

İmatinib'e Duyarlı ve Dirençli K562 Hücrelerinde Kalneksinin Protein Ekspresyonunun Araştırılması

Investigation of Calnexin Protein Expression in Imatinib Sensitive and Resistant K562 Cells

Arzu Z. Karabay¹

¹ Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Amaç: Bu çalışmada, çok sayıda kan kök hücrelerinin, sağlıklı beyaz kan hücrelerine dönüşemeyen anormal granülositlere dönüştüğü bir hastalık olan kronik myeloid lösemisinin hücre serisi modeli olan K562 hücrelerinde (K562S) ve KML tedavisinde ilk seçenek olarak uygulanan İmatinib'e karşı direnç geliştirmiş K562 hücrelerinde (K562R), endoplazmik retikulum (ER) şaperon proteini kalneksinin protein düzeylerinin belirlenmesi ve KML tedavisinde kullanılan birinci ve ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörleri İmatinib ve Nilotinib'in kalneksin protein düzeyi üzerindeki etkilerinin ve hücre canlılığı parametrelerine olan etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, KML'nin blast fazının hücre modeli olan K562S (İmatinib'e duyarlı) hücre serisi ve İmatinib'e (5uM) karşı dirençli hale getirilmiş K562R hücre serileri kullanılmıştır. Hücreler, paralel olarak kültür edilmişlerdir. 0.5 uM İmatinib ve 0.05 uM Nilotinib ile tedavi edilen ve edilmeyen K562S ve 20 uM İmatinib ve 0.1 uM Nilotinib K562R ile tedavi edilen ve edilmeyen K562R hücreleri tedaviden 48 saat sonra toplanarak MTT testi ile hücre canlılığı, akım sitometri ile apoptoz tayini, ışık mikroskopisi ile hücre morfolojisi ve total hücre ekstraktlarında western blot ile kalneksin protein ekspresyonu belirlenmiştir.

Bulgular ve sonuç: Bu çalışmada, endoplazmik retikulumda proteinlerin katlanmasını düzenleyen bir şaperon olan kalneksinin total hücre ekspresyonunun K562S ve K562R hücreleri arasında anlamlı değişiklik göstermediği belirlenmiştir, ancak, İmatinib ve Nilotinib'in duyarlı hücrelerde bu proteinin düzeyini anlamlı olarak düşürmesi ve dirençli hücrelerde anlamlı etki göstermemesi, bu ilaçların etki mekanizması arasında ER stres yolağı ve olasılıkla kalneksin proteininin yer aldığına işaret edebilir ve duyarlı ve dirençli hücreler arasında her ne kadar kalneksin düzeyinde fark bulunmasa da ER stres yolağında farklılıklar bulunabileceğinin bir göstergesi olabilir. İleri çalışmalar için, ilaca duyarlı ve dirençli hücrelerde kalneksin ve ilişkili bileşenlerin farklı hücre içi kompartmanlardaki değişiminin ve ilaçlarla modülasyonunun daha geniş olarak araştırılması önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: *Kalneksin, K562, lösemi, ilaç direnci*

Aim: The aim of this study is to determine the expression levels of endoplasmic reticulum (ER) chaperon protein calnexin in K562 cell line which is the cell line model of chronic myeloid leukemia characterised with the transformation of numerous blood stem cells into abnormal granulocytes. Calnexin levels in K562 cells and its resistant counterpart (K562R) to Imatinib, the first line therapy option for CML were examined. In addition, effects of first and second generation tyrosine kinase inhibitors, Imatinib and Nilotinib on calnexin levels and cell viability parameters in K562S and K562R cells were also determined.

Material and Method: In this study, K562S (sensitive to Imatinib) cell line, which is the cell model of the blast phase of CML, and K562R cell lines, which are resistant to imatinib (5uM), were used. Cells were cultured in parallel. K562S cells treated with or without 0.5 uM imatinib and 0.05 uM Nilotinib and K562R cells treated with or without 20 uM Imatinib and 0.1 uM Nilotinib were collected 48 hours after treatment and cell viability, apoptosis, cell morphology and calnexin protein expression were determined with MTT assay, flow cytometry, light microscopy and western blot respectively.

Results and conclusion: In this study, it was shown that the total cellular expression of calnexin, a chaperone that regulates the folding of proteins in the endoplasmic reticulum, did not show any significant difference between the K562S and K562R cells. On the other hand, since Imatinib and Nilotinib significantly decreased calnexin protein expression in K562S cells and did not show any significant effect on K562R cells, this may indicate that the ER stress pathway and possibly calnexin are involved in the action mechanisms of these drugs. Therefore, even if no significant difference in calnexin levels was found between K562R and K562S cells, there may be differences in the ER stress pathway between the sensitive and resistant cells. For further studies, it is suggested to investigate the distribution of calnexin in different intracellular compartments as well as its modulation with drugs.

