

Katlanmamış Protein Yanıtı Sinyal Yolunun IRE1 α Kolunun Baskılanmasının PANC-1 Pankreatik Duktal Adenokarsinoma Hücrelerinin Tümörjenik Özellikleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Investigation of the Effects of Suppression of the IRE1 α Arm of the Unfolded Protein Response Signaling Pathway on Tumorigenic Characteristics of PANC- 1 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells

Yalçın ERZURUMLU ^{1*} 

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



Ö Z E T

Amaç: Pankreas kanseri pankreas dokusundaki hücrelerden orijin alan bir grup malignite olarak ifade edilmektedir. Gelişen bu malignite pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC) olarak adlandırılmaktadır. PDAC gelişen hastaların sağ kalım oranları oldukça düşüktür ve dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin dördüncü en sık nedenidir. PDAC tümörlerini çevreleyen mikroortamın hipoksik koşulları ve besinden yoksun şartlarının hücrelerde artmış bazal ER stresini uyardığı rapor edilmiştir. Hücrelerde ER stresini kontrol eden Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) adı verilen ve birincil amacı ER homeostazisini yeniden kurmak olan evrimsel olarak korunmuş bir sinyal iletim yolu geliştirmiştir. Son yıllardaki çalışmalar UPR sinyal yolunun karsinogenez sürecine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. ER stresini ve UPR aktivitesindeki değişimlerin ovaryum, prostat, meme ve pankreas kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda UPR'nin regülasyonunda görev alan üç önemli efektör proteininden biri olan IRE1 α 'nın seçici bir inhibitörü olan MKC-3946 ile inhibisyonunun PANC-1 hücrelerinin tümörjenik özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Materyal-Metot: MKC-3946'ün biyokimyasal etkinliği immünoiblottama ile değerlendirilmiştir. MKC-3946'ün PANC-1 hücrelerinin tümörjenik yeteneği üzerindeki etkileri WST-1 temelli hücre proliferasyon ölçümü, koloni oluşturma tahlili, yara iyileşme tahlili ile incelenmiştir.

Bulgular: MKC-3946 uygulaması PANC-1 hücrelerinin tümörjenik özelliklerini anlamlı düzeyde baskılamıştır.

Sonuç: IRE1 α 'nın farmakolojik olarak hedeflenmesi, pankreas kanserine yönelik olarak yeni bir terapötik bakış açısı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: MKC-3946, IRE1 α , Pankreas kanseri, UPR

Alınış / Received: 01.10.2021 Kabul / Accepted: 21.01.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 15.04.2022



ABSTRACT

Objective: Pancreatic cancer is mean as a group of malignancies originating from cells in the pancreatic tissue. This developing malignancy is named pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The survival rate of patients who develop PDAC is very low and is the fourth most common cause of cancer-related death worldwide. Hypoxic and nutrient-deprived conditions of the microenvironment surrounding PDAC tumors have been reported to induce increased basal ER stress in cells. Cells are developed an evolutionarily conserved signal transduction pathway called the Unfolded Protein Response (UPR) that controls ER stress responses in cells, which primary purpose is to restore ER homeostasis. Recent studies have revealed that the UPR signaling pathway contributes to the carcinogenesis process. It has been reported that changes in ER stress and UPR activity are directly related to the development of many types of cancer, including ovarian, prostate, breast, and pancreatic cancer. In our study, the effects of inhibition of IRE1 α , one of the three important effector proteins involved in the regulation of the UPR, with a selective inhibitor, MKC-3946, on the tumorigenic properties of PANC-1 cells were investigated.

Material-Method: The biochemical efficiency of MKC-3946 was evaluated by immunoblotting. The effects of MKC-3946 on the tumorigenic ability of PANC-1 cells were investigated by WST-1-based cell proliferation measurement, colony formation assay and wound healing assay.

Results: MKC-3946 treatment significantly suppressed the tumorigenic properties of PANC-1 cells.

Conclusion: Pharmacological targeting of the IRE1 α in pancreatic cancer may provide a new therapeutic perspective.

