ÖZGÜN ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg ▶ 2019:26(1):57-66 doi: 10.17343/sdutfd.469847

EPİGALLOKATEŞİN-3- GALLAT UYGULAMASINA BAĞLI OLARAK KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRELERİNDE GENETİK VE EPİGENETİK OTOFAJİ REGÜLATÖRLERİNİN EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF EXPRESSION CHANGES OF GENETIC AND EPIGENETIC AUTOPHAGY REGULATORS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA CELLS DUE TO EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE TREATMENT

Çığır BİRAY AVCI, Bakiye GÖKER BAĞCA
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İZMİR

Cite this article as: Biray Avcı Ç, Göker Bağca B. Evaluation of expression changes of genetic and epigenetic autophagy regulators in chronic myeloid leukemia cells due to epigallocatechin-3-gallate treatment. Med J SDU 2019; 26(1): 57-66.

Öz

Amaç
Kronik miyeloid lösemi, Bcr-Abl1 füzyon tirozin kinazının oluşumu ve aktivitesi ile tanımlanır. Füzyon proteinini hedefleyen inhibitörün keşfi sağ kalım oranlarında büyük artış meydana getirmiştir. Ancak bu inhibitöre karşı direnç gelişimi yeni terapi hedeflerinin belirlenmesini zorunlu kılmaktadır. Otofaji, güncel kanser araştırmalarında dikkat çekici bir iki yönlü hedeftir. Kanser hücrelerini stres koşullarına adapte etmeyi sağladığı için genellikle otofajinin inhibisyou hedeflenmektedir. Epigallokateşin-3-gallat yeşil çayda bulunan temel bir fitokimyasaldır. mikroRNA'lar gibi epigenetik regülatörlerin üzerindeki etkinliği nedeniyle tedavide olduğu kadar hastaların beslenme önerilerinin düzenlenmesinde de önem taşımaktadır. Bu çalışmada bir flavanoid olan epigallokateşin-3-gallatın kronik miyeloid lösemi hücrelerinde otofajiyi düzenleyen genetik ve epigenetik faktörler üzerindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem
mikroRNA-mRNA etkileşimini değerlendiren veritabanları kullanılarak otofaji ilişkili genleri hedefleyen mikroRNA'lar belirlenmiştir. 50 µikromolar Epigallokateşin-3-gallat uygulanan K-562 hücrelerinde gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemi kullanılarak otofaji ilişkili genlerin ve bu genleri hedefleyen mikroRNA'ların ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Bulgular
Epigallokateşin-3-gallat uygulaması K-562 hücrelerinde otofajinin pozitif regülatörü olan genlerin ekspresyon seviyesinde anlamlı azalışa, bu genleri hedefleyen mikroRNA'ların ekspresyon seviyelerinde ise anlamlı artışa neden olmuştur.

Sonuç
Elde edilen veriler doğrultusunda epigallokateşin-3-gallatın, kronik miyeloid lösemi hücrelerinde genetik ve epigenetik regülasyonla otofaji inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Otofajinin çift yönlü mekanizması göz önünde bulundurulduğunda bu sonuç epigallokateşin-3-gallatın ilaç potansiyeli olma konusunda olduğu kadar hastaların beslenme şeklinde de önem taşıyan bir kimyasal olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kronik Miyeloid Lösemi, miRNA, Otofaji

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: cbavci@gmail.com
Müracaat tarihi/Application Date: 12.10.2018• Kabul tarihi/Accepted Date: 06.11.2018
©Copyright 2018 by Med J SDU - Available online at http://dergipark.gov.tr/sdutfd
©Telif Hakkı 2018 SDÜ Tıp Fak Derg - Makaleye http://dergipark.gov.tr/sdutfd web sayfasından ulaşılabilir.

Abstract

Objective
Chronic myeloid leukemia is characterized by the formation and activation of Bcr-Abl1 fusion tyrosine kinase. Discovery of the inhibitor which targets the fusion protein results in a significant increase in survival rates. However the development of resistance to the inhibitor necessitates determining new therapy targets. Autophagy is a remarkable dual target in recent cancer researches. It is usually aimed at inhibition of autophagy because autophagy allows cells to adapt to stress conditions. Epigallocatechin-3-gallate is a basic phytochemical found in green tea. The efficacy of epigenetic regulators, such as microRNAs, is important in the regulation of dietary recommendations as well as in treatment. In this study, it was aimed to investigate the effect of epigallocatechin-3-gallate, a flavanoid, on genetic and epigenetic factors regulating autophagy in chronic myeloid leukemia cells.

Materials and Methods
microRNAs which are target autophagy-related genes have been identified using appropriate databases. Expression levels of autophagy-related genes and microRNAs targeting these genes were determined using real-time quantitative PCR method in 50 micromolar Epigallocatechin-3-gallate treated K-562 cells.

Results
Epigallocatechin-3-gallate treatment resulted in a significant decrease and increase the expression levels of autophagy-related genes and microRNAs targeting these genes in K-562 cells, respectively.