Key words: *Calnexin, K562, leukemia, drug resistance*

Geliş Tarihi: 21.02.2018 • Kabul Tarihi: 13.04.2018

İletişim

Dr. Öğr. Üyesi Arzu Z. Karabay

E-posta: Arzu.Zeynep.Karabay@ankara.edu.tr
Tel: 0 312 203 30 60

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Tandoğan Ankara

Endoplazmik retikulum, çeşitli proteinlerin sentezlenmesi, katlanması, modifikasyonu ve taşınmasının yanı sıra kalsiyum dengesinin sağlanmasında önemli rollere sahip hayatsal bir organdır (1,2). ER homeostazındaki bozukluklar, ER stres olarak adlandırılmakta, bu durumda ER kalite kontrolünde görevli pek çok genin ekspresyonu değişmekte, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler ER'de birikmektedir (3, 4). Yakın zamanda, ER stresin, aralarında kanserin de bulunduğu pek çok hastalığın patolojisinde rol aldığı gösterilmiştir (5,6,7,8).

Kalnekisin, yeni sentezlenen glikoproteinlerin doğru katlanması ve kalite kontrolünün gerçekleşmesinde görev yapan ve ER'de lokalize bir lektin şaperondur (9,10). Çoğu diğer ER şaperondan farklı olarak, transmembran ve sitozolik bölgelere sahiptir ve bu bölgeler, protein katlanmasını etkilemenin yanında kalnekisin farklı sitoplazmik moleküllerle etkileşimine ve ER spesifik membran bölgelerini hedeflemesine izin vermektedir (11,12,13). ER stresin indüklenmesinde görev yapan kalnekisin çeşitli kanserlerdeki rolleri araştırılmış ve bu çalışmalarda kalnekisin kolon kanserinde prognostik bir belirteç ve hedef olabileceği, tiroid tümörigenezinde dereglasyon sergilediği, akciğer kanserinde yeni bir sero-diagnostik belirteç olabileceği, keratosistik odontogenik tümörlerde aşırı ekspresyon sergilediği sonuçları bulunmuştur (14,15,16,17). Serez ve ark.'nın L1210 fare lösemi hücrelerinde yapmış oldukları çalışmalarda ise, kalnekisin ilaca duyarlı ve dirençli hücreler arasında farklı ekspresyon sergilediği ve Thapsigargin tedavisinin kalnekisin düzeyi üzerinde anlamlı etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir (18,19).

Kronik myeloid lösemi (KML), çok sayıda kan kök hücresinin, sağlıklı beyaz kan hücrelerine dönüşemeyen anormal granüositlere dönüştüğü bir hastalıktır. Bcr-Abl onkogeni ve bu onkoge-

nin ürünü olan Bcr-Abl proteini sürekli ve anormal tirozin kinaz aktivitesi sergilemekte ve kronik myeloid lösemide merkezi rol oynamaktadır (20). Kronik myeloid lösemi için ilk tedavi seçeneği olarak kullanılan ilaç, Bcr-Abl kinaz inhibitörü olan İmatinib'tir. Her ne kadar, İmatinib tedavisi ile KML tedavisinde olumlu sonuçlar alınmış olsa da, İmatinib'e karşı intrinsik ve edinilmiş direnç gözlenmektedir ve ilaca karşı oluşan bu direnç, klinikte önemli bir sorun oluşturmalarının yanında KML araştırmaları için de bileşenleri açıklanması gereken bir durumdur (21,22). Literatürde, KML ve KML'de gelişen ilaç direncinde ve çeşitli antikanser ilaçların bu hücreler üzerindeki etkilerinde ER stresin rolünün araştırıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, İmatinib' in arsenik trioksitle kombinasyonunun, İmatinib'e dirençli KML'de ER stres aracılı apoptozu indüklediği (23), ER strese indüklenen PERK-eIF2α fosforilasyonunun KML hastalarında ve imatinib direncinde indüklendiği bildirilmiştir (24). KML ve İmatinib'e dirençli KML'de, ER stress ilişkili bir şaperon olan kalnekisin araştırıldığı bir çalışmaya ise literatürde rastlanmamıştır. ER stresin kanser patogenezi içinde önemli rolünden hareketle, bu çalışmada İmatinib'e duyarlı ve dirençli kronik myeloid lösemi hücrelerinde bir ER şaperon proteini olan kalnekisin protein ekspresyonunun değişip değişmediği araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, İmatinib'e duyarlı ve dirençli kronik myeloid lösemi hücrelerinde, birinci ve ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörleri İmatinib ve Nilotinib'in, hücre ölümünü ve apoptozu anlamlı olarak indükledikleri konsantrasyonlarda kalnekisin proteini üzerine olan etkileri de değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü

Bu çalışmada K562 kronik myeloid lösemi ve İmatinib'e dirençli K562 lösemi hücre serileri kullanılmıştır. İmatinib'e

dirençli hücre serisi, Prof. Gambacorti Passerini'den temin edilmiş ve 0.2 uM olan ilaç direnci laboratuvarımızda 5 uM'a çıkarılmıştır. Hücreler, 75 cm² flasklarda, 37 °C'de ve 5% CO₂ içeren ortamda, 10 % FBS, 1% L-glutamin ve 1 % penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde kültür edilmişlerdir. Hücreler %80 konfluent olduklarında besiyeri değiştirilerek pasajları yapılmıştır.

