklediği iyi bilinen seskiterpen lakton olan thapsigargin ajanı 24 saat süre ile 50 nM konsantrasyonda hücrelere uygulandı [29]. Sonuçlarımız kontrol grubuna kıyasla thapsigargin uygulamasına bağlı olarak XBP-1s düzeylerinde artış gözlemlendiğini bu artışın GSK2850163 uygulaması ile önemli ölçüde konsantrasyon bağımlı olarak baskılandığını ortaya koydu. XBP-1u düzeylerinde ise XBP-1s sonuçlarının tersine thapsigargin uygulamasına bağlı olarak azalma olduğu, GSK2850163 uygulaması ile konsantrasyon bağımlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 3). Bu sonuçlar, kolon kanseri hücrelerine GSK2850163 uygulamasının etkin bir şekilde IRE1 α /XBP-1 sinyal yolunu baskılayabilme yeteneğinde olduğunu gösterdi.



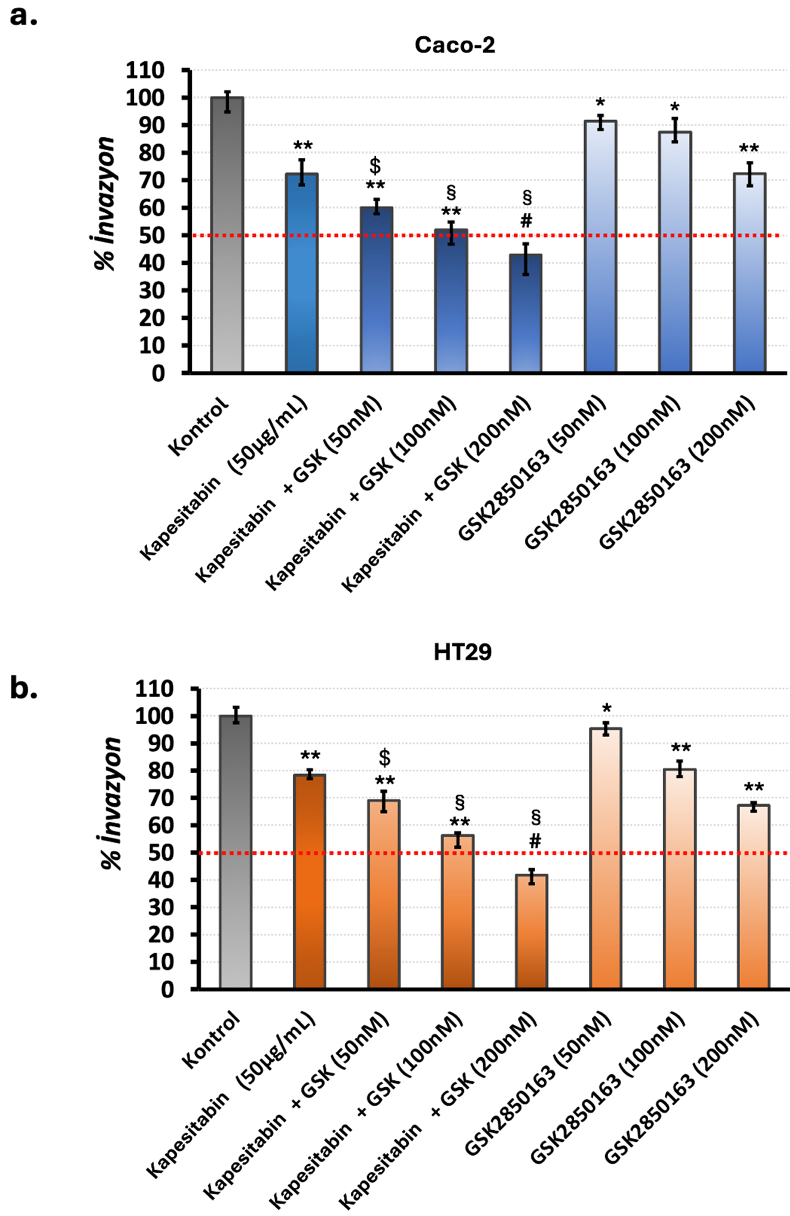
Şekil 3. GSK2850163'ün IRE1 α /XBP-1 sinyali üzerindeki inhibitör etkisinin doğrulanması. Caco-2 hücreleri 50 nM thapsigargin ve 50, 100 ve 200 nM GSK2850163 ile kombinasyonu şeklinde 24 saat süre ile uygulamaya tabi tutuldu. Takiben immünoiblotlama çalışmaları ile ilgili proteinlerin ifade seviyeleri incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Thapsigargin pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol grubu olarak yalnızca çözgen ile muamele edilmiş hücreler kullanıldı. Aktin bantlarına göre normalize edilmiş XBP-1u ve XBP-1s proteinlerinin densitometrik verileri blot görüntülerinin altında sunuldu

