ÖZGÜN ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg ▶ 2020:27(3):315-321 doi: 10.17343/sdutfd.624530

KML VE KML LÖSEMİK KÖK HÜCRESİ ARASINDA MikroRNA EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF MicroRNA EXPRESSION CHANGES BETWEEN CML AND CML LEUKEMIC STEM CELL

Melek PEHLİVAN[1], Mustafa SOYÖZ[2,3], Hatice İlayhan KARAHAN ÇÖVEN[2,3], Burcu ÇERÇİ[2,3], Tülay KILIÇASLAN AYNA[2,3], Halil ATEŞ[4], Zeynep YÜCE[5], Hakkı Ogün SERCAN[5]

[1] Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
[2] Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
[3] Doku Tipleme Laboratuvarı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir, Türkiye
[4] Hematoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye
[5] Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Cite this article as: Pehlivan M, Soyöz M, Karahan Çöven Hİ, Çerçi B, Kılıçaslan Ayna T, Ateş H, Yüce Z, Sercan HO. Evaluation Of MicroRNA Expression Changes Between CML And CML Leukemic Stem Cell. Med J SDU 2020; 27(3): 315-321.

Öz

Amaç
Kronik Miyeloid Lösemi (KML), hematopoetik kök hücreden (HKH) köken alan miyeloproliferatif bir hastalıktır. MikroRNA' lar (miRNA), transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenlenleyen küçük kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar KML'nin progresyonunda, lösemik kök hücre büyümesi ve tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) direncinin gelişmesinde hücre homeostazisini etkilemektedirler. Bu çalışmada KML lösemik hücresi ve KML lösemik kök hücresi (LKH) arasında değişen miRNA ekspresyon profillerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem
KML hücre hattı olan K562 hücrelerinden, manyetik hücre ayrımlama (MACS) yöntemi kullanılarak CD34+CD38- lösemik kök hücreleri ayrımlanmıştır. Ayrımlanan LKH'lerin saflığının %85-92 arasında olduğu akım sitometri yöntemi ile gösterilmiştir. K562 ve K562 LKH'leri arasında, gerçek zamanlı kantitatif PCR ile kanser kök hücre ilişkili 84 adet miRNA'nın ekspresyon değişimleri incelenmiştir.

Bulgular
K562 ve K562 LKH'leri arasında, kök hücre ilişkili olduğu bilinen 84 adet miRNA'dan 7'sinin anlamlı düzeyde değiştiğini gözledik ($p<0,05$). K562 LKH'lerinde hsa-miR-29b-3p'nin ekspresyon düzeylerinde artış izlenirken; hsa-miR-320d, hsa-miR-96-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p hsa-miR-423-5p'da azalma olduğu gözlenmiştir.

Sonuç
KML lösemik hücreleri ile KML LKH'leri arasında proliferasyon, eritroid farklılaşma, kendi kendini yenileme ve apoptoz sürecinde rol alan miRNA'lar ve hedef genlerinin ekspresyonlarındaki değişim, hastalığın ilerlemesinde miRNA'larında rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu nedenle KML LKH'lerine özgü miRNA'ların hastalığın progresyonunun ve TKİ direncinin önlenmesi için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde hedef moleküller olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kronik Myeloid Lösemi, Lösemik Kök Hücre, miRNA

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: pehlivanmlk@gmail.com
Müracaat tarihi/Application Date: 26.09.2019 • Kabul tarihi/Accepted Date: 05.12.2019
ORCID IDs of the authors: M.P. 0000-0001-8755-4812; M.S. 0000-0001-5159-6463; H.İ.K.Ç. 0000-0002-3371-7345; B.Ç. 0000-0002-7477-1073; T.K.A. 0000-0001-7993-978X; H.A. 0000-0002-0112-5505; Z.Y. 0000-0002-2762-0942; H.O.S. 0000-0002-2449-1794

Abstract

Objective
Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative disease, originating from the hematopoietic stem cells (HSC). MicroRNAs (miRNA) are small noncoding RNAs that post transcriptionally regulate gene expression. miRNAs have been implicated in the progression of CML and may affect growth of leukemic stem cell and cell homeostasis in the development of tyrosine kinase inhibitors (TKI) resistance. In this study, we aimed to investigate miRNA expression profiles ranging from CML leukemic cell and CML leukemic stem cell (LSC).