Keywords: MKC-3946, IRE1 α , Pancreas cancer, UPR



1. Giriş

Pankreas kanseri pankreas dokusundaki hücrelerden orijin alan bir grup malignite olarak ifade edilmektedir. Hastalarda gözlenen malignitelerin büyük bir bölümü hem duktal hem de asiner hücrelerden gelişmektedir. Gelişen bu malignite pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC) olarak ifade edilmektedir. PDAC'ın hızlı ilerlemesi ve metastatik özellik kazanmasından dolayı hastaların yaklaşık %10'nundan daha azının beş yıllık sağ kalım süresine sahip olduğu görülmektedir [1]. Özellikle PDAC tüm pankreas kanseri vakalarının %90'ından fazlasını oluşturmasına karşın pankreatik kanserlerin insidansının düşük olması nedeniyle tüm kanser türlerinin %2-3'lük bir grubunu oluşturmaktadır. Ancak PDAC gelişen hastaların ölüm oranları yüksektir ve dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin dördüncü en sık nedenidir [2]. Bu nedenle pankreas kanserine ilişkin moleküler patogeneze sürecinin iyi anlaşılması ve bu yönde terapötik yaklaşımların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Kansere karşı yaygın olarak kullanılan radyasyon tedavisi, kemoterapi ve cerrahi girişim gibi geleneksel tedavilerin PDAC hastalarındaki sağkalım oranlarına büyük bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. PDAC hastalarının yalnızca %10-20'lik bir bölümünün rezeksiyona uygun olduğu %80-90 gibi bir bölümünün ise rezeksiyona uygun olmadığı ve ilerlemiş ya da metastatik özellikteki pankreatik kansere sahip olduğu görülmektedir [3,4]. Metastatik formdaki pankreatik kanser hastalarının %20'sinin karsinogeneze sürecini takiben geçen ilk bir yıl içerisinde yaşamlarını yitirmektedir [5].

PDAC tümörleri ve bu tümörleri çevreleyen mikroortamları oluşturan hücrelerin bulunduğu hipoksik koşullar ve besinden yoksun ortamlarından dolayı bu hücrelerde bazal ER stresi görüldüğü rapor edilmiştir [6]. Ayrıca katlanmamış protein yanıtı (UPR, Unfolded Protein Response) uyarımının tümör

oluşumuna ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle PDAC'ta bazal düzeyde seyreden hücrel olarak aktif UPR gözlenmektedir [6].

Endoplazmik retikulum (ER) protein sentezi, katlanması ve trafiği, kalsiyum depolanması ve lipogenezin de dahil olduğu çok sayıda biyokimyasal fonksiyonun düzenlendiği bir organeldir [7]. Özellikle hücrelerde meydana gelen mutasyon, oksidatif stres, ısı şoku ve gelişen patofizyolojik koşullar nedeniyle ER homeostazisi bozulmaktadır. Ayrıca hücrelerdeki artan protein sentezi gereksinimi, glikoz yoksunluğu veya ER'de depolanan kalsiyum düzeylerindeki dengesizlik; ER'nin işlevselliğinde bozulmaya yol açarak ER stresi olarak ifade edilen süreci tetiklemektedir [8].

ER protein sentezi ve transportu için bir portal görevi üstlenmektedir. Bu nedenle ER'ye bağlı ribozomlarda sentezlenen polipeptit zincirlerinin ER'ye transferini takiben katlanma süreci gerçekleşmektedir. Proteinlerin hücrel kompartmanlardaki hedeflerine ulaşabilmeleri ve biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için nihai formlarına ulaşmaları gerekmektedir. Olgun formuna ulaşamayan proteinler ER'de yer alan protein-kalite kontrol mekanizması üyeleri tarafından belirlenerek hücrel düzeydeki olası bir proteotoksik sürecin önüne geçmek üzere proteozomal yıkıma yönlendirilmektedir [9]. ER'de aralıksız devam eden protein kalite kontrol süreci hücrenin artan protein sentezi ihtiyacı gibi nedenlerden dolayı bozulmaktadır. Hücreler ER'de bozulan bu protein-kalite kontrol sürecini yeniden programlayabilmek için *UPR* adı verilen ve birincil amacı ER homeostazisini yeniden kurmak olan evrimsel olarak korunmuş bir sinyal iletim yolu geliştirmiştir [7].