Conclusion
In the direction of the results, epigallocatechin-3-gallate was found to cause autophagy inhibition by genetic and epigenetic regulation in chronic myeloid leukemia cells. Considering the dual mechanism of autophagy, this result suggests that epigallocatechin-3-gallate is a chemical that is important for the nutrition of patients as well as its potential to be used as a drug.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, miRNA, Autophagy

Giriş

Kronik miyeloid lösemi (KML) t(9;22) translokasyonu sonucu oluşan Philadelphia kromozomu ile karakterize lösemi tipidir. Resiprokal t(9;22) translokasyonu sonucu 9q34.12'de bulunan ABL1 protoonkogeni ile 22q11.23'e lokalize BCR geninin füzyonu sonucu Bcr-Abl1 füzyon tirozin kinaz proteini kodlanmaktadır. Bu tirozin kinazın otofosforilasyonla anormal şekilde aktivasyonu, hücre döngüsünü ve canlılığını düzenleyen çok sayıda aşağı-akış ("downstream") yolağı aktive ederek KML fenotipine neden olmaktadır. 2001 yılında bu füzyon proteininin ATP bağlanan bölgesini hedefleyen birinci nesil tirozin kinaz inhibitörü (TKI) imatinibin kullanılmaya başlaması ile birlikte yaklaşık 5-7 yıl olan sağ kalım oranlarında ve hastaların hayat kalitesinde belirgin bir yükseliş meydana gelmiştir. Bununla birlikte zamanla TKI'ye karşı direnç meydana gelmesi yeni nesil TKI'lerinin geliştirilmesine ve aşağı-akış yolakları inhibe etme potansiyeli olan ürünlerin araştırılmasına yönelmiştir [1].

Hematolojik neoplazmları da içeren kanser tedavilerinin genel yaklaşımları arasında, anormal şekilde çoğalan hücrelerin seçici olarak ölüme yönlendirilmesi ilk sırada yer almaktadır. En iyi bilinen ve kanser araştırmalarında kendine en sık yer bulan programlı hücre ölüm tipleri apoptoz, nekroptoz ve otofajidir [2]. Otofaji hücreyi ya da organizmayı besin kıtlığı, büyüme faktörlerinin yoksunluğu, hipoksi ya da hatalı veya işlevini kaybetmiş hücre içi materyaller gibi çeşitli stres koşullarına karşı koruyan, tek hücreli ökaryotlardan itibaren korunmuş katabolik bir süreçtir. Degrade edilecek olan materyalin içine alındığı otofagozomların lizozom ile füzyonu sonucu hücreye hem hammadde ve enerji temin edilir hem de hücre olası bir tehlikeden korunmuş olur. Bununla birlikte otofaji aynı zamanda tip II hücre ölümü olarak da işlev görmektedir. Özellikle kanserde bozulan apoptoz mekanizması otofajik hücre ölümünü daha cazip bir hedef haline getirmektedir. Otofajinin dual doğası nedeniyle pek çok hastalıkta olduğu gibi kanser araştırmalarında da otofajinin rolü hakkındaki tartışmalar sürmektedir [3].

Epigallokateşin-3- gallat (EGCG) yeşil çayda bulunan polifenoldür. Antioksidan etkisi üzerine yapılan çok sayıda çalışmanın yanı sıra son yıllarda antikanser etkinliği de vurgulanmaktadır. Çeşitli kanser tiplerinde apoptotik, antineoplastik, antimetastatik özellik gösterdiği belirlenmiş ve bu özellikleri düzenleyen genetik ve epigenetik mekanizmalar aydınlatılmaya başlamıştır [4].

MikroRNA'lar (miRNA) 18-22 nükleotit uzunluğunda protein kodlamayan (non-coding) kısa RNA'lardır. Protein kodlayan genlere ait transkriptlerin genellikle 3' UTR bölgeleri ile eşleşme gerçekleştirerek hedef genin susturulmasını sağlamaktadırlar. Protoonkogen- tümör

süpresör dengesinin sağlanmasında miRNA'lar son yıllarda önemli genetik araçlar olarak görülmekte ve özellikle hedefli kanser tedavilerinin geliştirilmesi konusunda yapılan çalışmalar artmaktadır [5].

Bu çalışmada, daha önce KML hücrelerinde apoptotik etkinliği ekibimiz tarafından gösterilen EGCG'nin (IC_{50}:50µM); otofaji ilişkili genlerin ve bu genlerin regülasyonunda rol alması muhtemel miRNA'ların ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkinliğini belirlemek temel amaçtır [6]. Bu amaçla, otofaji ilişkili genleri hedefleyen miRNA'ları uygun veritabanları aracılığıyla belirleyerek, gerçek zamanlı kantitatif PCR aracılığı ile hem genlerin hem de miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimleri belirlendi. EGCG'nin KML hücrelerinde otofajinin temel regülatörü olan genlerin ekspresyon seviyelerinde belirgin azalmaya neden olduğunu saptandı. Bu regülasyonun ise bu genleri hedefleyen miRNA seviyelerindeki artışla uyumlu olması nedeniyle, EGCG'nin KML hücrelerinde hem genetik hem de epigenetik bir otofaji inhibitörü olma potansiyeli taşıdığını önermekteyiz.