Material and Methods
$CD34^{+}CD38^{-}$ leukemic stem cell population was isolated from K562 cells by Magnetic Cell Separation (MACS) method. The purity of the separated LSCs were controlled by flow cytometry (85-92%). Expression changes of 84 cancer stem cell related miRNAs were analyzed by real-time quantitative PCR between K562 and K562 LCS.

Results
Data analysis revealed that 7 of 84 miRNAs were changed in K562 LKH as compared to K562 cells ($p<0.05$). We observed that the expression levels of hsa-miR-29b-3p was upregulated, whereas hsa-miR-320d, hsa-miR-96-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-423-5p were downregulated in K562 LSCs.

Conclusions
The change in the expression of miRNAs and their target genes involved in the proliferation, erythroid differentiation, self-renewal and apoptosis process between in the K562 and K562 LCS suggests that they may play a role in miRNAs in disease progression. Therefore, CML LSC miRNAs may be target molecules in the development of new strategies for the prevention of disease progression and TKI resistance.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Leukemic Stem Cell, miRNA

Giriş

Kronik Miyeloid Lösemi (KML); malign, myeloproliferatif, bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. 9 ile 22 no'lu kromozom arasındaki resiprokal translokasyon sonucu oluşan Philadelphia kromozomu (Ph), KML hastalığının oluşumunda temel genetik bozukluk olarak bilinmektedir. Translokasyon sonrasında BCR (Breakpoint Cluster Region) geni ile ABL (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog-1) geni, BCR-ABL kimerik genini oluştururlar (1). ABL geni normal koşullarda, sıkı bir denetime tabi olan bir tirozin kinaz kodlar. BCR-ABL tarafından kodlanan onkoprotein ise, hücresel denetimlerden bağımsız ve artmış tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. BCR-ABL onkoproteinini hedef alan tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ' ler) çoğu KML hastası için birinci basamak tedavidir (2). İmatinib klinikte kullanıma sokulan ilk BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörüdür. İmatinib ve onu takip eden yeni nesil TKİ'ler (dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib) KML tedavisinde hastalığın kontrol altına alınmasını sağlayarak, genel sağ kalım ve prognozu önemli ölçüde iyileştirmiştir. (3). İkinci ve üçüncü kuşak TKİ'ler, imatinib'den daha güçlü ve seçici özellikte olup; hasta komorbiditeleri, hastalık evresi, BCR-ABL1 mutasyon durumu gibi farklı hasta ve hastalık özelliklerine göre farmakolojik profil ve yanıt sergilerler (4). Bununla birlikte, farklı genetik mekanizmaların neden olduğu ilaç direncinin gelişimi, TKİ'lerin klinik uygulamasında ana sorundur. Direnç gelişim mekanizmalarının başında BCR-ABL geninde TKİ'lerin bağlanma bölgesindeki mutasyonlar gelir (5). Buna ek olarak tanımlanan diğer direnç mekanizmaları, BCR-ABL gen amplifikasyonu, serum proteinlerine bağlanma nedeniyle hücre içine alınamama ve hücre yüzey pompaları nedeniyle hücre dışına atılım olarak özetlenebilir. Son iki mekanizma TKİ'nin hücre içi etkin konsantrasyonlara ulaşmasını engelleyerek etki gösterir (6,7). Ancak bu tanımlanmış mekanizmalar, direnç izlenen olguların hepsini kapsamamaktadır. Halen direnç gelişen hastaların yaklaşık %15'inde altta yatan neden bilinmemekte ve bu konuda yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar KML lösemik kök hücrelerinin TKİ'lere karşı yapısal olarak dirençli olduğunu göstermiştir (8,9). LKH'lerin, kendi kendini yenileyebilme ve çok-soylu (multi-lineage) hematopoezi yeniden çoğaltabilme kabiliyeti de dahil olmak üzere normal HKH ile bazı özellikleri paylaştığına inanılmaktadır. Yaygın olarak kabul edilen bir hipotez, KML LKH'nin, lösemik klonun $CD34^{+}$ $CD38^{-}$ fraksiyonu içerisinde bulunmasıdır (5,10). KML kök hücrelerinde $CD34^{+}$ $CD38^{-}$ işaretleyicilerinin tanımlanması ve bu kök hücrelerin tümör agresifliği, metastaz, tedaviye direnç ve tümör nüksü ile ilişkili bulunmasıyla, bu hastalık için gelişmiş bir LKH fenotipi tanımlanmıştır (11,12).