GSK2850163 ve Kapesitabin'in Eş Uygulaması Kolon Kanser Hücrelerinin Migrasyon ve İnvazyon Yeteneğini Önemli Ölçüde Baskıladı

GSK2850163'ün kolon kanseri hücrelerinde kapesitabin'in tümörjenik özellikleri üzerindeki etkisinin nasıl değiştiğini anlamaya yönelik gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda kolon kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerindeki değişimler sırasıyla yara iyileşme testi ve matrisel kaplı transwell'lerin kullanıldığı deney modelleri ile test edildi. Bu amaçla hücreler 50, 100 ve 200 nM GSK2850163 ve 50 μ g/ml kapesitabin veya kombinasyonları ile migrasyon deneyleri için 72 saat invazyon deneyleri için ise 48 saat ile muamele edildi. Sonuçlarımız yalnız başına kapesitabin ve GSK2850163 uygulamalarının Caco-2 ve HT-29 hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde baskılandığını ortaya koydu (Şekil 4a ve Şekil 4b) (Şekil 5a ve Şekil 5b). Farklı konsantrasyonlardaki GSK2850163'ün kapesitabin ile kombinasyonel uygulamalarının ise yalnız başına uygulamalara kıyasla daha etkin bir düzeyde hücrelerin tümörjenik özelliklerini baskıladığını göstermektedir. Bu sonuçlar her iki ajanın eş uygulamasının kolon kanseri hücrelerinde daha güçlü antikanser etkilerin gözlemlendiğini önermektedir.



Şekil 4. Kapesitabin ve GSK2850163'ün kolon kanseri hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerine olan etkilerinin incelenmesi. **a.** Caco-2 ve **b.** HT29 hücreleri 50, 100 ve 200 nM GSK2850163 ve 50 µg/mL kapesitabin veya kombinasyonları ile muamele edildi. Yara alanları 72 saat boyunca izlendi. Yara kapanma % değişimleri ImageJ yazılımı kullanılarak 0. saat ile 72. saat arasındaki kapanma alanları üzerinden belirlendi. Her deney üç bağımsız biyolojik ve üç teknik tekrar ile gerçekleştirildi (Kontrol ile kıyaslamalar; * $p<0.05$, ** $p<0.005$, # $p<0.001$, Kapesitabin ile kıyaslamalar; \$ $p<0.05$, § $p<0.01$)



Şekil 5. Kapesitabin ve GSK2850163'ün kolon kanseri hücrelerinin invazyon yeteneği üzerine olan etkilerinin incelenmesi. **a.** Caco-2 ve **b.** HT29 hücreleri 50, 100 ve 200 nM GSK2850163 ve 50 µg/ml kapesitabin veya kombinasyonları ile muamele edildi. 72 saat sonra invazyon sergileyen hücreler kristal viyole ile boyanarak sayıldı. Her deney üç bağımsız biyolojik ve üç teknik tekrar ile gerçekleştirildi (Kontrol ile kıyaslamalar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, # $p < 0.001$, Kapesitabin ile kıyaslamalar; \$ $p < 0.05$, § $p < 0.01$)