Gereç ve Yöntem

miRNA-mRNA Etkileşimlerinin Belirlenmesi
Otofaji ilişkili mRNA'ları hedefleyen tahmini miRNA'lar TargetScanHuman 7.2 veritabanı kullanılarak belirlenmiştir. Bu veri tabanı hedef genlerin 3'UTR bölgeleri ile olgun miRNA'ların çekirdek dizilerinin eşleşme lokasyonlarını ve eşleşen dizi uzunluklarını göstermektedir. Çekirdek dizi eşleşmesine ek olarak miRNA'nın 3'UTR bölgesinin hedefle eşleşmesi, hedef transkriptin eşleşme bölgesinin yakınındaki AU içeriği, 3' UTR'den minimum uzaklık gibi 14 farklı parametreyi değerlendirerek olası eşleşmeleri sunmaktadır. TargetScanHuman 7.2 veri tabanı kullanılarak belirlenen potansiyel miRNA'lardan miRTarBase ve miRanda veri tabanları ve/veya güncel literatür verileri ile desteklenen miRNA'lar ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla seçilmiştir.

Hücre Kültürü ve Etken Maddenin Hazırlanması
K-562 (ATCC, ABD) hücreleri; %10 FBS (BioInd, İsrail), %1 L-Glutamin (BioInd, İsrail), %1 Penisilin-Streptomisin (BioInd, İsrail) içeren RPMI-1640 besiyeri (BioInd, İsrail) ile 37°C sıcaklık %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmiş, deney için uygun hücre sayısına ulaşılana kadar hücrelerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin canlılığının kontrolü Tripan Mavisi Solüsyonu (BioInd, İsrail) kullanılarak denetlenmiştir. EGCG (Sigma Aldrich, ABD) etken maddesi ddH_2O içinde çözülerek 0.5M'lık stok solüsyon hazırlanmıştır. K-562 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 10^6 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin ekilmesinin ardından final konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde EGCG etken maddesi hücrelere eklenmiştir. Etken madde içeren hücreler ve etken madde içermeyen kontrol hücreleri 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Tüm çalışma basamakları üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.
Gen ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi

Hücrelerden total RNA ve miRNA izolasyonu sırasıyla RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) ve miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA ve miRNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sırasıyla RT2 First Strand Kit (Qiagen, Almanya) ve miScript II RT Kit (Qiagen) kullanılarak sentezlenmiştir. Otofaji ilişkili PRKAA1, AKT1, MTOR, ULK1, VPS34, BECN1, UVRAG, AMBRA1, ATG9A, ATG9B, ATG5, ATG12, ATG16L1, ATG16L2, GABARAP, GABARAPL1, ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D ve ATG7 genlerinin ve bu genleri hedefleme olasılığı bulunan miRNA'ların ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi için seçilen primerleri içeren tasarım plakalar (Qiagen, Almanya) ve LightCycler 480 (Roche, İsviçre) gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazı kullanılmıştır. mRNA ve miRNA eskpresyonlarının belirlenmesi için sırasıyla RT2 SYBR Green qPCR (Qiagen, Almanya) ve miScript SYBR Green (Qiagen, Almanya) mastermiksleri kullanım kılavuzunda belirtilen uygun sıcaklık döngülerinde uygulanmıştır. Kontrole göre gen ekspresyon değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılığın belirlenebilmesi için her biri üçer tekrardan oluşan kontrol-doz karşılaştırmasına Student's t-test uygulanmış, p değeri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

Otofaji ilişkili transkriptler miRNA'lar tarafından hedeflenmektedir

Otofaji ilişkili seçilen transkriptleri düzenleme potansiyeli TargetScanHuman 7.2 veritabanı kullanılarak belirlenen ve miRTarBase ve miRanda veritabanları ve/veya güncel literatür verileri ile valide edilen miRNA'lar Tablo 1'de gösterilmiştir.

K-562 hücrelerinde EGCG uygulaması sonucunda otofajinin temel indükleyicisi olan genlerin büyük çoğunluğunda anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Kat değişimi >+2.00, p<0.05) (Bkz: Tablo 2).

K-562 hücrelerinde EGCG uygulaması sonucunda otofajinin temel indükleyicisi olan genleri hedefleyerek baskılayan miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış belirlenmiştir (Kat değişimi >+2.00, p<0.05) (Bkz: Tablo 3).

Tablo 1 Otofaji ilişkili transkriptleri hedefleyen miRNA'lar ve verilerin elde edildiği kaynaklar