MTT testi

K562s ve K562r hücreleri, İmatinib ve Nilotinib varlığında ve yokluğunda 48 saat inkübe edildikten sonra, hücreler toplanarak MTT'nin 5 mg/ml solusyonunda 4 saat bekletilmiş ve sonrasında oluşan formazan kristallerin çözücü ajanın ilavesiyle çözülmesi sağlanmıştır. 570 nm'de absorbans ölçülerek hücre canlılığı analiz edilmiştir.

Akım Sitometri

İmatinib ve Nilotinib varlığında ve yokluğunda 48 saat inkübe edildikten sonra hücrelerdeki canlılık değişiminin, apoptoz ve nekrozun saptanması için, Annexin V-PE ve 7-AAD ile boyanan hücreler akım sitometride ölçülmüştür. Canlı (Annexin V-PE-/7-AAD-), erken apoptotik (Annexin V-PE+/7-AAD-), ileri apoptotik (Annexin V-PE+/7-AAD+) ve nekrotik (Annexin V-PE-/7-AAD+) hücrelerin yüzde olarak oranları grafiğe geçirilmiştir.

Hücrelerin toplanması ve liziz

K562s ve K562r hücreleri, toplanarak iki kez PBS ile yıkandıktan sonra, Active Motif'in whole cell extraction liziz tamponu kullanılarak ve üretici firmanın direktiflerine göre total lizatlar elde edilmiştir. Total lizatlarda protein tayini Bradford metodu ile yapılmıştır.

Western Blot

Eşit miktarda protein içeren lizatlar, NEBx3 (New England Biolabs) redukleiyici mavi yükleme tamponu ile kaynar su banyosunda denatüre edil-

mişlerdir. Lizatlar, eşit hacimde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için jellere yüklenmişler ve daha sonra Bio-Rad Tetra hücre blotlama modülünde PVDF membranlara transfer edilmişlerdir. 100 voltta 1 saat süre ile transfer işleminin ardından membranlar PBS ile yıkanmış ve %5 yağsız süt tozunun PBS solüsyonunda bloklanmışlardır. Bunu takiben PBS ile yıkama işlemlerinin ardından membranlar bir gece anti-kalnekisin antikoru ile +4°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Ertesi gün, antikor toplanarak, membranlar PBS-tween çözeltisi ile yıkandıktan sonra, sekonder anti-taşıyan antikoru ile 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresinin ardından PBS-tween ile yıkama işlemleri gerçekleştirilmiş ve en son olarak membranlar kemilüminesans ECL ajanı kullanılarak Bio-Rad görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Strip edilen membranlar, primer beta aktin antikoru ile de inkübe edilmiş ve hesaplamalar, hedef proteinin bant sinyal yoğunluğunun housekeeping beta aktin proteinine bölünmesiyle elde edilen değerle gerçekleştirilmiştir. Duyarlı hücrelerin kalnekisin protein düzeyi 1 olarak ifade edilmiş, diğer gruptaki değişiklik duyarlı hücreye göre kat değişimi olarak ifade edilmiştir.

Sonuçlar

İmatinib ve Nilotinib'in K562s ve K562r hücrelerinde canlılık üzerine etkileri

K562s ve İmatinib'e direnç geliştirmiş K562r hücrelerinin 48 saat boyunca İmatinib ve Nilotinib'e maruziyeti sonucunda hücreler toplanarak MTT testi yapılmıştır, deneyler sonucunda elde edilen verilerle hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Şekil 1).

İmatinib ve Nilotinib'in K562s ve K562r hücrelerinde ve apoptoz üzerine etkileri

K562s ve İmatinib'e direnç geliştirmiş K562r hücrelerinin 48 saat boyunca

İmatinib ve Nilotinib'e maruziyeti sonucunda hücreler toplanarak Annexin V-PE ve 7-AAD ile boyanmışlardır, deneyler sonucunda elde edilen verilerle hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı ve hücrelerin anlamlı olarak apoptoza uğradıkları belirlenmiştir (Şekil 2). Hücrelere uygulanan ilaç dozları, daha önce laboratuvarımızda her iki hücre serisi için de apoptotik etkisi doğrulanmış ve optimize edilmiş dozlardır. İmatinib, duyarlı hücrelerde 0.5 uM, dirençli hücrelerde 20 uM konsantrasyonlarda; Nilotinib, duyarlı hücrelerde 50 nM, dirençli hücrelerde 100 nM konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Dirençli hücreler için, apoptotik hücre ölümünü uyarmak üzere, her iki ilacın dozu da duyarlı hücrelere göre daha yüksek olarak uygulanmıştır.