UPR; ER membranında lokalize ER stres sensör proteini olarak da ifade edilen inositol gerektiren kinaz 1 alfa (IRE1 α), protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6) transmembran proteinleri aracılığı ile regüle edilmektedir [7]. Fizyolojik koşullar altında bu sensör proteinleri ER lümeninin iç yüzünde ER'de yerleşik majör şaperon proteini olan BiP/GRP78 (immunoglobulin heavy chain binding protein/78-kDa glucose-regulated protein) tarafından inaktif formda tutulmaktadır. BiP, katlanmamış proteinler ile ER stres sensör proteinlerinin lümen içi alanları arasında dinamik bir denge kurmaktadır. ER içerisindeki serbest BiP'in bazal düzeylerinin ER'de biriken katlanmamış proteinler nedeniyle düşmesi ve ER stres sensör proteinleri ile etkileşimdeki BiP'in ER stres sensörü lümen alanlarına kıyasla katlanmamış proteinlere daha yüksek doğal afinitesi nedeniyle ayrışması sonrasında UPR aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu süreçte hem IRE1 α hem de PERK'in homodimerize olmasını takiben gerçekleşen trans-otofosforilasyon yolu ile IRE1 α ve PERK'in aktivasyonu gerçekleşmektedir. Tam uzunluktaki ATF6 proteini (90kDa) ise UPR hedef genlerini aktive etmek üzere Golgi'ye transfer olarak burada yer alan S1P (site-1-protease) ve S2P (site-2-protease) proteazları tarafından kesime uğrayarak 50kDa'luk sitozolik aktif fragmenti nükleusa transloke olmaktadır [10].

IRE1 α 'nın aktivasyonu ile endoribonükleaz aktivitesi uyarılır ve XBP1 mRNA'sının splicing'e uğrayarak güçlü bir transkripsiyonel aktivatör olan XBP1s oluşumu gerçekleşir [11]. Bu yol ile protein yıkımı ve taşınması ile ilişkili üyelerin ifade düzeyleri ile ER protein katlama kapasitesi ile ilişkili komponentlerin düzeyleri artırılır. Ayrıca IRE1 α 'nın endonükleaz aktivitesi ile IRE1 bağımlı bozunma olarak ifade edilen RIDD (IRE1 dependent decay) aracılı olarak ER membranında mRNA yıkımı gerçekleştirilerek ER'nin yükü hafifletilir [12].

PERK aktivasyonu UPR'nin translasyonel cevaplarını düzenlemektedir. PERK'in kinaz domainin aktivasyonu ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'nın fosforilasyonunu tetikleyerek ribozomal inhibisyona ve global translasyonun zayıflamasına neden olmaktadır. Bu süreç hücreye adaptasyon için zaman kazandırmaktadır [13]. Ayrıca UPR'nin PERK kolunun bir downstream efektör proteini olan ATF4 (activating transcription factor 4) ile protein katlama kapasitesinin artırılması ile ilişkili olan UPR hedef genlerinin ifade düzeylerinde artış sağlanmaktadır [14].

Son yıllardaki çalışmalar UPR sinyal yolunun karsinogenez sürecine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur [18,19]. ER stresi ve UPR aktivitesindeki değişimlerin ovaryum, prostat, meme ve pankreas kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu rapor edilmiştir [19]. Tümör ilerlemesi, süreklilik kazanan hücre bölünmesi, anjiyogenez, migrasyon ve invazyon gibi süreçlerin hemen hemen her aşamasında UPR yer almaktadır [18].

Çalışmalarımızda pankreas kanseri hücrelerinde UPR'nin IRE1 α kolunun MKC-3946 ile bloke edilmesinin tümörigenez ile ilişkilendirilen proliferasyon, koloni oluşturma ve migrasyon gibi yetenekler üzerindeki etkinliği çeşitli yöntemler ile değerlendirilmiştir. Bulgularımız *in vitro* da pankreatik duktal

adenokarsinomayı modelize eden PANC-1 hücrelerinde MKC-3946 ile IRE1 α 'nın bloke edilmesinin hücrelerin tümörijenik yeteneklerini büyük oranda baskıladığını göstermiştir.