Gen	miRNA	Targetscan	miRTarBase	miRanda	Literatür
PRKAA1	hsa-miR-130a-3p	x	x	x	
PRKAA1	hsa-miR-152-3p	x		x	
PRKAA1	hsa-miR-15a-5p	x	x	x	
PRKAA1	hsa-miR-424-5p	x	x	x	
PRKAA1	hsa-miR-497-5p	x	x	x	
PRKAA1	hsa-miR-607	x	x	x	
AKT1	hsa-miR-155-5p	x	x	x	
AKT1	hsa-miR-495-3p	x	x		Mao ve ark. [7]
MTOR	hsa-miR-128-3p	x	x	x	Chen ve ark. [8]
MTOR	hsa-miR-485-5p	x		x	Mou ve ark. [9]
MTOR	hsa-miR-96-5p	x			Ma ve ark. [10]
ULK1	hsa-miR-181a-5p	x		x	
ULK1	hsa-miR-181b-5p	x	x	x	
ULK1	hsa-miR-181c-5p	x	x	x	
ULK1	hsa-miR-181d-5p	x	x	x	
ULK1	hsa-miR-489-3p	x			Soni ve ark. [11]
PIK3C3	hsa-miR-129-5p	x	x		
PIK3C3	hsa-miR-98-5p	x	x	x	
BECN1	hsa-miR-129-5p	x	x		Chen X ve ark. [12]
BECN1	hsa-miR-199a-5p	x	x	x	
UVRAG	hsa-miR-125b-5p	x			Cao ve ark. [13]
UVRAG	hsa-miR-205-5p	x	x	x	
AMBRA1	hsa-miR-199b-3p	x		x	
AMBRA1	hsa-miR-485-5p	x	x		
AMBRA1	hsa-miR-7-5p	x			Capizzi ve ark. [14]
ATG9A	hsa-let-7a-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-let-7b-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-let-7c-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-let-7d-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-let-7e-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-let-7f-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-let-7g-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-let-7i-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-miR-15a-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-miR-199a-5p	x		x	
ATG9A	hsa-miR-202-3p	x	x	x	
ATG9A	hsa-miR-29a-3p	x	x		
ATG9A	hsa-miR-424-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-miR-497-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-miR-7-5p	x	x	x	
ATG9A	hsa-miR-98-5p	x	x		

Tablo 1 Devamı Otofaji ilişkili transkriptleri hedefleyen miRNA'lar ve verilerin elde edildiği kaynaklar

Gen	miRNA	Targetscan	miRTarBase	miRanda	Literatür
ATG5	hsa-miR-181a-5p	x	x	x	Yang ve ark. [15]
ATG5	hsa-miR-181b-5p	x			Wang ve ark. [16]
ATG12	hsa-let-7a-5p	x	x	x	
ATG12	hsa-let-7b-5p	x	x	x	Ham ve ark. [17]
ATG12	hsa-let-7c-5p	x	x	x	
ATG12	hsa-let-7d-5p	x	x	x	
ATG12	hsa-let-7e-5p	x	x	x	
ATG12	hsa-let-7f-5p	x	x	x	
ATG12	hsa-let-7g-5p	x	x	x	
ATG12	hsa-let-7i-5p	x	x	x	Zhang ve ark. [18]
ATG12	hsa-miR-107	x	x	x	
ATG12	hsa-miR-181b-5p	x			Wang ve ark. [16]
ATG12	hsa-miR-200b-3p	x	x		Pan ve ark. [19]
ATG12	hsa-miR-98-5p	x	x	x	
ATG16L1	hsa-let-7a-5p	x			Liguori ve ark. [20]
ATG16L1	hsa-let-7b-5p	x			Liguori ve ark. [20]
ATG16L1	hsa-miR-181a-5p	x			Liguori ve ark. [20]
ATG16L1	hsa-miR-181d-5p	x		x	
ATG16L1	hsa-miR-182-5p	x			Liguori ve ark. [20]
ATG16L1	hsa-miR-29a-3p	x			Xu ve ark. [21]
ATG16L1	hsa-miR-96-5p	x			Gan ve ark. [22]
GABARAP	hsa-miR-214-3p	x	x	x	Li ve ark. [23]
GABARAPL1	hsa-miR-155-5p	x	x	x	
GABARAPL1	hsa-miR-15a-5p	x	x	x	
GABARAPL1	hsa-miR-424-5p	x	x	x	
GABARAPL1	hsa-miR-497-5p	x	x	x	
ATG3	hsa-miR-155-5p	x	x	x	Etna ve ark. [24]
ATG4B	hsa-let-7b-5p	x	x	x	
ATG4B	hsa-miR-140-5p	x		x	
ATG4B	hsa-miR-214-3p	x		x	
ATG7	hsa-miR-181b-5p	x			Wang ve ark. [25]
ATG7	hsa-miR-210-3p	x	x		Wang ve ark. [25]
ATG7	hsa-miR-96-5p	x	x	x	Gan ve ark. [22]

EGCG K-562 hücrelerinde otofaji ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirir.

Tablo 2 EGCG uygulanan K-562 hücrelerinde otofaji ilişkili genlerin ifade seviyelerinin kontrole göre kat değişimi ($p<0.05$)

Gen Sembolü	Kontrole Göre Kat Değişimi	p Değeri
PRKAA1 (AMPK)	-3.92	0
AKT1	-2.42	0.000006
MTOR	-1.11	0.002538
ULK1	-2.18	0.000074
VPS34 (PIK3C3)	-3.46	0.000005
BECN1	-3.28	0.000001
UVRAG	-2.43	0.000009
AMBRA1	-3.76	0.000002
ATG9A	-3.95	0.000002
ATG9B	-2.52	0.000059
ATG5	-2.13	0.000002
ATG12	-3.76	0
ATG16L1	-2.22	0.000009
ATG16L2	-2.93	0.000007
GABARAP	-15.26	0
GABARAPL1	-2.43	0.000023
ATG3	-3.23	0
ATG4A	-3.49	0.000001
ATG4B	-9.73	0.000001
ATG4C	-13.95	0
ATG4D	-2.52	0.000002
ATG7	-10.94	0.000001