İmatinib ve Nilotinib uygulanan K562s ve K562r hücrelerinin ışık mikroskopik analizi

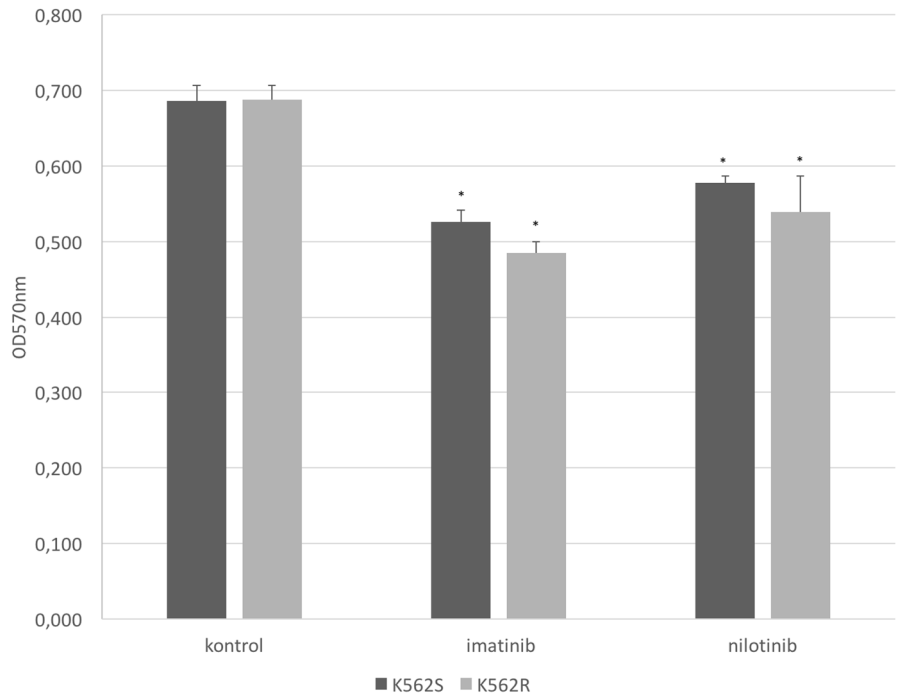
K562s ve İmatinib'e direnç geliştirmiş K562r hücrelerinin 48 saat boyunca İmatinib ve Nilotinib'e maruziyeti sonucunda hücreler ışık mikroskopunda

görüntülenmiştir. İmatinib ve Nilotinib tedavili hücrelerde, hücre sayısındaki azalmanın yanı sıra hücrelerin morfolojik olarak da membran bütünlüğünü kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 3).

İmatinib ve Nilotinib'in total kalnekisin protein ekspresyonu üzerine etkileri

K562s ve İmatinib'e direnç geliştirmiş K562r hücrelerinin 48 saat boyunca İmatinib ve Nilotinib'e maruziyeti sonucunda hücreler toplanarak total hücre ekstraktları hazırlanmış ve total

ekstraktlarda kalnekisin protein düzeyindeki ekspresyonu western blot ile saptanmıştır. Buna göre, K562s ve K562r hücrelerinde kalnekisin proteininin hücrelerdeki total düzeyinin anlamlı olarak fark sergilemediği belirlenmiştir. K562s hücrelerinde İmatinib ve Nilotinib'in apoptotik konsantrasyonlarında, kalnekisin proteinini anlamlı olarak azalttıkları belirlenmiştir. K562r hücrelerinde ilaçların kalnekisin proteinini üzerinde anlamlı etkisi saptanmamıştır (Şekil 4).



Şekil 1: İmatinib ve Nilotinib uygulanan ve uygulanmayan K562s ve K562r hücrelerinde canlılık grafiği. K562S hücreleri 48 saat boyunca 0.5 uM İmatinib ve 20 uM Nilotinib ile; K562R hücreleri 0.05uM İmatinib ve 0.1 uM Nilotinib ile inkübe edilmişlerdir ve MTT testi ile canlılık analiz edilmiştir. İnkübasyon sonunda, her iki hücrede de hücre canlılığının İmatinib ve Nilotinib uygulanması ile anlamlı (*p<0.05) olarak azaldığı belirlenmiştir.