Bir diğer araştırma alanı ise mikroRNA (miRNA)'ların ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin direnç oluşumundaki rolüdür. miRNA'lar, gen ekspresyonunu kontrol eden, kısa sekansa (~20-23 nükleotitler) sahip kodlayıcı olmayan düzenleyici RNA'lardır (13). miRNA'lar, önemli biyolojik işlemlerin kontrolünde yer alan birçok genin mRNA'larına seçici olarak bağlanarak yıkılmasına neden olur veya translasyonlarını inhibe ederek gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynarlar (14,15). KML'de miRNA'ların, gen ekspresyon profilleri ve fenotipik sonuçlarını modüle eden güçlü epigenetik aracılar olduğu ileri sürülmüştür (16). miRNA'ların anormal ekspresyonunun hastalığın patogenezi, ilerleyişi ve tedaviye yanıtla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bir miRNA, bir tümör baskılayıcı veya bir onkogen olarak işlev görebilir (17).

Bu çalışma ile amacımız KML lösemik hücreleri ile KML lösemik kök hücreleri arasında farklılık gösteren ve kanser kök hücreleri ile ilişkilendirilebilecek miRNA ekspresyon profillerini tanımlamaktır. Bu amaç doğrultusunda KML çalışmalarında yaygın olarak kullanılan lösemi hücre hattı K562'den, manyetik hücre ayrımlama (MACS) yöntemi ile $CD34^+CD38^-$ LKH'leri ayrımlandı. Ayrımlanan hücrelerin saflığı akım sitometrisi yöntemiyle doğrulandıktan sonra K562 ve K562 LKH'de miRNA'ların ekspresyon değişimleri incelendi. İki hücre grubu arasında ifadeleri değişen miRNA'ların saptanması, onların KML'de LKH'leri hedef alacak tedavi stratejilerinde kullanımlarının önünü açacaktır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

İnsan KML hücre hattı olan K562 DSMZ (Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen-GmbH, Braunschweig, Almanya)'dan alınarak kültüre edildi. Hücreler % 10 fetal sığır serum (FBS), 1µg/ml penisilin/streptomisin, 2mM L-glutamin içeren RPMI 1640 ortamı içerisinde üretildi. Hücreler, 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edildi.

MACS ile Hücre Ayrımlama

K562 hücrelerinden manyetik hücre ayrımlama yöntemi ile $CD34^+$ $CD38^-$ lösemik kök hücrelerin ayrımlanması gerçekleştirildi. $CD34^+$ lösemik hücreleri, üreticinin talimatlarına göre MACS CD34 lösemik hücre seçim ve izolasyon kiti (Miltenyi Biotec, Almanya) kullanılarak saflaştırıldı. Ayrımlanan $CD34^+$ hücreler akım sitometresinde kontrol edildikten sonra, bu hücre grubundan tekrar $CD38^-$ hücreleri CD38 mikroboncuğu (Miltenyi Biotec, Almanya) kullanılarak MACS (Miltenyi Biotec Quadro, Almanya) yöntemi ile ayrıldı. Böylece $CD34^+/CD38^-$ hücre grubu elde edildi.