EGCG K-562 hücrelerinde otofaji regülatörü miRNA'ların ekspresyon seviyelerini düzenler

Tartışma

Dual rolü ile otofaji, hücreyi hem hayatta tutan hem de ölüme yönlendiren kritik bir süreç olduğundan kanser tedavi hedefi olarak bu iki süreçten hangisinin potansiyel taşıdığı güncelliğini koruyan bir tartışma konusudur [26]. Bu tartışma KML'yi içeren hematolojik malignitelerde de sürmektedir. Otofaji indüksüyonunun tip II hücre ölümü aracılığıyla veya Bcr-Abl1 onkoproteininin degredasyonu ile lösemi tedavisinde kendine yer bulacağını öngören çalışmalar bulunmaktadır [27, 28]. Bu çalışmalarla çelişkili bir şekilde özellikle enerji kısıtlamasına bağlı olarak KML kök hücrelerinin oluşumu, dormansi ve ilaç direnci gibi konularda otofaji indüksüyonunun rol oynadığını gösteren çalışmalar da artmaktadır [29, 30]. Bu çalışmaların artışı da otofaji inhibisyonunun KML tedavisi için potansiyel bir strateji olarak görülmesini sağlamaktadır [31].

Yeşil çayda bulunan temel flavanoid olan EGCG'nin KML hücrelerinde hücre döngüsü genlerini etkilediği ve ayrıca KML hücrelerini apoptoza yönlendirdiği daha önceki çalışmamızda raporlanmıştır [6]. Bu iki yolak birbiriyle kimi zaman aynı yönlü kimi zaman ise zıt yönlü olacak şekilde sürekli etkileşim halindedir ve apoptoz ilişkili CASP3, CASP8, BAX, BAD, BCL-2 gibi kritik regülatör genler aynı zamanda otofaji basamaklarının da iki yönlü düzenlenmesinde görev almaktadır [32]. EGCG'nin farklı hücre tiplerinde apoptotik ve otofajik hücre ölümünü birlikte indüklediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [33, 34]. Bununla birlikte EGCG uygulamasına bağlı olarak indüklenen otofajinin hücre sağ kalımını destekleyerek apoptozu baskıladığı da pek çok çalışmada raporlanmıştır [35, 36]. Farklı kanser tiplerinde çalışılmış olmakla birlikte; EGCG'nin KML hücreleri üzerindeki otofajik etkinliği henüz belirlenmemiştir. EGCG gibi fitokimyasallar kanser çalışmalarında, genetik etkilerinin olduğu kadar beslenme gibi çev-

Tablo 3 EGCG uygulanan K-562 hücrelerinde otofaji ilişkili genlerin ifade seviyelerinin kontrole göre kat değişimi ($p<0.05$)

Gen Sembolü	Kontrole Göre Kat Değişimi	p Değeri
hsa-let-7a-5p	4.25	0
hsa-let-7b-5p	10.60	0
hsa-let-7c-5p	7.93	0
hsa-let-7d-5p	9.40	0
hsa-let-7e-5p	4.40	0
hsa-let-7f-5p	4.68	0
hsa-let-7g-5p	6.36	0
hsa-let-7i-5p	8.49	0
hsa-miR-107	5.32	0
hsa-miR-125b-5p	8.30	0
hsa-miR-128-3p	3.63	0
hsa-miR-129-5p	10.45	0
hsa-miR-130a-3p	10.50	0
hsa-miR-140-5p	4.29	0
hsa-miR-152-3p	6.72	0
hsa-miR-155-5p	16.31	0
hsa-miR-15a-5p	3.30	0
hsa-miR-181a-5p	7.74	0
hsa-miR-181b-5p	8.44	0
hsa-miR-181c-5p	7.83	0
hsa-miR-181d-5p	26.38	0.000201
hsa-miR-182-5p	2.17	0
hsa-miR-199a-5p	12.68	0
hsa-miR-199b-3p	6.26	0
hsa-miR-200b-3p	8.83	0
hsa-miR-202-3p	10.79	0
hsa-miR-205-5p	13.24	0
hsa-miR-210-3p	3.16	0
hsa-miR-214-3p	11.17	0
hsa-miR-29a-3p	2.50	0
hsa-miR-424-5p	8.48	0
hsa-miR-485-5p	14.96	0
hsa-miR-489-3p	7.64	0
hsa-miR-495-3p	9.96	0
hsa-miR-497-5p	7.26	0
hsa-miR-607	16.58	0
hsa-miR-7-5p	2.17	0
hsa-miR-96-5p	2.94	0
hsa-miR-98-5p	9.23	0

resel faktörlerle düzenlenebilen epigenetik regülasyon potansiyellerinin de üstünde durulduğu moleküllerdir [37, 38]. Bu bağlamda çalışmamızda EGCG'nin KML hücrelerindeki otofajik regülasyonu, kritik otofaji regülatörü genler ve bu genlerin epigenetik düzenleyicileri üzerinden değerlendirilmiştir.