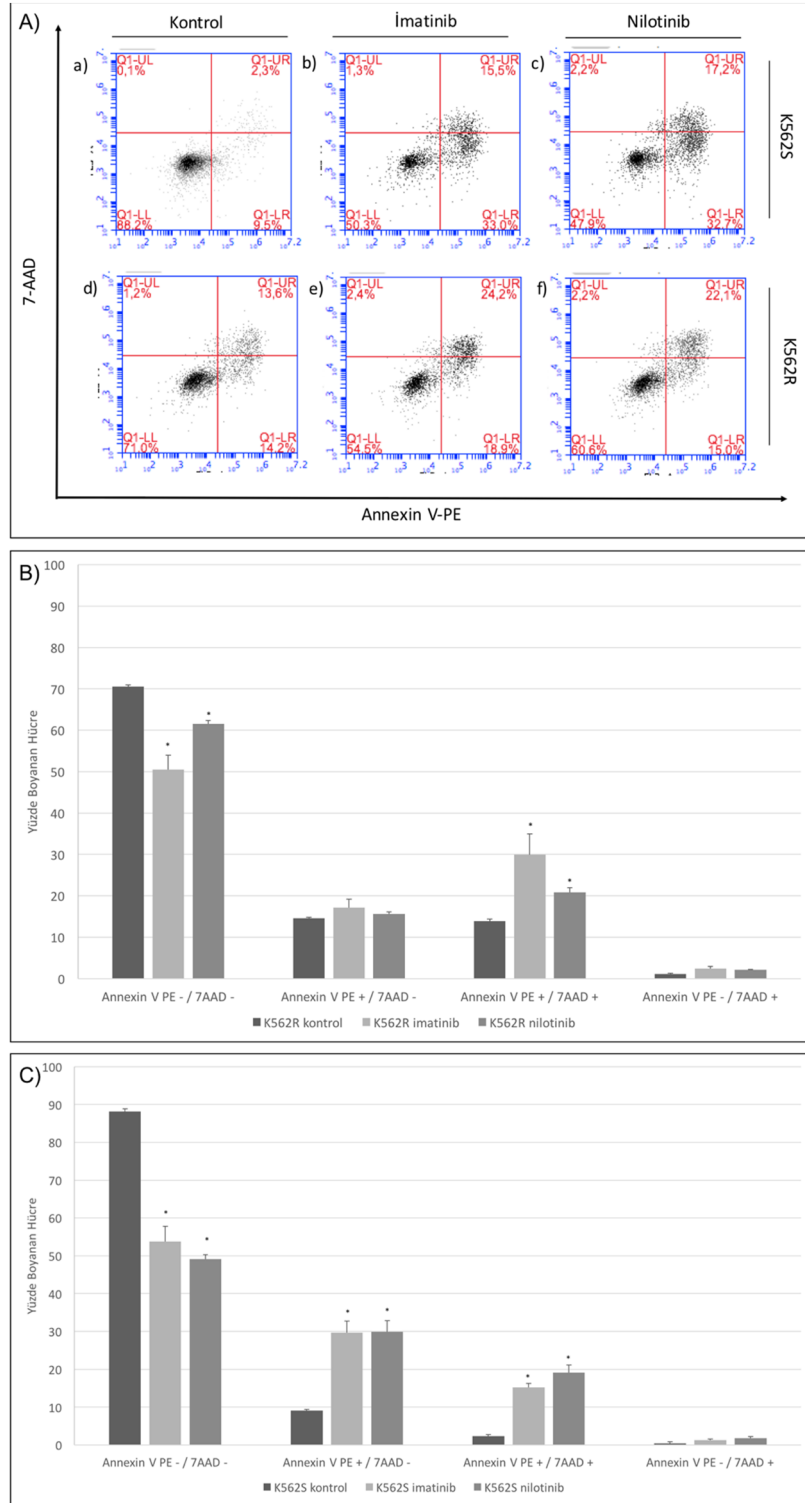
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, one way ANOVA varyans analiz testi ve sonrasında Student-Newman-Keuls post-hoc testi uygulanarak StatistiXL (Broadway-Nedlands, Western Australia) programı ile yapılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tartışma

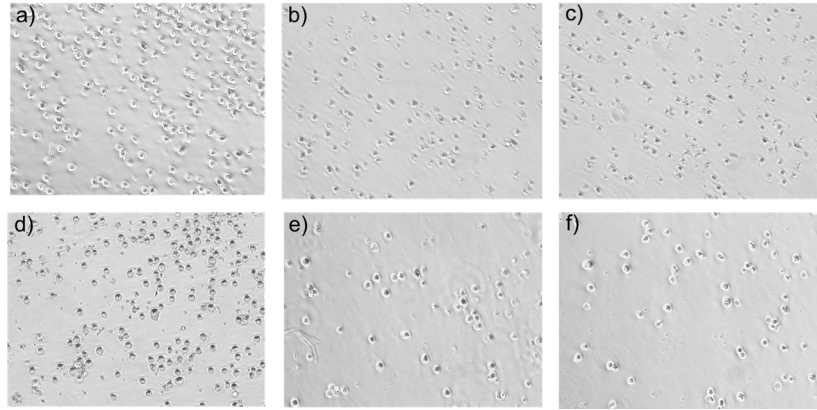
Kemoterapi, hipoksi, besin yetersizliği gibi stresler, katlanmamış protein yanıtını (UPR) aktive eden ER stresini indüklemekte, UPR ise ölüm tetikleyici yolların aktivasyonuna neden olmaktadır (25). UPR'nin, ER strese karşı ortaya çıkan hücresel strese aracılık ettiği ve ER dengesinin tekrar oluşturulmasında görev yaptığı bildirilmiştir. Bunların yanında, UPR'nin, kanser gen ekspresyonunun tekrar şekillenmesine yol açtığı ve böylece hücre transformasyonunu önlediği ya da transforme hücrelere avantaj kazandırdığı da bildirilmiştir (26). İlaça dirençli tümör hücrelerinin ER stresini tetiklediği hücre ölümüne karşı dirençli oldukları (25), ER stresini aşırı indüklenmesinin ve buna bağlı epitelial mezankimal geçişin, akciğer adenokarsinoma hastalarında kemodirençle ilişkili olabileceği (27) yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