ER stresi tümör büyümesi ve invazyonu ile ilişkili önemli bir faktördür [30]. ER stresinin hücrelerdeki regülasyonunda hayati rol oynayan UPR mekanizması, kanser hücrelerindeki progresyon, malignite ve ilaç direnci gelişmesi gibi kansere yönelik önemli özelliklerin süreci açısından sorumlu tutulmuştur. Kanser hücrelerinde UPR genellikle hücre sağkalım fonksiyonuna sahiptir [31]. Memelilerde, UPR'yi IRE1α, PERK ve ATF6 olmak üzere üç transmembran stres sensör proteini düzenlemektedir [32]. Çok sayıdaki çalışma yüksek derecede aktif IRE1α/XBP-1'in hepatoselüler karsinom, prostat, pankreas, meme ve kolon kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [33,34]. Bu durum UPR'nin kanser hücreleri için bir çok açıdan adaptif mekanizma olduğunu desteklemektedir [31]. Bu

nedenle değişen UPR aktivitesinin farmakolojik olarak yeniden bazal düzeylere indirgenmesi kansere yönelik önemli bir yeni tedavi stratejisi olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda klinik uygulamalarda kolon kanserinin tedavisine yönelik sıklıkla kullanılan kapesitabin'in hücreler üzerindeki antikanser etkinliğinin UPR'nin IRE1 α kolunun farmakolojik olarak modülasyonu yolu ile desteklenmesine ilişkin denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla GSK2850163 ajanından faydalanılmıştır. Yakın tarihte keşfedilen GSK2850163 ajanı UPR'nin IRE1 α kolunu modüle eden sensör proteini IRE1 α 'nın kinaz ve RNaz aktivitelerini seçici olarak inhibe etmektedir [34]. Temelde IRE1 α sinyali, IRE1 α 'nın ER stresine bir cevap olarak otofosforilasyona ve dimerizasyona uğraması ile aktive olur. Bu süreçte IRE1 α 'nın aktive olan endoribonükleaz aktivitesi aktif bir transkripsiyon faktörü olan XBP-1s'nin splicing ile oluşumuna izin verir. XBP-1s protein katlanmasını, üretimini veya bozunmasını destekleyen enzimleri ve proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu regüle etmektedir [35]. GSK2850163 ajanı seçici olarak IRE1 α sinyalinin bu etkisini baskılayabilme yeteneğine sahiptir [26,36].

IRE1 α /XBP-1'in kolon kanseri hücrelerinde kapesitabin'in hücre canlılığı üzerindeki sınırlayıcı rolünün GSK2850163 ile eş uygulamasına bağlı olarak değişimini araştırmak için, hücre canlılığı analizleri gerçekleştirdik. Kapesitabin özellikle metastatik tipteki meme ve kolorektal kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan nükleozit metabolizmasına etki eden güçlü bir kemoterapötik ajandır [9,37,38]. Mekanistik olarak kapesitabin kanser hücrelerinde enzimatik olarak florourasile dönüşen bir ön ilaçtır. Güçlü şekilde hücrelerdeki DNA sentezini inhibe ederek, tümör dokusunun büyümesini ve yayılımını yavaşlatmaktadır [38]. Bu açıdan kapesitabin'in etkinliğinin geliştirilebilmesi son derece önemlidir. Sonuçlarımız beklendiği gibi kolon kanseri hücrelerine yalnız başına kapesitabin uygulamasının anlamlı düzeyde kolon kanseri hücrelerinin canlılığını sınırlandırdığını gösterdi (Şekil 1a). Benzer sonuçlar yalnızca GSK2850163 uygulamasına bağlı olarak da gözlemlendi. Eş uygulama çalışmalarımızda dikkat çekici bir şekilde kapesitabin ile artan konsantrasyonlarda GSK2850163 uygulamasının yalnızca kapesitabin veya GSK2850163 uygulamalarına kıyasla daha etkili şekilde kolon kanseri hücrelerinin canlılığını baskıladığını gözlemledik (Şekil 2a ve Şekil 2b). Bu sonuçlar kanser hücreleri için bir adaptasyon ve sağkalım mekanizması gibi çalışan UPR yolunun baskılanmasının kapesitabin'e karşı olan duyarlılığı geliştirdiğini önermektedir.