Otofaji yolağı temel olarak MTOR'un inhibisyonu ile aktive olmaktadır. Bu süreç çeşitli stres koşullarının varlığına bağlı olarak PRKAA1'in aktivasyonu sonucu AKT1 inhibisyonu ile tetiklenir [39]. EGCG'nin PRKAA1'in ekspresyon seviyesi üzerindeki hem inhibitör hem aktivatör etkisini gösteren yayınlar olmakla birlikte; AKT1/MTOR yolağını inhibe ettiği çeşitli kanser tiplerini içeren çalışmalarda gösterilmiştir [40, 41]. Otofajinin temel regülatörleri ilk kez mayalarda keşfedilen ve tüm ökaryotlarda korunmuş durumda bulunan Atg (autophagy-related protein) proteinleridir. Atg proteinleri diğer proteinlerle kompleksler oluşturarak, fagoforun nükleasyonundan otofagozomların lizozomlarla füzyonu sonucu otofagolizozomların oluşumuna ve hücre içi materyalin seçici olarak bu çift katlı veziküllerde sindirilmesine kadar tüm otofajik akışı yürütmektedir. Bir kaskad haline işlev gören Atg proteinlerinin eksikliği ya da defektleri otofajinin inhibisyonuna sebep olmaktadır [26]. Çalışmamızda EGCG uygulaması sonucunda hem otofaji aktivatörü olan PRKAA1 geninin hem de otofaji inhibitörü AKT1 ve MTOR genlerinin ifade seviyeleri sırasıyla 3.92, 2.42 ve 1.11 kat azalmış ve bu azalışlar belirtilen genleri hedefleyen miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki artışla desteklenmiştir. Bu durum bir çelişki gibi görülebilse de lösemi kök hücrelerinde otofajinin AKT1/MTOR yolağından bağımsız bir şekilde PRKAA1'in doğrudan Atg proteinleri ile etkileşim kurması ile indüklenebildiği raporlanmıştır [42]. Mayalardaki Atg1 geninin memelilerdeki homoloğu ULK1 geninin kodladığı Ulk1 proteini, Fip200, Atg13 ve Atg101 proteinleri ile kompleks oluşturarak PAS'tan (preautophagosomal structure ya da phagophore assembly site) fagoforun nükleasyonunu içeren başlangıç basamağını meydana getirir [43]. Çalışmamızda ULK1 geninin ekspresyon seviyesi EGCG uygulanan hücrelerde, EGCG uygulanmayan kontrol grubu hücrelerine göre 2.18 kat azalmış; ULK1 transkriptini hedefleyen hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-181d-5p ve hsa-miR-489-3p miRNA'larının ekspresyon seviyeleri ise 2 katın üzerinde artış göstermiştir. Nükleasyonun ardından membran trafiğinde rol oynayan Pi3k kompleksi vakuolar hedeflemeyi düzenler. Bu kompleks Vps34 (Pik3c3), Vps15 (Pik3r4), Becn1 (Atg6) ve Becn1'in pozitif düzenleyicisi Uvrag (Vps38) proteinlerinden ve veziküler taşınımda görevli Atg9 proteinlerinden oluşur [44]. Literatürde EGCG ile bu genlerin ifade seviyeleri hakkında detaylı veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda fagofor uzamasını düzenleyen otofajinin pozitif regülatörlerinden VPS34, BECN1, UVRAG, AMBRA ATG9A ve ATG9B genlerinin ifade seviyeleri EGCG uygulanan grupta uygulanmayan gruba göre sırasıyla 3.46, 3.28, 2.43, 3.76, 3.95 ve 2.52 kat azalmıştır. Pi3k kompleksini oluşturan proteinleri kodlayan genleri hedefleyen miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde ise EGCG uygulanan grupta kontrole göre belirgin artış meydana gelmiştir. Kovalent bağlı Atg5-Atg12 konjugatı ve bu yapıya non-kovalent olarak tutunan Atg16 proteinlerinden oluşan kompleks fagoforun uzamasını takiben otofagozom oluşumunun tamamlanmasında ve membrana lipid konjugasyonunda görev almaktadır [45]. EGCG'nin kanser hücrelerinde ATG5'in ekspresyon seviyesini azaltarak otofajiyi inhibe ettiği ve tedavi etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir [46]. Bununla birlikte kanser hücrelerinde bu kompleksin diğer hücrleri üzerindeki EGCG etkinliği henüz tanımlanmamıştır. Çalışmamızda bu komplekse ait ATG5, ATG12, ATG16L1 ve ATG16L2 genlerinin ifade seviyelerinin sırasıyla 2.13, 3.76, 2.22 ve 2.93 azaldığı belirlenmiştir. Bu genleri hedefleyen hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181d-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-96-5p ve hsa-miR-98-5p miRNA'larının ifade seviyeleri ise belirgin artış göstermiştir. Otofagozom olgunlaşması, kargo taşınması ve lizozomla füzyonunda, mayadaki Atg8'in ortologları olan Gabarap/Lc3 protein aileleri de görev almaktadır. Gabarap ve Gabarapl1 nükleasyon ve elongasyonu gerçekleştiren protein kompleksleriyle etkileşim kurmaktadır [47]. EGCG uygulamasının Atg8 ailesi üyeleri üzerindeki etkisi henüz net olarak tanımlanmamıştır. Çalışmamızda ise EGCG uygulamasının lösemi hücrelerinde otofajinin zorunlu bileşenleri olan GABARAP ve GABARAPL1 genlerinin ifade seviyesini 15.26 ve 2.43 kat azalttığı belirlenmiştir. Bu ailenin epigenetik regülatörü olan hsa-miR-214-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-424-5p ve hsa-miR-497-5p ekspresyon seviyeleri ise belirgin artış göstermiştir. Atg4 ailesi, Atg3 ve Atg7 proteinleri, Atg8 ortologlarının otofagozom membranına konjugasyonuna aracılık etmektedir [48]. EGCG'nin bu genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisini içeren çalışmalar olmakla birlikte bu ilişki net şekilde ortaya konmamıştır. Çalışmamızda ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D ve ATG7 genlerinin ekspresyon seviyeleri 3.23, 3.49, 9.73, 13.95, 2.52 ve 10.94 kat azalma gösterirken bu genleri hedefleyen hsa-miR-155-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-210-3p ve hsa-miR-96-5p miRNA'larının ekspresyon seviyeleri ise belirgin artış göstermiştir.