ER stresin rolü, kronik myeloid lösemide de araştırılmıştır ve KML hücrelerinde artmış stres yanıtının kanser kök hücrelerinin aracılığıyla kemik iliği nişinde bozulmaya yol açtığı ve bu şekilde KML ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (28). Çalışmamızda İmatinib'e duyarlı ve dirençli K56s ve K562r hücrelerinde, ER strese görev yapan bir şaperon olan kalneksinin protein düzeyindeki ekspresyonu saptanmış ve western blot sonuçlarına göre total hücre lisatlarında kalneksin proteininin duyarlı ve dirençli hücreler arasında anlamlı fark sergilemediği belirlenmiştir. Literatürde, duyarlı L1210

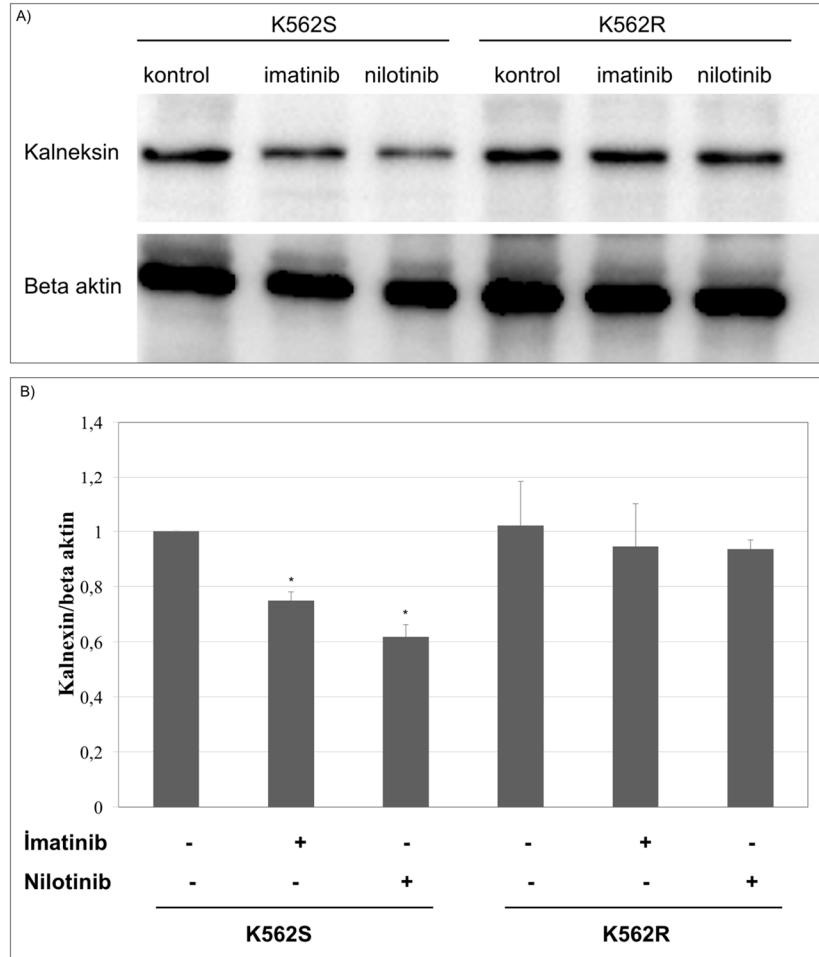


Şekil 2: İmatinib ve Nilotinib'in (48 saat) K562s ve K562r hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkileri. K562S hücreleri 48 saat boyunca 0.5 uM İmatinib ve 20 uM Nilotinib ile; K562R hücreleri 0.05uM İmatinib ve 0.1 uM Nilotinib ile inkübe edilmişlerdir ve Annexin V-PE/7-AAD boyaması ile akım sitometride analiz yapılmıştır. Canlı (Annexin V-PE-/7-AAD-), erken apoptotik (Annexin V-PE+/7-AAD-) ve nekrotik (Annexin V-PE-/7-AAD+) hücrelerin yüzde olarak oranları bar grafik olarak ve simgesel plot grafik olarak verilmiştir. (* $p < 0.05$) ilaç uygulanmayan K562S ve K562R hücreleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı hücre gruplarını ifade etmektedir.