2. Materyal ve Metot

Hücre Kültürü: Çalışmalarda American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiş insan pankreatik duktal adenokarsinoma hücreleri %10 FBS içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi yeri ile konvansiyonel hücre kültürü şartlarında (37 °C'de %5 CO₂) kültüre edildi.

İmmünoblotlama: İmmünoblotlama çalışmaları daha önce rapor edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (20). PANC-1 hücreleri RIPA tamponu (50 mM Tris-HCl pH 7.5 içinde 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS) ile lizatlandı. Lizatlanan örnekler 4 °C'de 20 dakika boyunca 14.000 r.p.m'de santrifüj edildi ve hücre pelleti uzaklaştırılarak süpernatant saklandı. Örneklerdeki toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi için BCA protein tahlil kiti (Takara) kullanıldı. Her bir örnek hazırlanan SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez işlemi ile protein içerikleri ayrıştırıldı. Takiben protein örnekleri PVDF membrana transfer edildi. Transfer işlemi sonrasında sırasıyla bloklama, birincil antikor uygulanması, yıkama, HRP konjuge ikincil antikor uygulanması, yıkama ve görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Protein bantlarının görüntülenmesi için ECL substrat kiti (Bio-Rad) kullanılarak ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad) sisteminde gerçekleştirildi. İmmünoblotlamada poliklonal anti-XBP-1u (Proteintech #25997-1-AP), poliklonal anti-XBP-1s antikorları (Proteintech #24868-1-AP) ve yükleme kontrolü olarak monoklonal anti-Beta Aktin (Proteintech #66009-1-Ig) antikorları kullanılmıştır. İkincil antikor olarak anti-tavşan IgG HRP-konjuge ikincil antikor (Cell Signaling #7074) ve anti-fare IgG HRP-konjuge ikincil antikor (Cell Signaling #7076) kullanılmıştır.

Proliferasyon Tahlihi: Hücrelere uygulanan MKC-3946 etanol ile çözülerek 1000 kat konsantre stok (1000x) olarak hazırlandı. Hücrelere 24 saat süre ile 1, 2.5, 5 μ M MKC-3946 uygulaması yapıldı. Kontrol uygulaması olarak hücrelere eş hacimde çözgen uygulaması gerçekleştirildi. PANC-1 hücrelerinin hücre proliferasyon oraları WST-1 hücre proliferasyon reaktifi (Takara) kullanılarak üreticinin önerdiği protokol kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek 3 teknik tekrar halinde değerlendirildi. 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirildi. Hücre ekim işlemini takiben geçen 24 saat sonrasında bileşikler hücrelere 48 saat süre ile uygulandı. Süre sonunda her bir örneğe 20 μ l WST-1 ajanı eklendi ve 2 saat süre ile inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Takiben mikropłaka okuyucu (BioTek, Epoch 2)'da 450nm dalga boyunda absorbans okuması gerçekleştirildi.

Koloni oluşum Tahlihi: PANC-1 hücreleri, 6 kuyucuklu bir plakaya (1000 hücre/ml) ekildi. 24 saat sonra hücrelere 5 μ M MKC-3946 uygulaması gerçekleştirildi ve 72 saat boyunca bir CO₂ inkübatöründe 37 °C'de hücreler büyütüldü. Süre sonunda besi ortamı uzaklaştırılarak hücreler 1xPBS ile yıkanarak gelişen koloniler fikse edildi ve %0.05 kristal viyole solüsyonu (Sigma Aldrich) ile boyanarak faz kontrast mikroskopta incelendi. Sonuçlar kat değişimi şeklinde grafikte sunuldu.

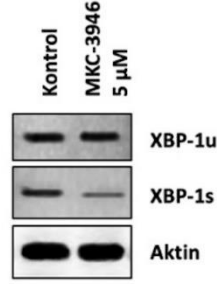
Yara İyileşme Tahlihi: PANC-1 hücreleri, 12 kuyucuklu hücre kültür kabına (3,5x10⁵ hücre/kuyucuk) ekildi ve 24 saat süreyle bir CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübe edildi. Hücrelere yara açma aparatı kullanılarak yara oluşturuldu. İşlem sırasında kültür yüzeyinden ayrılan hücrelerin uzaklaştırılması için 1xPBS ile hücreler yıkandı ve tekrar besi ortamı eklenerek 5 μ M MKC-3946 uygulaması gerçekleştirildi. 72 saat süre ile yara genişliğindeki değişimler faz kontrast mikroskopu kullanılarak izlendi ve fotoğraflamalar gerçekleştirildi. Yara kapanma yüzdesinin analizi, ImageJ yazılımı (<http://imagej.nih.gov/ij/>) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek grubu 3 bağımsız biyolojik ve iki teknik tekrar ile tekrarlandı. Sonuçlar kat değişimi şeklinde grafikte sunuldu.