Sonuç olarak, EGCG KML hücrelerinde otofajiyi düzenleyen temel genlerin ekspresyon seviyesini azalt-

maktadır. Bu ekspresyon azalışı otofaji ilişkili genleri hedefleyen epigenetik regülatörler olan miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki artışla uyumludur. Bu çalışma EGCG'nin KML hücrelerinde otofaji inhibisyonu sağlayabileceğini ortaya koyan ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır. EGCG gibi diyet yoluyla vücuda alınan fitokimyasalların çeşitli kanser hücreleri üzerinde meydana getirdiği epigenetik düzenlenimlerin araştırılması tedavi seçeneklerinin yanı sıra hastaların diyet kontrolünde de önemli konulara ışık tutması bakımından önem taşımaktadır.

Çıkar İlişkisi: Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

1. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. Lancet. 2015;385:1447-1459.
2. Sun Y, Peng ZL. Programmed cell death and cancer. Postgrad Med J. 2009;85:134-140.
3. Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and cell death. Essays Biochem. 2013;55:105-117.
4. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. Biochem Pharmacol. 2011;82:1807-1821.
5. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15:509-524.
6. Goker B, Caliskan C, Onur Caglar H. et al. Synergistic effect of ponatinib and epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells through altering expressions of cell cycle regulatory genes. J BUON. 2014;19:992-998.
7. Mao Y, Li L, Liu J, Wang L, Zhou Y. MiR-495 inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by targeting Akt1. Oncotarget. 2016;7:51223-51236.
8. Chen PH, Cheng CH, Shih CM. et al. The inhibition of microRNA-128 on IGF-1-activating mTOR signaling involves in temozolomide-induced glioma cell apoptotic death. PLoS One. 2016;11:e0167096.
9. Mou X, Liu S. MiR-485 inhibits metastasis and EMT of lung adenocarcinoma by targeting Flot2. Biochem Biophys Res Commun. 2016;477:521-526.
10. Ma Y, Yang HZ, Dong BJ, et al. Biphasic regulation of autophagy by miR-96 in prostate cancer cells under hypoxia. Oncotarget. 2014;5:9169-9182.
11. Soni M, Patel Y, Markoutsa E, et al. Autophagy, cell viability and chemo-resistance are regulated by miR-489 in breast cancer. Mol Cancer Res. 2018.
12. Chen X, Zhang Y, Shi Y, et al. MiR-129 triggers autophagic flux by regulating a novel Notch-1/ E2F7/Beclin-1 axis to impair the viability of human malignant glioma cells. Oncotarget. 2016;7:9222-9235.
13. Cao W, Qian G, Luo W, et al. miR-125b is downregulated in systemic lupus erythematosus patients and inhibits autophagy by targeting UVRAG. Biomed Pharmacother. 2018;99:791-797.
14. Capizzi M, Strappazzon F, Cianfanelli V, Papaleo E, Cecconi F. MIR7-3HG, a MYC-dependent modulator of cell proliferation, inhibits autophagy by a regulatory loop involving AMBRA1. Autophagy. 2017;13:554-566.
15. Yang J, He Y, Zhai N, Ding S, Li J, Peng Z. MicroRNA-181a inhibits autophagy by targeting Atg5 in hepatocellular carcinoma. Front Biosci (Landmark Ed). 2018;23:388-396.
16. Wang L, Song LF, Chen XY, et al. MiR-181b inhibits P38/JNK signaling pathway to attenuate autophagy and apoptosis in juvenile rats with kainic acid-induced epilepsy via targeting TLR4. CNS Neurosci Ther. 2018.
17. Ham O, Lee SY, Lee CY, et al. let-7b suppresses apoptosis and autophagy of human mesenchymal stem cells transplanted into ischemia/reperfusion injured heart 7by targeting caspase-3. Stem Cell Res Ther. 2015;6:147.
18. Zhang J, Ma J, Long K, et al. Overexpression of exosomal cardioprotective miRNAs mitigates hypoxia-induced H9c2 cells apoptosis. Int J Mol Sci. 2017;18.
19. Pan B, Feng B, Chen Y, et al. MiR-200b regulates autophagy associated with chemoresistance in human lung adenocarcinoma. Oncotarget. 2015;6:32805-328520.
20. Liguori M, Nuzziello N, Licciulli F, et al. Combined microRNA and mRNA expression analysis in pediatric multiple sclerosis: an integrated approach to uncover novel pathogenic mechanisms of the disease.Hum Mol Genet. 2018;27:66-79.
21. Xu Y, Yang J, Li F, Lian G, Ouyang M. MiR-29a inhibited intestinal epithelial cells autophagy partly by decreasing ATG9A in ulcerative colitis. Anticancer Drugs. 2018.
22. Gan J, Cai Q, Qu Y, et al. miR-96 attenuates status epilepticus-induced brain injury by directly targeting Atg7 and Atg16L1. Sci Rep. 2017;7:10270.
23. Li X, Li Y, Fang S, Su J, et al. Downregulation of autophagy-related gene ATG5 and GABARAP expression by IFN-λ1 contributes to its anti-HCV activity in human hepatoma cells. Antiviral Res. 2017;140:83-94.
24. Etna MP, Sinigaglia A, Grassi A, et al. Mycobacterium tuberculosis-induced miR-155 subverts autophagy by targeting ATG3 in human dendritic cells. PLoS Pathog. 2018;14:e1006790.
25. Wang C, Zhang ZZ, Yang W, et al. MiR-210 facilitates ECM degradation by suppressing autophagy via silencing of ATG7 in human degenerated NP cells. Biomed Pharmacother. 2017;93:470-479.
26. Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. Genes Dev. 2016;30:1913-1930.
27. Shinohara H, Taniguchi K, Kumazaki M, et al. Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia. Cancer Lett. 2015;360:28-38.
28. He W, Ye X, Huang X, et al. Hsp90 inhibitor, BIIB021, induces apoptosis and autophagy by regulating mTOR-Ulk1 pathway in imatinib-sensitive and -resistant chronic myeloid leukemia cells. Int J Oncol. 2016;48:1710-1720.
29. Mitchell R, Hopcroft LEM, Baquero P, et al. Targeting BCR-ABL-independent TKI resistance in chronic myeloid leukemia by mTOR and autophagy inhibition. J Natl Cancer Inst. 2018;110:467-478.
30. Ianniciello A, Dumas PY, Drullion C, et al. Chronic myeloid leukemia progenitor cells require autophagy when leaving hypoxia-induced quiescence. Oncotarget. 2017;8:96984-96992.
31. Lu Z, Xu N, He B, et al. Inhibition of autophagy enhances the selective anti-cancer activity of tigecycline to overcome drug resistance in the treatment of chronic myeloid leukemia. J Exp Clin Cancer Res. 2017;36:43.
32. El-Khattouti A, Selimovic D, Haikel Y, Hassan M. Crosstalk between apoptosis and autophagy: molecular mechanisms and therapeutic strategies in cancer. J Cell Death. 2013;6:37-55.
33. Yuan CH, Horng CT, Lee CF, et al. Epigallocatechin gallate sensitizes cisplatin-resistant oral cancer CAR cell apoptosis and autophagy through stimulating AKT/STAT3 pathway and suppressing multidrug resistance 1 signaling. Environ Toxicol. 2017;32:845-855.
34. Irimie AI, Braicu C, Zanoaga O, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis and autophagy in oral cancer SSC-4 cells. Onco Targets Ther. 2015;8:461-470.
35. Holczer M, Besze B, Zámbó V, Csala M, Bánhegyi G, Kapuy O. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Promotes Autophagy-De-