GSK2850163 tedavisinin verimliliğini test ettiğimiz çalışmalarda, thapsigargin ile uyarılan IRE1 α sinyalinin uyarımı sonrasında oluşan XBP-1s'nin düzeylerinin GSK2850163 ile etkili bir şekilde baskılandığını gözlemledik (Şekil 3). Bu sonuç GSK2850163 uygulamasına bağlı olarak elde edilen sonuçların IRE1 α sinyalinin negatif modülasyonu yolu ile elde edildiğini doğrulamaktadır.

Kanser hücrelerinin en iyi tanımlanan özelliklerinden birisi de bir hayli aktif olan migrasyon ve invazyon yeteneğidir [38]. Özellikle kanser hücrelerinin farklı doku ve organlara yayılmalarında ve yüksek sağkalım yeteneğine sahip olmalarında bu iki süreç son derece önemlidir. Hastalar açısından ise tedavi sürecinde üstesinden gelmesi gereken önemli sınırlayıcı faktörler arasındadır [39,40]. Deney modelimizde GSK2850163'ün kapesitabin'in migrasyon ve invazyon üzerindeki sınırlayıcı olası etkilerini test etmek amacıyla matrigel modifiyeli Boyden Chamber testi ve yara iyileşme deney modelleri kullandık. Sonuçlarımız kapesitabin ile GSK2850163'ün eş uygulanmasının kolon kanseri hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneğinin sınırlandırılmasına yönelik daha etkili olduğunu önermektedir (Şekil 4a ve Şekil 4b) (Şekil 5a ve Şekil 5b). Yapılan çalışmalarda ER stresini aktive eden UPR sinyalinin kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyon da dahil olmak üzere çok sayıda karakteristik özelliğini desteklediği gösterilmiştir [41,42]. Bu açıdan GSK2850163 ile IRE1 α /XBP-1 sinyal yolunun kolon kanseri hücrelerinde hedef alınması ile elde ettiğimiz bulgular literatür ile uyumludur.

Özellikle IRE1 α 'nın kanser tedavisine yönelik olarak geliştirilen tedavi stratejilerine getireceği yeni uygulamalara dikkat çekilmektedir [17,21]. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda da umut verici sonuçlar elde edilmiştir [43-46]. Prostat ve meme gibi hormon bağımlı kanserlerde, kan kanserlerinde, glioblastoma ve pankreatik kanserlerinde önemli bir hedef olarak önerilmektedir [4,44,47-50]. Mevcut araştırma verilerimiz IRE1 α 'nın terapötik açıdan önemini kolon kanseri hücreleri için de desteklemektedir.

Sonuç olarak araştırma bulgularımız kolon kanseri tedavisinde yoğun olarak kullanılan kapesitabin ile birlikte UPR'yi hedef alan farmakolojik yaklaşımların eş olarak kullanılmasının daha etkili terapötik sonuçların elde edilebilmesi açısından önemli bir yaklaşım olabileceğini önermektedir. Gelecek çalışmalarda GSK2850163'ün farklı kemoterapötik ajanlar ile kombinasyonuna ilişkin yeni deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi ve ilaç direnci üzerindeki uzun süreli etkilerinin test edilmesi, terapötik kullanımına ilişkin algımızın geliştirilmesi açısından oldukça değerli olacaktır.