Akım sitometrisi

Ayrımlanan hücrelerin saflığı akım sitometrisinde (FACSCanto II flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA 95131 USA) kontrol edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 5 µl CD34 PE, 5 µl CD38 FITC (Miltenyi Biotec, Almanya) antikorları eklendi. 30 dakika inkübasyondan sonra tüplere 1000 µl fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklenerek 1900 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Pellet üzerine 500 µl PBS eklenerek akım sitometri cihazında FACSDiva software kullanılarak analiz edildi.

miRNA İzolasyonu ve Komplementer DNA Sentezi

Üretici firmanın protokolü doğrultusunda K562 ve K562 $CD34^+CD38^-$ lösemik kök hücrelerinden miRCURY™ RNA izolasyon (Exiqon, USA) kiti kullanılarak miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA'ların konsantrasyonları hesaplandıktan sonra miRCURY™ Universal RT microRNA PCR Universal cDNA sentez (Exiqon, USA) kitinde belirtilen reaksiyon hazırlanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

miRNA Ekspresyon Profili

Ekspresyon çalışmalarında 'Cancer Stem Cell miRNAs PCR Array Paneli' örnek alınarak primer tasarımı yapıldı (Exiqon miRCURY LNA™ RT microRNA PCR Panel, USA). Örnek alınan bu panel kök hücreler ile ilişkilendirilmiş 84 adet miRNA ve kontrol primerlerini içermektedir. miRCURY LNA™ RT microRNA PCR ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon, USA) kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda CFX96-RT PCR (Biorad, USA) cihazında reaksiyon gerçekleştirildi.

Biyoinformatik Analiz

Çalışmada elde edilen Cq değerlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile rölatif kantitasyonu yapıldı. P değeri 0.05'in altında olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Ekspresyon analizlerinin değerlendirilmesi "QIAGEN Data Analysis" programı kullanılarak gerçekleştirildi (https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/).

Bulgular

K562 Hücre Hattından Ayrımlanan $CD34^+CD38^-$ Kök Hücre Saflığının Değerlendirilmesi

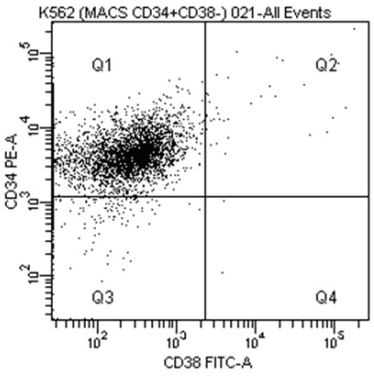
Manyetik hücre ayrımlama yöntemi ile K562 hücre hattından $CD34^+$ $CD38^-$ lösemik kök hücrelerin ayrımlanması gerçekleştirildi. Ayrımlama sonrası akım sitometrisinde CD34 ve CD38 antikorları kullanılarak elimizdeki hücrelerin saflık yüzdesinin %85-92 arasında olduğu gösterildi (Şekil 1).

miRNA İzolasyonu ve Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

K562 ve K562 LKH hücrelerinden ayrı ayrı miRNA izolasyonu ve cDNA çevriminin gerçekleştirilmesinden sonra ekspresyon düzeyleri, kök hücreler ile ilişkilendirilmiş miRNA'ları içeren bir PCR dizini (Array) ile gösterildi. Elde edilen Cq değerlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile rölatif kantitasyonu yapılarak, p değeri 0.05'in altında olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Ekspresyon analizlerinin değerlendirilmesi "QIAGEN Data Analysis" programı kullanılarak gerçekleştirildi. K562 ve K562 LKH'leri arasında, kök hücre ilişkili 84 adet miRNA'nın ekspresyon değişimleri incelendi (Tablo1). Sonuçlarımıza göre, kök hücre ilişkili olduğu bilinen 84 adet miRNA'dan 7'si, K562 ve K562 LKH'leri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdi (p<0,05) (Şekil 2). K562 LKH'lerinde hsa-miR-29b-3p'nin ekspresyon düzeylerinde artış izlenirken; hsa-miR-320d, hsa-miR-96-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p hsa-miR-423-5p'da azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

Şekil 1

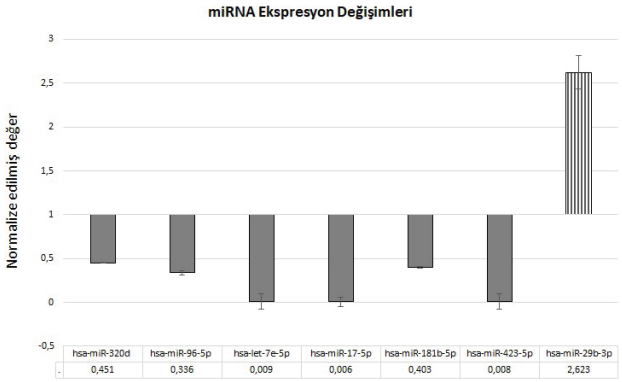
K562 CD34+CD38- lösemik kök hücrelerinin saflığının akım sitometrisi yöntemi ile kontrol edilmesi (Q1: %95,8).



Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	6,014	####	100.0
Q1	5,761	95.8	95.8
Q2	34	0.6	0.6
Q3	217	3.6	3.6
Q4	2	0.0	0.0

Şekil 2

K562 ve K562 LKH 'leri arasında miRNA ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması (Normalizasyon K562'ye göre yapılmıştır) (p<0,05).



Tablo 1 K562 ve K562 LKH'leri arasında PCR dizininde incelenen kanser kök hücre ilişkili miRNA'ların listesi

hsa-let-7a-5p	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-134-5p	hsa-miR-137	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-184	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	UniSp3 IPC
hsa-miR-320d	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-182-5p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-203a	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-302a-3p	hsa-miR-429	hsa-miR-9-5p	UniSp6 CP
hsa-miR-96-5p	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-16-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-181b-5p	UniSp3 IPC
hsa-miR-22-3p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-105-5p	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-135b-5p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-146b-5p	UniSp3 IPC
hsa-miR-150-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-29b-3p
hsa-miR-31-5p	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-494-3p	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-522-3p	hsa-miR-744-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-1181
hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-451a	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-636	hsa-miR-107
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-191-5p	U6 snRNA	SNORD38B	SNORD49A	cel-miR-39-3p CP	UniSp2 CP	UniSp4 CP	UniSp5 CP	UniSp6 CP

Tartışma

TKİ'lerin gelişimi ile ilgili son yirmi yılda yapılan çalışmalar KML'yi ölümcül bir lösemi alt türü olmaktan çıkarıp, kontrol edilebilen bir hastalığa dönüştürmüştür (18). Ancak TKİ tedavisi gören hastaların yaklaşık %30'unda zaman içinde TKİ'lere karşı direnç gelişebilmektedir (19). Bu durum direnç oluşum mekanizmaları üzerindeki araştırmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. TKİ direnç oluşumunda, BCR-ABL'deki mutasyonlar, amplifikasyon, serum proteinlerine bağlanma ve hücre yüzey pompalarının aktifleşmesi gibi mekanizmalar tanımlanmış olmakla beraber; direnç gelişen hastaların yaklaşık %15'inde izlenen TKİ direncinin altında yatan moleküler mekanizmalar bilinmemektedir.

Son yıllardaki araştırmalar lösemik kök hücrelerin TKİ'lere karşı doğal direnç gösterdiğini ortaya koymuştur. Chu ve ark. uzun süreli TKİ tedavisi sonrasında LKH'lerin devamlılığını sürdürdüklerini gösterdiler (9). Benzer şekilde Corbin ve ark., KML'de kök hücrelerin, BCR-ABL kinaz aktivitesinden bağımsız bir mekanizma ile imatinibe karşı hayatta kaldıklarını ifade ettiler (8). BCR-ABL kinaz aktivitesini hedef alan tedavilerin, KML kök hücrelerini tamamen ortadan kaldırmadığı geniş ölçüde kabul görmektedir. Bu nedenle hastalığı giderme konusunda farklı terapötik stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. TKİ direnç gelişiminde farklı genetik mekanizmaların yanında, epigenetik mekanizmaların da rolü olduğu kabul edilmektedir. Epigenetik mekanizmalar arasında araştırılan alanlardan biri olan miRNA'ların da bu direnç oluşumunda rol aldığı ifade edilmektedir. Spesifik miRNA'ların hematopoetik hücre farklılaşması ve gelişimini düzenlediği bildirilmiştir. KML'de miRNA ifadesi ile ilgili ilk çalışma, $CD34^{+}$ hücrelerde miR-17-92 kümesinin yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermiştir (20). Bunu KML'deki anormal miRNA ifade değişimlerini bildiren diğer çalışmalar takip etmiştir. KML'de imatinib tedavisi sonrasında birkaç miRNA'da (miR-146a, miR-142-3p, miR-150, miR-199b-5p) hızla ifade değişimi olduğu gösterildi (21,22). Bir diğer araştırmada bazı miRNA'ların (örneğin miR-26a, miR-29a, miR-100, miR-191, miR-326, miR-422b) yeni tanı konmuş KML hastalarında imatinib direncinin belirleyicileri olarak kullanılabileceği ifade edildi (23).