ve aşırı P-gp (p-glikoprotein) ekspresse eden vinkristine (VCR) dirençli L1210 fare lenfositik lösemi hücrelerinde kalneksinin gen ve protein düzeylerindeki ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada, hücreler arasında kalneksinin mRNA düzeyinde fark bulunmadığı, protein düzeyinde ise duyarlı hücrelerde dirençli hücrelere kıyasla kalneksinin özellikle membran ve çözünür hücre fraksiyonlarında daha yüksek düzeyde bulunduğu bildirilmiştir (18). Buna göre, total hücre lizatlarında duyarlı ve dirençli K562 hücreleri arasında anlamlı fark bulunmamasından hareketle, ileri çalışmalarda, kullanmış olunan hücre modelinde farklı hücre fraksiyonlarında kalneksin protein ekspresyonunun saptanması önerilebilir. Ayrıca, İmatinib'e duyarlı ve dirençli K562 hücreleri, İmatinib (0.5 uM ve 20 uM) ve Nilotinib (50 nM ve 100 nM) ile 48 saat tedavi edilmiş ve literatüre paralel olarak (29), İmatinib ve Nilotinib'in, uygulanan dozlarda ilaca duyarlı ve dirençli K562 hücrelerinde apoptotik etkiler sergilediği belirlenmiştir. İmatinib ve Nilotinib'in K562s ve K562r hücrelerinde kalneksin proteini üzerindeki etkileri de değerlendirilmiş ve K562s hücrelerinde hem İmatinib hem de Nilotinib'in kalneksin protein ekspresyonu düzeyinde anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. K562r hücrelerinde ise kalneksin protein düzeyi İmatinib ve Nilotinib tedavisinden anlamlı olarak etkilenmemiştir. Literatürde, anti-kanser ilaçların kanser hücrelerinde apoptoz yolları üzerindeki etkilerinin kalneksin üzerinden araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmadan birinde, ER'de adaptif UPR yanıtını indükleyerek apoptotik etkiler sergilediği bilinen tunicamycin antibiyotisinin, MCF-7 hücrelerinde uygulanmasının tunicamycin ile apoptoza dirençli bir hücre profiline yol açtığı belirlenmiştir. Apoptoza direnç gösteren bu hücrelerde, tunicamycin'in kalneksin protein ekspresyonunu arttırdığı ve kalneksin siRNA'sının uygulanmasının hücre apoptozunu indüklediği bildirilmiştir (30). Bu çalışmada,



Şekil 3: İmatinib ve Nilotinib'in (48 saat) K562s ve K562r hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkileri. K562S hücreleri 48 saat boyunca 0.5 uM İmatinib ve 20 uM Nilotinib ile; K562R hücreleri 0.05uM İmatinib ve 0.1 uM Nilotinib ile inkübe edilmişlerdir. Işık mikroskobu altında görüntülendiklerinde hücre sayısındaki azalmanın yanı sıra, hücrelerin büzüştükleri ve normal sağlıklı hücre morfolojisinden farklı morfolojide oldukları gözlenmiştir.



Şekil 4: İmatinib ve Nilotinib uygulanan ve uygulanmayan K562s ve K562r hücrelerinde canlılık grafiği. K562S hücreleri 48 saat boyunca 0.5 uM İmatinib ve 20 uM Nilotinib ile; K562R hücreleri 0.05uM İmatinib ve 0.1 uM Nilotinib ile inkübe edilmişlerdir ve inkübasyon sonunda total hücre ekstraktları izole edilerek western blot ile kalneksin saptanmıştır. K562S ve K562R hücreleri arasında kalneksin protein ekspresyonu farklılık sergilemezken, İmatinib ve Nilotinib'in K562S hücrelerinde kalneksin ekspresyonunu anlamlı (*p<0.05) olarak azalttığı, K562R hücrelerinde ise bu ilaçların kalneksin düzeyini hafif olarak azalttığı ancak bu etkinin istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur

ilaç dirençli K562 hücrelerinde İmatinib ve Nilotinib'in kalneksin üzerinde etkisiz kalmalarının ardında, dirençli ve duyarlı hücrelerdeki ER stres yolaklarının farklı aktivasyon durumları yatıyor olabilir. Ayrıca, Seles ve ark.'nın 2010 yılında, duyarlı fare lösemi L1210, ve biri seleksiyon yoluyla vinkristine direnç geliştirmiş, diğeri ise stabil transfeksiyon ile direnç geliştirilmiş her ikisi de p-gp'i aşırı ekspresse eden L1210 fare lösemi hücre serilerinde Thapsigargin'in, 0.1 uM dozda kalneksin düzeyini değiştirmezken, 10 uM

dozda her üç hücre serisinde de kalneksin düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir (19). Bu noktadan hareketle, İmatinib dirençli K562 hücrelerinde her iki ilacın da daha yüksek dozları test edilebilir. Ancak, bu çalışmada esasen İmatinib ve Nilotinib, duyarlı hücrelerde uygulanan dozlara kıyasla çok daha yüksek dozda uygulanmıştır ve bu dozların apoptotik dozlar oldukları da gösterilmiştir. Ayrıca, literatürde kalneksinin, dirençli hücrelerde olgun olmayan p-gp ile ilişkili olabileceği de bildirilmiştir (18). Tüm bu bilgiler ve