Hücre kültürü temelli yürütülen *in vitro* çalışmaların gerçek tümör mikroçevresini tam olarak mimik edememesi, hücre hatlarının kanser hücrelerinin eşsiz özelliklerini yansıtmadaki sınırlamalar, test edilen ajanların *in vivo* ve klinik uygulamalarındaki doz-zaman aralıklarının optimizasyonlarındaki zorluklar gibi önemli kısıtlılıklar, deneysel çalışmaların daha ileriye taşınmasının önündeki en önemli sınırlamalardır. Bu bağlamda araştırma bulgularımız *in vitro* koşullarda IRE1 α /XBP-1'in hedeflenmesinin kolon kanserinin tedavisine yönelik sürdürülen mevcut uygulamalar üzerinde umut verici bir yaklaşım sunabileceğini gösterse de *in vivo* bulgular ile sonuçların desteklemesi gerekliliğini sürdürmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hayata geçirilmesinde Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından daha önce desteklenen projelerimizin (TSG-2021-8302, TAB-2020-8253) bütçesinden faydalanılmıştır. Bu çalışmanın bir bölümü 19-20 Ekim tarihlerinde düzenlenen "17th International Medicine and Health Sciences Researches Congress" toplantısında sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Y.E.; Tasarım: Y.E.; Denetim: Y.E.; Kaynaklar: Y.E.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Y.E., Y.D.; Analiz ve/veya Yorumlama: Y.E.; Literatür Taraması: Y.E., Y.D.; Makalenin Yazılması: Y.E.; Kritik İnceleme: Y.E., Y.D.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Dekker, E., Tanis, P.J., Vleugels, J.L.A., Kasi, P.M., Wallace, M.B. (2019). Colorectal cancer. The Lancet, 394(10207), 1467-1480. [\[CrossRef\]](#)
2. Siegel, R.L., Kratzer, T.B., Giaquinto, A.N., Sung, H., Jemal, A. (2025). Cancer statistics, 2025. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 75(1), 10-45. [\[CrossRef\]](#)
3. Sandler, R.S. (1996). Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. Gastroenterology Clinics of North America, 25(4), 717-735. [\[CrossRef\]](#)
4. Wiese, W., Siwecka, N., Wawrzynkiewicz, A., Rozpędek-Kamińska, W., Kucharska, E., Majsterek, I. (2022). IRE1 α Inhibitors as a promising therapeutic strategy in blood malignancies. Cancers, 14(10), 2526. [\[CrossRef\]](#)
5. Saeki, T., Takashima, S. (1999). Mechanism and possible biochemical modulation of capecitabine (Xeloda), a newly generated oral fluoropyrimidine. Gan to Kagaku Ryoho. Cancer and Chemotherapy, 26(4), 447-455.
6. Saif, M.W., Katirtzoglou, N.A., Syrigos, K.N. (2008). Capecitabine: An overview of the side effects and their management. Anti-Cancer Drugs, 19(5), 447-464. [\[CrossRef\]](#)
7. Alzahrani, S.M., Al Doghaither, H.A., Al-Ghafari, A.B., Pushparaj, P.N. (2023). 5-Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer (Review). Oncology Reports, 50(4), 175. [\[CrossRef\]](#)