İstatistiksel Değerlendirme: Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunuldu. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığı GraphPad Prism 5 yazılımı kullanılarak minimum %95 güven aralığı ile Student t testi ile belirlendi. p < 0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Çalışmalarımızda pankreas kanseri hücresi PANC-1'de UPR'nin IRE1 α kolunun MKC-3946 ile bloke edilmesinin PANC-1 hücrelerinin proliferasyon, koloni oluşturma ve migrasyon gibi tümörijenik özellikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak UPR'de yer alan IRE1 α endonükleaz aktivitesini bloke eden MKC-3946'ün biyokimyasal etkinliği IRE1 α 'nın efektör yanıt elemanı olan XBP-1'in alternatif splicing versiyonu incelenerek gerçekleştirilmiştir. XBP-1'in unspliced (XBP-1u) ve spliced (XBP-1s) versiyonlarının protein düzeylerindeki değişimler immünoblotlama ile incelenmiştir. Şekil 1'de

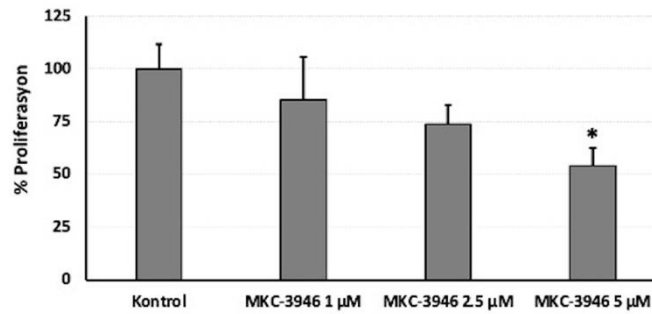
sunulan immüno blot verilerine göre MKC-3946 uygulaması PANC-1 hücrelerinde bazal düzeyde seyreden IRE1 α 'nın downstream efektörü olan XBP-1u/XBP-1s dönüşümünü başarılı bir şekilde inhibe etmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: PANC-1 hücre hattında UPR'nin IRE1 α kolunun MKC-3946 aracılı olarak baskılanması. PANC-1 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra hücrelere 5 μ M MKC-3946 uygulandı. MKC-3946 uygulamasından 24 saat sonra hücreler lizatlanarak immüno blotlama işlem basamakları uygulandı. XBP-1u ve XBP-1s düzeyleri bu proteinlere karşı primer antikorlar kullanılarak tayin edildi. Yükleme kontrolü olarak beta-aktin kullanıldı.

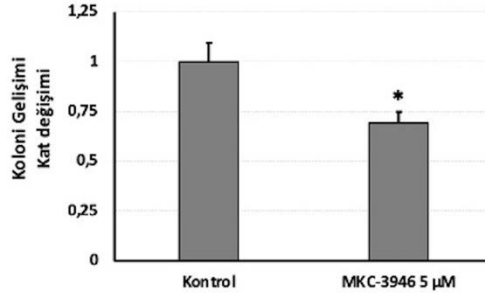
MKC-3946'ün IRE1 α 'nın endoribonükleaz aktivitesinden sorumlu domain ile etkileşerek IRE1 α sinyalizasyonunu bozmaktadır. MKC-3946'nın biyokimyasal aktivitesi için efektif doz 5 μ M olarak rapor edilmiştir [21,22]. İmmüno blotlama çalışmalarımızda da PANC-1 hücreleri için MKC-396'nın biyokimyasal etkinliği için gerekli olan efektif dozun 5 μ M olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Bu nedenle sonraki basamaklarda sürdürdüğümüz fonksiyonel tahliller bu bilgi kullanılarak sürdürülmüştür.