bu çalışmada elde edilen veriler ışığında, ileri çalışmalarda K562 hücrelerinde kalneksinin farklı hücre kompartmanlarındaki düzeylerinin belirlenmesinin yanı sıra kalneksinin dirençli K562 hücrelerinde p-gp ile olan interaksyonunun aydınlatılması da anlamlı olabilir. KML tedavisinde kullanılan İmatinib ve Nilotinib'in etkilerine kalneksin sinyal yolağı da aracılık ediyor olabilir ve bu ilaçların etki mekanizmasında kalneksinin rolünün aydınlatılması, ilaç direncinin gelişimi ile ilgili mekanizmalardan bir yenisine temel oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- 1) Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5:a013201.
- 2) Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73: 79-94.
- 3) Hamdan N, Kritsiligkou P, Grant CM. ER stress causes widespread protein aggregation and prion formation. *J Cell Biol.* 2017; 216: 2295-2304.
- 4) Alasiri G, Fan LY, Zona S, et al. ER stress and cancer: The FOXO forkhead transcription factor link. *Mol Cell Endocrinol.* 2018; 462(Pt B):67-81.
- 5) Gifford JB, Hill R. GRP78 Influences Chemoresistance and Prognosis in Cancer. *Curr Drug Targets.* 2017. doi: 10.2174/1389450118666170615100918.
- 6) Phelps EA, Cianciaruso C, Michael IP, et al. Aberrant Accumulation of the Diabetes Autoantigen GAD65 in Golgi Membranes in Conditions of ER Stress and Autoimmunity. *Diabetes.* 2016; 65: 2686-99.
- 7) Erpapazoglou Z, Mouton-Liger F, Corti O. From dysfunctional endoplasmic reticulum-mitochondria coupling to neurodegeneration. *Neurochem Int.* 2017; 109:171-183.
- 8) Garfinkel BP, Hotamisligil GS. ER Stress Promotes Inflammation through Rewired Macrophages in Obesity. *Mol Cell.* 2017; 66:731-733.
- 9) Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007; 87:1377-408.
- 10) Schrag JD, Bergeron JJ, Li Y, et al. The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell.* 2001;3: 633-44.
- 11) Xie W, Nielsen ME, Pedersen C, et al. A Split-GFP Gateway Cloning System for Topology Analyses of Membrane Proteins in Plants. *PLoS One.* 2017; 13:e0170118.
- 12) Y. Shibata, T. Shemesh, W.A. Prinz, et al. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER Cell, 2010; 143:774-788.
- 13) N. Myhill, E.M. Lynes, J.A. Nanji, et al. The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2 *Mol. Biol. Cell,* 2008; 19: 2777-2788.
- 14) Ryan D, Carberry S, Murphy ÁC, et al. Calnexin, an ER-induced protein, is a prognostic marker and potential therapeutic target in colorectal cancer. *J Transl Med.* 2016 ;14:196.
- 15) Uyy E, Suica VI, Boteanu RM, et al. Endoplasmic Reticulum Chaperones Are Potential Active Factors in Thyroid Tumorigenesis. *J Proteome Res.* 2016; 15:3377-87.
- 16) Kobayashi M, Nagashio R, Jiang SX, et al. Calnexin is a novel sero-diagnostic marker for lung cancer. *Lung Cancer.* 2015; 90:342-5.
- 17) Pavli M, Farmaki E, Merkourea S, et al. Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Chaperones, Bip/GRP78 and Calnexin are Overexpressed in Keratocystic Odontogenic Tumours. *J Oral Maxillofac Res.* 2014; 5:e3
- 18) Seres M, Poláková E, Krizanová O, et al. Overexpression of P-glycoprotein in L1210/VCR cells is associated with changes in several endoplasmic reticulum proteins that may be partially responsible for the lack of thapsigargin sensitivity. *Gen Physiol Biophys.* 2008; 27:211-21.
- 19) Sereš M, Ditte P, Breier A, et al. Effect of thapsigargin on P-glycoprotein-negative and P-glycoprotein-positive L1210 mouse leukaemia cells. *Gen Physiol Biophys.* 2010; 29:396-401.
- 20) Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 17: 1330-40.
- 21) Frame D Chronic myeloid leukemia: standard treatment options. *Am J Health Syst Pharm.* 2006; 8:21-22.
- 22) Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. *Biologics.* 2007; 4: 433-48.
- 23) Xia Y, Fang H, Zhang J, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in imatinib-resistant leukemic K562-r cells triggered by AMN107 combined with arsenic trioxide. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013; 238: 932-42.

- 24) Kusio-Kobialka M, Podszywalow-Bartnicka P, Peidis P, et al. The PERK-eIF2 α phosphorylation arm is a pro-survival pathway of BCR-ABL signaling and confers resistance to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Cycle*. 2012; 21: 4069-78.
- 25) Salaroglio IC, Panada E, Moiso E, et al. PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy.
- 26) Chevet E, Hetz C, Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov*. 2015;5: 586-97.
- 27) Shah PP, Dupre TV, Siskind LJ, et al. Common cytotoxic chemotherapeutics induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. *Oncotarget*. 2017;14: 22625-22639.
- 28) Podszywalow-Bartnicka P, Cmoch A, Wolczyk M, et al. Increased phosphorylation of eIF2 α in chronic myeloid leukemia cells stimulates secretion of matrix modifying enzymes. *Oncotarget*. 2016; 48:79706-79721.
- 29) Ekiz HA, Can G, Gunduz U, et al. Nilotinib significantly induces apoptosis in imatinib-resistant K562 cells with wild-type BCR-ABL, as effectively as in parental sensitive counterparts. *Hematology*. 2010; 15:33-8.
- 30) Delom F, Emadali A, Cocolakis E, et al. Calnexin-dependent regulation of tunicamycin-induced apoptosis in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ*. 2007; 3:586-96.