8. European Medicines Agency (EMA) Web site. (2008). Xeloda. Retrieved December 4, 2008, from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xeloda>. Access date: 20 October 2024.
9. Comella, P., Casaretti, R., Sandomenico, C., Avallone, A., Franco, L. (2008). Capecitabine, alone and in combination, in the management of patients with colorectal cancer: A review of the evidence. *Drugs*, 68(7), 949-961. [\[CrossRef\]](#)
10. Khaled, J., Kopsida, M., Lennernäs, H., Heindryckx, F. (2022). Drug resistance and endoplasmic reticulum stress in hepatocellular carcinoma. *Cells*, 11(4), 632. [\[CrossRef\]](#)
11. Qing, B., Wang, S., Du, Y., Liu, C., Li, W. (2023). Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and multidrug-resistant cancers: Hope or frustration. *Frontiers in Pharmacology*, 14. [\[CrossRef\]](#)
12. Arruda, A.P., Parlakgöl, G. (2023). Endoplasmic reticulum architecture and inter-organelle communication in metabolic health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 15(2), a041261. [\[CrossRef\]](#)
13. Basseri, S., Austin, R.C. (2012). Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: Mechanisms and therapeutic potential. *Biochemistry Research International*, 2012, 1-13. [\[CrossRef\]](#)
14. Phillips, B. P., Gomez-Navarro, N., Miller, E. A. (2020). Protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, 65, 96-102. [\[CrossRef\]](#)
15. Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., Xia, X. (2023). Endoplasmic reticulum stress: Molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1-40. [\[CrossRef\]](#)
16. Chen, X., Cubillos-Ruiz, J.R. (2021). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, 21(2), 71-88. [\[CrossRef\]](#)
17. Raymundo, D.P., Doultinos, D., Guillory, X., Carlesso, A., Eriksson, L.A., Chevet, E. (2020). Pharmacological targeting of IRE1 in cancer. *Trends in Cancer*, 6(12), 1018-1030. [\[CrossRef\]](#)
18. Unal, B., Kuzu, O. F., Jin, Y., Osorio, D., Kildal, W., Pradhan, M., Kung, S.H.Y., Oo, H.Z., Daugaard, M., Vendelbo, M., Patterson, J.B., Thomsen, M.K., Kuijjer, M.L., Saatcioglu, F. (2024). Targeting IRE1 α reprograms the tumor microenvironment and enhances anti-tumor immunity in prostate cancer. *Nature Communications*, 15(1), 8895. [\[CrossRef\]](#)
19. Abbasi, S., Rivand, H., Eshaghi, F., Moosavi, M. A., Amanpour, S., McDermott, M.F., Rahmati, M. (2023). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates tumor cell progression and enhances the response to chemotherapy in colorectal cancer. *Medical Oncology*, 40(9), 247. [\[CrossRef\]](#)
20. Bashir, S., Banday, M., Qadri, O., Bashir, A., Hilal, N., Nida-i-Fatima, Rader, S., Fazili, K.M. (2021). The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1. *Life Sciences*, 265, 118740. [\[CrossRef\]](#)
21. Bartoszewski, S., Sławski, J., Collawn, J.F., Bartoszewski, R. (2023). Dual RNase activity of IRE1 as a target for anticancer therapies. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 17(4), 1145. [\[CrossRef\]](#)
22. Shi, W., Chen, Z., Li, L., Liu, H., Zhang, R., Cheng, Q., Xu, D., Wu, L. (2019). Unravel the molecular mechanism of XBP1 in regulating the biology of cancer cells. *Journal of Cancer*, 10(9), 2035-2046. [\[CrossRef\]](#)
23. Sheng, X., Nenseth, H.Z., Qu, S., Kuzu, O.F., Frahnöw, T., Simon, L., Saatcioglu, F. (2019). IRE1 α -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nature Communications*, 10, 323. [\[CrossRef\]](#)
24. Jaaks, P., Coker, E.A., Vis, D.J., Edwards, O., Carpenter, E.F., Leto, S.M., Dwane, L., Sassi, F., Lightfoot, H., Barthorpe, S., van der Meer, D., Yang, W., Beck, A., Mironenko, T., Hall, C., Hall, J., Mali, I., Richardson, L., Tolley, C., Morris, J., Thomas, F., Lleshi, E., Aben, N., Benes, C.H., Bertotti, A., Trusolino, L., Wessels, L., Garnett, M.J. (2022). Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. *Nature*, 603(7899), 166-173. [\[CrossRef\]](#)
25. Gilad, Y., Gellerman, G., Lonard, D.M., O'Malley, B.W. (2021). Drug Combination in cancer treatment-from cocktails to conjugated combinations. *Cancers*, 13(4), 669. [\[CrossRef\]](#)
26. Concha, N.O., Smallwood, A., Bonnette, W., Totoritis, R., Zhang, G., Federowicz, K., Yang, J., Qi, H., Chen, S., Campobasso, N., Choudhry, A.E., Shuster, L.E., Evans, K.A., Ralph, J., Sweitzer, S., Heerding, D.A. Buser, C.A. Su, D.S., DeYoung, M.P. (2015). Long-Range Inhibitor-Induced Conformational Regulation of Human IRE1 α Endoribonuclease Activity. *Molecular Pharmacology*, 88(6), 1011-1023. [\[CrossRef\]](#)
27. Erzurumlu, Y., Doğan, H.K., Çatakli, D. (2022). Inhibition of Ire1 α /Xbp-1 Branch of Upr By Gsk2850163 drives the sensitivity to tamoxifen in breast cancer cells. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 46(3), 839-852. [\[CrossRef\]](#)
28. Erzurumlu, Y., Dogan, H.K., Catakli, D., Aydogdu, E., Muhammed, M.T. (2023). Estrogens drive the endoplasmic reticulum-associated degradation and promote proto-oncogene c-Myc expression in prostate