Biz bu çalışmada TKİ'lere dirençli hücrelerde potansiyel yeni tedavi hedeflerini tanımlayabilmek amacıyla, TKİ'lere dirençli olduğu bilinen LKH ile kök hücre özelliği taşımayan lösemik hücrelerin miRNA profilleri arasındaki farklılıklarını araştırdık. Çalışmamız sonucunda KML hücre hattı K562 ve ondan ayrımlanmış lösemik kök hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren 7 miRNA tanımlandı: hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-320d, hsa-miR-96-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-423-5p. Bunlardan hsa-miR-29b-3p LKH'de ekspresyon artışı gösterirken, diğer 6'sının ifade düzeylerinin azaldığı saptanmıştır.

KML LKH'lerinde ekspresyonunun artmış olduğunu gösterdiğimiz hsa-miR-29b-3p'nin, hematopoezde rol oynadığı ve potansiyel tedavi hedefi olarak ileri sürülen miR-29 ailesinin bir üyesi olduğu bilinmektedir. Bu aile hücresel yerleşimlerine göre benzer dizileri paylaşan üç üyeden oluşur: miR-29a, miR-29b, miR-29c. Li ve ark, miR-29b'nin KML gelişiminde rol aldığını ve hedef bölgesinin ABL1 geninin 3'UTR'si olduğunu göstermiştir (24). Zofia ve ark., K562 hücrelerinde miR-29b'nin tümör supressör etki gösterdiğini ve ABL1 ile BCR-ABL1'in baskılanmasında rol aldığını belirtmişlerdir (25). miR-29 ailesinin potansiyel hedef genleri arasında, Bcl-2 ailesine ait Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ve miyeloid hücre lösemi dizisi 1 (Mcl-1) de yer almaktadır (26,27). Ek olarak miR-29b artışının ayrıca hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, miyeloid farklılaşmasını desteklediği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ancak literatürden elde edilen veriler ışığında, miR-29b'nin aşırı ekspresyonunun sonuçlarının hücre tipine özgü olduğunu ve kanser hücresinin farklılaşma ve/veya transformasyon durumuna bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Artan miR-29b'nin LSC'lerin durgunluk durumu (quiescence state) ve dolayısıyla kemoterapi duyarlılıkları ve sağkalımları üzerindeki etkisi henüz kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (10).

LKH'lerinde ekspresyonu azalan miRNA'lardan miR181b'nin dahil olduğu miR181 ailesi KML patogenezi ile oldukça ilişkilidir. Blastik kriz KML hastalarının periferik kanlarında miR-181a, miR-181b'nin ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. miR181b ve miR181d'nin Lyn aracılıklı imatinib dirençli KML hücrelerinde Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL1) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler Lyn inhibitörü Dasatinib ile muamele edildiğinde miR-181b ve miR-181d ifadesinin arttığı bulunmuştur (13). Erişkin akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında miR-181b ekspresyonunun, kötü prognoz ve düşük remisyon oranlarıyla ilişkili olduğu; AML hastalarında tam remisyon oranının daha düşük olduğu, nükssüz sağkalım ve genel sağkalım süresinin kısaldığı hastalarda miR-181b ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir (17). miR-181b-5p hedefleri arasında hücre çoğalmasında rol oynayan p27, CREB1 ve TIMP3; apoptoz ve kemoterapi direnci ile ilişkili BCL-2, MCL-1 ve XIAP; hücre göçünde rol oynayan NRP1; ve vasküler inflamasyonda rol oynayan importin-α3 bulunmaktadır.

miR-181b-5p hedef genlerinin çoğu, hücre çoğalması, apoptoz ve kemoresistans ile ilişkili olduğundan miR-181b-5p'nin lösemi oluşumunda önemli rol oynayabileceğini düşünmekteyiz (28,29).