pendent Survival via Influencing the Balance of mTOR-AMPK Pathways upon Endoplasmic Reticulum Stress. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:6721530.
36. Kim SW, Moon JH, Park SY. Activation of autophagic flux by epigallocatechin gallate mitigates TRAIL-induced tumor cell apoptosis via down-regulation of death receptors. Oncotarget. 2016;7:65660-65668.
37. Sethi S, Li Y, Sarkar FH. Regulating miRNA by natural agents as a new strategy for cancer treatment. Curr Drug Targets. 2013;14:1167-1174.
38. Milenkovic D, Jude B, Morand C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. Free Radic Biol Med. 2013;64:40-51.
39. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011;27:107-132.
40. Wang J, Man GCW, Chan TH, Kwong J, Wang CC. A prodrug of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) serves as a novel angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. Cancer Lett. 2018;412:10-20.
41. Liu S, Xu ZL, Sun L, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human pancreatic cancer cells via PTEN. Mol Med Rep. 2016;14:599-605.
42. Jang JE, Eom JI, Jeung HK, et al. AMPK-ULK1-Mediated Autophagy Confers Resistance to BET Inhibitor JQ1 in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. Clin Cancer Res. 2017;23:2781-2794.
43. Zachari M, Ganley G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. Essays Biochem. 2017;61:585–596.
44. Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. FEBS Lett. 2010;584:1302-1312.
45. Matsushita M, Suzuki NN, Obara K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. Structure of Atg5.Atg16, a complex essential for autophagy. J Biol Chem. 2007;282:6763-6772.
46. Chen L, Ye HL, Zhang G, et al. Autophagy inhibition contributes to the synergistic interaction between EGCG and doxorubicin to kill the hepatoma Hep3B cells. PLoS One. 2014;9:e85771.
47. Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. FASEB J. 2016;30:3961-3978.
48. Tanida I, Sou YS, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3. FEBS J. 2006;273:2553-2562.