- cancer cells by androgen receptor/estrogen receptor signaling. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 17(3), 793-811. [\[CrossRef\]](#)
29. Yoshino, H., Kumai, Y., Kashiwakura, I. (2017). Effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis induction in radioresistant macrophages. *Molecular Medicine Reports*, 15(5), 2867-2872. [\[CrossRef\]](#)
 30. Fu, X., Cui, J., Meng, X., Jiang, P., Zheng, Q., Zhao, W., Chen, X. (2021). Endoplasmic reticulum stress, cell death and tumor: Association between endoplasmic reticulum stress and the apoptosis pathway in tumors. *Oncology Reports*, 45(3), 801-808. [\[CrossRef\]](#)
 31. Zhang, W., Shi, Y., Oyang, L., Cui, S., Li, S., Li, J., Xu, X., Wu, N., Peng, Q., Tang, Y., Luo, X., Liao, Q., Jiang, X., Zhou, Y. (2024). Endoplasmic reticulum stress-A key guardian in cancer. *Cell Death Discovery*, 10(1), 343. [\[CrossRef\]](#)
 32. Liang, D., Khoonkari, M., Avril, T., Chevet, E., Krut, F.A.E. (2021). The unfolded protein response as regulator of cancer stemness and differentiation: Mechanisms and implications for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 192, 114737. [\[CrossRef\]](#)
 33. Chen, S., Chen, J., Hua, X., Sun, Y., Cui, R., Sha, J., Zhu, X. (2020). The emerging role of XBP1 in cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 127, 110069. [\[CrossRef\]](#)
 34. Erzurumlu, Y., Doğan, H.K., Çatakli, D. (2022). UPR'nin Ire1 α /Xbp-1 dalının Gsk2850163 Aracılı inhibisyonu meme kanseri hücrelerinde tamoksifene duyarlılığı artırır. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 837-850. [\[CrossRef\]](#)
 35. Le Goupil S., Laprade H., Aubry M., Chevet E. (2024). Exploring the IRE1 interactome: From canonical signaling functions to unexpected roles. *The Journal of Biological Chemistry*, 300(4), 107169. [\[CrossRef\]](#)
 36. Park, S.M., Kang, T.I., So, J.S. (2021). Roles of XBP1s in transcriptional regulation of target genes. *Biomedicine*, 9(7), 791. [\[CrossRef\]](#)
 37. Miger, J., Holmqvist, A., Sun, X.F., Albertsson, M. (2014). Low-dose capecitabine (Xeloda) for treatment for gastrointestinal cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 31(3), 870. [\[CrossRef\]](#)
 38. Xu, D., Chen, X., Li, X., Mao, Z., Tang, W., Zhang, W., Ding, L., Tang, J. (2019). Addition of capecitabine in breast cancer first-line chemotherapy improves survival of breast cancer patients. *Journal of Cancer*, 10(2), 418-429. [\[CrossRef\]](#)
 39. Blum, J.L. (2001). The role of capecitabine, an oral, enzymatically activated fluoropyrimidine, in the treatment of metastatic breast cancer. *The Oncologist*, 6(1), 56-64. [\[CrossRef\]](#)
 40. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. [\[CrossRef\]](#)
 41. Novikov, N.M., Zolotaryova, S.Y., Gautreau, A.M., Denisov, E.V. (2021). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, 124(1), 102-114. [\[CrossRef\]](#)