LKH'lerinde ekspresyonu azalan diğer miRNA'lardan miR-320d' nin ifadesindeki azalışın, yaygın büyük B hücreli lenfoma (DLBCL) hastalarının kötü prognozu ile ilişkili olduğu ve ekspresyonu arttığında hücre proliferasyonunu ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir (30). miR-320d'nin AML hastalarının serumunda normal kontrollere kıyasla anlamlı derecede artmış olduğu da gösterilmiştir (28). Öte yandan miR-96'nın yeni teşhis edilmiş AML hastalarında ifadesinin düşük olduğu ve kötü prognostik belirteçler ile ilişkilendirildiği gösterilmiş; standart kemoterapi sonrası ise miR-96 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. LKH'de ifadesinin azaldığını göstermiş olduğumuz diğer bir miRNA, miR-128, sağlıklı hastaların kan örneği ile karşılaştırıldığında lösemik hücrelerinde yüksek bulunmuştur (32). Let7e-5p miRNA'sının ise akut lenfoblastik lösemi (ALL)'de expresyonunun azaldığı gösterilmiştir (33).

Genel lösemik hücre populasyonu ile karşılaştırıldığında LKH'de ifadesinin azalmış olduğunu göstermiş olduğumuz son miRNA miR-17-5p'dir. miR-17-5p' nin özellikle hücre proliferasyon genlerinin regülasyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (34). Bu çalışmaların yanı sıra miR-17-5p ifade artışının hematopoezin (normal ve patolojik durumlarda) düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ek olarak miR-17-5p miyeloid farklılaşmasının modülasyonunda yer alan miR-17-92 polisistronunda kodlanmaktadır (35).

Literatürde görüldüğü gibi, çalışmamız sonucunda saptanmış olan miRNA'lar KML'de lösemik kök hücreler ve TKİ direnci ile doğrudan ilişkilendirilmemiş olsalar da hematopetik sistem fizyolojisi ve farklı lösemiler üzerinde yapılmış araştırmalarda karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamız sonucu K562 ve K562 LKH'leri arasında değişim gösteren miRNA'ların hedef genlerini incelediğimizde binlerce gen karşımıza çıkmaktadır. K562 ve K562 LKH'leri arasında değişim gösteren miRNA'ların Targetscan' a (www.targetscan.org) göre tahmini hedef genleri incelendiğinde, bunların transkripsiyonun düzenlenmesi, hücre içi sinyal kaskadları, apoptoz düzenlenme ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi ile ilişkili oldukları izlenmiştir. Bu hedef genlerden CDK6 (cyclin-dependent kinase 6), BCL2L1 (BCL2 like1), CRKL (Proto-oncogene C-c-rk), BCL2 (B-cell lymphoma 2), RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), SP1, CDKN1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), AKT1, PIK3R1'in (Phosphoinositide-3-kinase) hematopoetik veya lenfoid organ gelişiminde rol aldığı CDK6'nın, eritrosit farklılaşmasının düzenlenmesinde, CDK6 ve RUNX1'in miyeloid hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir (21). MikroRNA'ların gen ürünü mRNA'lara bağlanarak, ilgili gen ifadesini azalttıkları göz önünde tutulduğunda: LKH'lerde azalan miRNA'larımızın hedefi olan bu genlerin kök hücrede artmış olabilecekleri öngörülmektedir. LKH'de azalan miRNA'larımızın hedef genlerinden biri olan CDKN1B hücre siklusunda görev almaktadır ve diğer hedef gen olan antiapoptotik PI3K yolağının bir üyesi AKT1, BCR-ABL aracılı transformasyonun yanı sıra BCR-ABL kinaz inhibitörlerine cevap olarak da yer alır. PI3K / AKT / mTOR sinyalinin imatinib naif hücrelerinde aktive edildiği, imatinib seçilim baskısı altında imatinib'e direnci arttırdığı gösterilmiştir (21).