Sonraki aşamada PANC-1 hücrelerine MKC-3946 uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri WST-1 temelli hücre proliferasyonunu ölçmede kullanılan tahlil ile değerlendirilmiştir. Bulgularımız IRE1 α blokajının PANC-1 hücrelerinin proliferasyon düzeylerini 5 μ M MKC-3946 uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde baskıladığını ortaya koymuştur (Şekil 2).



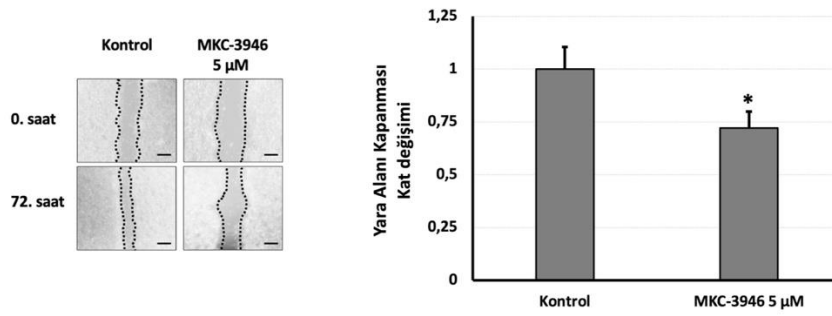
Şekil 2: 1, 2.5, 5 μ M MKC-3946 uygulamasının PANC-1 hücre proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi (* p<0.05).

MKC-3946'ün PANC-1 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkileri değerlendirdiğimiz koloni formasyon tahlil sonuçlarımızda MKC-3946 aracılı UPR'nin IRE1 α kolunun blokasyonu sonrasında kontrol grubuna oranla MKC-3946 uygulanan gruptaki hücrelerin koloniyel gelişim oranlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3: MKC-3946 uygulamasının PANC-1 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi (* p<0.05).

Son olarak migrasyon kabiliyetinin ölçülmesinde de kullanılan yara iyileşme tahlil sonuçlarımızda 5 µM MKC-3946 uygulamasının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde PANC-1 hücrelerinin migratif yeteneğini sınırlandırdığı belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4: MKC-3946 uygulamasının PANC-1 hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi (* p<0.05). PANC-1 hücrelerinde oluşturulan yara 0. saat olarak kabul edilmiştir. Yara oluşumunu takiben geçen 72. Saatin sonunda aynı bölgelerden tekrar fotoğraflama işlemi gerçekleştirilerek yara alanlarında ImageJ yazılımı ile alan hesabı gerçekleştirilerek 0. saate oranlanarak kat cinsinden grafikte gösterilmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

UPR ökaryotik hücrelerde evrimsel olarak iyi düzeyde korunmuş ER membranında yer alan transmembran proteinleri aracılığıyla koordine edilen sofistike bir mekanizmadır [19]. Hücrelerde oluşan ER stresine karşı ve özellikle hücrelerdeki bozulan ER proteostazisinin yeniden düzenlenmesi için vazgeçilmez bir mekanizmadır. Bu adaptif yanıt aracılığıyla ER stres koşullarının üstesinden gelinemez ise hücrelerde apoptotik hücre ölümü indüklenebilmektedir. Özellikle kanser hücrelerinin hızlı bölünme ve yayılcı profillerinin doğası gereği yoğun protein sentezi ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle kanser hücreleri büyük oranda aktif bir UPR profili sergilemektedir [18]. Ancak günümüzde halen daha UPR'nin tümör büyümesini inhibe edip etmediği veya tümör mikroçevresindeki stresli koşullara adaptasyonlarını kolaylaştırarak tümör hücrelerini koruyup korumadığı bazı kanser grupları dışında tam olarak anlaşılamamıştır.