 42. Urrea, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E., Hetz, C. (2016). Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer. *Trends in Cancer*, 2(5), 252-262. [\[CrossRef\]](#)
 43. Cubillos-Ruiz, J.R., Bettigole, S.E., Glimcher, L.H. (2017). Tumorigenic and immunosuppressive effects of endoplasmic reticulum stress in cancer. *Cell*, 168(4), 692-706. [\[CrossRef\]](#)
 44. Logue, S.E., McGrath, E.P., Cleary, P., Greene, S., Mnich, K., Almanza, A., Chevet, E., Dwyer, R.M., Oommen, A., Legembre, P., Godey, F., Madden, E.C., Leuzzi, B., Obacz, J., Zeng, Q., Patterson, J.B., Jäger, R., Gorman, A.M., Samali, A. (2018). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nature Communications*, 9(1), 3267. [\[CrossRef\]](#)
 45. Sun, H., Lin, D.C., Guo, X., Masouleh, B.K., Gery, S., Cao, Q., Alkan, S., Ikezoe, T., Akiba, C., Paquette, R., Chien, W., Müller-Tidow, C., Jing, Y., Agelopoulou, K., Müschen, M., Koeffler, H.P. (2016). Inhibition of IRE1 α -driven pro-survival pathways is a promising therapeutic application in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 7(14), 18736-18749. [\[CrossRef\]](#)
 46. Jiang, D., Lynch, C., Medeiros, B.C., Liedtke, M., Bam, R., Tam, A.B., Yang, Z., Alagappan, M., Abidi, P., Le, Q.T., Giaccia, A.J., Denko, N.C., Niwa, M., Koong, A.C. (2016). Identification of doxorubicin as an inhibitor of the IRE1 α -XBP1 axis of the unfolded protein response. *Scientific Reports*, 6, 33353. [\[CrossRef\]](#)
 47. Harnoss, J.M., Le Thomas, A., Shemorry, A., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Lu, M., Chen, Y.C.A., Qing, J., Totpal, K., Kan, D., Segal, E., Merchant, M., Reichelt, M., Wallweber, H.A., Wang, W., Clark, K., Kaufman, S., Beresini, M.H., Laing, S.T., Sandoval, W., Lorenzo, M., Wu, J., Ly, J., Bruyn, T.D., Heidersbach, A., Haley, B., Gogineni, A., Weimer, R.M., Lee, D., Braun, M.G., Rudolph, J., VanWyngarden, M.J., Sherbenou, D.W., Gomez-Bougie, P., Amiot, M., Acosta-Alvear, D., Walter, P., Ashkenazi, A. (2019). Disruption of IRE1 α through its kinase domain attenuates multiple myeloma.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(33), 16420-16429. [\[CrossRef\]](#)
48. Jin, Y., Saatcioglu, F. (2020). Targeting the unfolded protein response in hormone-regulated cancers. *Trends in Cancer*, 6(2), 160-171. [\[CrossRef\]](#)
 49. Pelizzari-Raymundo, D., Doultinos, D., Pineau, R., Sauzay, C., Koutsandreas, T., Langlais, T., Carlesso, A., Gkotsi, E., Negroni, L., Avril, T., Chatziioannou, A., Chevet, E., Eriksson, L.A., Guillory, X. (2023). A novel IRE1 kinase inhibitor for adjuvant glioblastoma treatment. *iScience*, 26(5), 106687. [\[CrossRef\]](#)
 50. Lucas, D., Sarkar, T., Niemeyer, C.Y., Harnoss, J.C., Schneider, M., Strowitzki, M.J., Harnoss, J.M. (2025). IRE1 is a promising therapeutic target in pancreatic cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 328(3), 806-824. [\[CrossRef\]](#)