Kanser progresyonu sırasında karsinojenik hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, migrasyon ve invazyon gibi onkojenik özelliklerinin sürdürülebilmesi için protein sentez ihtiyacında artış gözlenmektedir [17]. Özellikle tümör hücrelerinin oksijen ve besin gereksinimi gibi ihtiyaçları tümör mikroçevresi tarafından yeterince karşılanamamaktadır. Bu nedenle tümör hücreleri değişen bu koşullara fizyolojik olarak uyum sağlayabilmek için UPR'nin de dahil olduğu çok sayıda stres yanıtı ile ilişkili mekanizma fonksiyon göstermektedir [18]. Diğer solid tümörlerde olduğu gibi pankreatik tümörlerde de artmış UPR aktivitesi görüldüğü rapor edilmiştir. Özellikle son yıllardaki çalışmalar UPR'nin karsinogenez sürecine destek verdiğini, kanser hücrelerinin proliferatif, migratif ve invazyon yeteneklerini düzenlediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte UPR'nin hücrelerden salınan önemli sinyal molekülleri olan sitokin salınımını da düzenlediğini gösterilmiştir [15,16].

In vitro da pankreatik duktal adenokarsinoma çalışmalarını modelize etmek için PANC-1 hücreleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda PANC-1 hücrelerinde IRE1 α sinyal yolunun inhibe edilmesinin etkilerini araştırmak üzere MKC-3946 ajanından faydalanılmıştır. MKC-3946 hücre geçirgen naftaldehit türevi bir bileşiktir ve IRE1 α 'nın endoribonükleaz aktivitesinden sorumlu olan domainine bağlanarak gerçekleştirdiği inhibisyonu yolu ile XBP-1s oluşumunu bloke etmektedir [21,22]. MKC-3946'nın etkinliğini test ettiğimiz çalışmalarda 24 saat süre ile 200nM MKC-3946 uygulamasının XBP-1s düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 1). Takiben devam eden çalışmalarımızda MKC-3946'ün PANC-1 hücreleri üzerindeki olası anti-proliferatif, koloniyel gelişim ve migratif yeteneği geriletilici etkileri çeşitli tahliller ile değerlendirilmiştir.

Kolon kanseri hücreleri ile yürütülen bir çalışmada IRE1 α sinyal iletim yolunun baskılanması sonrasında *in vitro* ve *in vivo* da hücre proliferasyonunun baskılandığı rapor edilmiştir [8]. Benzer şekilde IRE1 α 'nın RNaz aktivitesinin bloke edilmesi ile meme kanseri hücrelerinde proliferatif yeteneğin azaldığı gösterilmiştir [15]. PANC-1 hücreleri ile sürdürdüğümüz hücre proliferasyonu çalışmalarından elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde meme kanseri hücrelerinde IRE1 α blokasyonu sonrası hücre ölümü ile ilişkili bulguya rastlanmadığı rapor edilmiştir (Şekil 2). Meme kanseri hücrelerindeki proliferatif etkinlikteki duraksamanın hücrelerin G1 fazında tutuklanması nedeniyle gerçekleştiği belirlenmiştir [8,15]. Bu sonuçlar IRE1 α sinyal kolunun hücre döngüsü komponentlerini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyerek buradaki dinamikler üzerinde fonksiyonel bir role sahip olabileceğini önermektedir.

IRE1 α baskılmasının PANC-1 hücrelerinin diğer tümörjenik özelliklerini incelediğimiz tahlillerde MKC-3946 aracılı olarak IRE1 α 'nın biyolojik fonksiyonlarının baskılanması; kanser hücreleri için ayırıcı bir özellik olan koloniyel gelişim ve migrasyon yeteneklerini anlamlı düzeyde inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Şekil 3,4). Özellikle karsinogenez sürecinde kanserli hücre odaklarının hızlı proliferatif özellikleri ve buldukları mikroçevreden iyi düzeyde faydalanmaya adaptasyon bu hücrelere önemli avantajlar sağlamaktadır [23]. Bu nedenle en belirgin tümörjenik özelliklerden olan ilerlemiş koloniyel gelişim yeteneği ve artmış migratif kapasitenin baskılanabilmesi tümör progresyonunun önüne geçilebilmesi açısından önemlidir. Sonuçlarımız UPR'nin IRE1 α kolunun MKC-3946 aracılı olarak baskılanmasının pankreatik duktal adenokarsinomu tedavisi için umut verici bir yaklaşım olduğunu önermektedir.

Her geçen gün hücre proteostazisinin detaylarına ilişkin artan bilgilerimiz, bu süreçte yer alan protein-kalite kontrol mekanizması üyelerinin tümör progresyonu da dahil olmak üzere çok sayıda patolojik süreç ile yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Tümör hücrelerinin artan metabolik ihtiyaçları ve özellikle artmış protein sentez gereksinimi göz önüne alındığında ER'de yer alan protein kalite kontrol mekanizması üyelerinin hedeflenmesinin güçlü bir terapötik odak olacağı öngörülebilmektedir. PANC-1 hücreleri üzerinde sürdürdüğümüz *in vitro* deneysel çalışma sonuçlarımız pankreas kanserinde UPR'nin IRE1 α kolunun farmakolojik olarak hedeflenmesinin pankreas kanseri tedavisine yönelik yeni bir terapötik perspektif sunmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışmadaki bazı analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılan cihazlar ile destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (YETEM)'ne katkılarından dolayı teşekkür ederiz. Laboratuvarımıza hücre hattı desteğinde bulunan Dr. İbrahim Aydın CANDAN'a teşekkür ederiz.

Kaynakça

- [1] Sarantis P, Koustas E, Papadimitropoulou A, Papavassiliou AG, Karamouzis M V. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. World J Gastrointest Oncol. 2020;12(2):173–81.
- [2] Kleeff J, Korc M, Apte M, Vecchia CL, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Ralph Hruban H.. Pancreatic cancer. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16022.
- [3] Ansari D, Gustafsson A, Andersson R. Update on the management of pancreatic cancer: Surgery is not enough. World J Gastroenterol. 2015;21(11):3157–65.
- [4] Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies. Int J Mol Sci. 2017;18(7).

- [5] Mayo SC, Nathan H, Cameron JL, Olino K, Edil BH, Herman JM, et al. Conditional survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma resected with curative intent. *Cancer*. 2012;118(10):2674–81.
- [6] Kong B, Cheng T, Wu W, Regel I, Raulefs S, Friess H, et al. Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2015;6(31):32154–60.
- [7] Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(8):421-438.
- [8] X-X Li, H-S Zhang, Y-M Xu, R-J Zhang, Y Chen, L Fan, Y-Q Qin, Y Liu ML& JF. Knockdown of IRE1 α inhibits colonic tumorigenesis through decreasing β -catenin and IRE1 α targeting suppresses colon cancer cells. *Oncogene* 2017;36:1-9.
- [9] Adams BM, Oster ME, Herbert DN. Protein quality control in the endoplasmic reticulum. 2019; 38(3):317-329.
- [10] Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2004;279(25):25935–8.
- [11] Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SC. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002;15:92-96.
- [12] Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006;313(5783):104–7.
- [13] Heather P. Harding YZ& DR. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999; 397:271-274.
- [14] Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11269–74.
- [15] Logue SE, McGrath EP, Cleary P, Greene S, Mnich K, Almanza A, et al. Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nat Commun* 2018;9(1).
- [16] Talty A, Deegan S, Ljubic M, Mnich K, Naicker SD, Quandt D, et al. Inhibition of IRE1 α RNase activity reduces NLRP3 inflammasome assembly and processing of pro-IL1 β . *Cell Death Dis*. 2019;10(9).
- [17] Dejeans N, Barroso K, Fernandez-Zapico ME, Samali A, Chevet E. Novel roles of the unfolded protein response in the control of tumor development and aggressiveness. *Semin Cancer Cell* 2015;33:67-73.
- [18] Papaioannou A, Chevet E. Driving Cancer Tumorigenesis and Metastasis Through UPR Signaling. *Top Microbiol Immunol* 2018;414:159-192.
- [19] Siwecka N, Rozpędek W, Pytel D, Wawrzynkiewicz A, Dziki A, Dziki Ł, et al. Dual role of endoplasmic reticulum stress-mediated unfolded protein response signaling pathway in carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
- [20] Erzurumlu Y, Ballar P. Androgen Mediated Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and its Effects on Prostate Cancer. *Sci Rep* 2017;7:1–12.
- [21] Volkmann K, Lucas JL, Vuga D, Wang X, Brumm D, Stiles C, et al. Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease. *J Biol Chem* 2011;286(14):12743–55.
- [22] 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 IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* 2012;119(24):5772-81.
- [23] Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res*. 2019;79(18):4557–67.