Kronik myeloid lösemi ile ilişkili olan hedeflere bakıldığında bunların çoğunun MAPK sinyal iletiminde rol oynadığı (E2F3 (E2F Transcription Factor 3), CBL(E3 ubiquitin-protein ligase), CRK (Proto-oncogene C-crk), CRKL (Proto-oncogene C-crk), SOS1 (Son of sevenless), MAPK1 (Extracellular signal-regulated kinase ½ (ERK))gözlenmektedir. İlginç şekilde, Ph + hücre hattı K562'de MAPK sinyalinin inhibisyonunun apoptozu indüklediği belirtilmiştir (36).

Sonuç

Verilerimizde K562s LKH'de MAPK sinyal yolağını hedefleyen miRNA'larımız anlamlı şekilde azalmaktadır. Bu azalan miRNA'ların MAPK sinyal yolağının aktivasyonunun azaltılabilmesi için olası hedeflerden biri olabileceğini ve KML LKH'lerine özgü miRNA'lardaki değişimlerin, yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesini kolaylaştırabileceğini düşünmekteyiz.

Teşekkür
Bu çalışma 2016.ÖNP.SHMY.0026 proje numarası ile İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. Am J Blood Res 2013;19(3):191-200.
2. Litwińska Z, Machaliński B. miRNAs in chronic myeloid leukemia: small molecules, essential function. Leuk Lymphoma 2017; 58(6):1297-1305.
3. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. Blood 2017;129(12):1595-1606.
4. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. Am J Hematol 2018;93(3):442-459.

5. Herrmann H, Cerny-Reiterer S, Gleixner KV, Blatt K, Herndlhofer S, Rabitsch W, Jäger E, Mitterbauer-Hohendanner G, Streubel B, Selzer E, Schwarzinger I, Sperr WR, Valent P. CD34(+)/CD38(-) stem cells in chronic myeloid leukemia Express Siglec-3 (CD33) and are responsive to the CD33-targeting drug gemtuzumab/ozogamicin. Haematologica 2012;97(2):219-26.
6. Nestal de Moraes G, Souza PS, Costas FC de F, Vasconcelos FC, Reis FRS, Maia RC. The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. Leuk Res Treatment 2012;2012:1–19.
7. Elias J, Sameer A P, Hagop K, Jorge C. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of resistance and treatment. Hematol Oncol Clin North Am 2011;25(5):981–95.
8. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. J Clin Invest 2011;121:396–409.
9. Chu S, McDonald T, Lin A, Chakraborty S, Huang Q, Snyder DS, Bhatia R. Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. Blood 2011;118:5565–5572.
10. Martiáñez Canales T, de Leeuw DC, Vermue E, Ossenkoppele GJ, Smit L. Specific Depletion of Leukemic Stem Cells: Can MicroRNAs Make the Difference? Cancers (Basel). 2017;9(7): 1-23.
11. Jørgensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. Biochem Soc Trans 2007;35:1347–1351.
12. Carvajal LA, Steidl U. Eliminating Cancer Stem Cells in CML with Combination Transcriptional Therapy. Cell Stem Cell 2016;19:6–8.
13. Di Stefano C, Mirone G, Perna S, Marfe G. The roles of microRNAs in the pathogenesis and drug resistance of chronic myelogenous leukemia (Review). Oncol Rep 2016;35(2):614–24.
14. Peláez N, Carthew RW. Biological robustness and the role of microRNAs: A network perspective. Curr Top Dev Biol 2012;99:237-255.
15. Nam JW, Rissland OS, Koppstein D, Abreu-Goodger C, Jan CH, Agarwal V, Yildirim MA, Rodriguez A, Bartel DP. Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. Mol Cell 2014;53:1031-1043.
16. Polakova KM, Koblihova J, Stopka T. Role of Epigenetics in Chronic Myeloid Leukemia. Curr Hematol Malig Rep 2013;8(2):28–36.
17. Yeh CH, Moles R, Nicot C. Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. Mol Cancer 2016;15(1):37.
18. Ferreira LAM, Capannacci J, Hokama NK, Nogueira CR, Ceccarelli M, Cerulo L, D'Angelo F, de Oliviera Montandon Hokama P. Circulating microRNAs expression profile in newly diagnosed and imatinib treated chronic phase-chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2019;60(3):805-811.
19. Machova Polakova K, Koblihova J, Stopka T. Role of epigenetics in chronicmyeloid leukemia. Curr Hematol Malig Rep 2013;8(1):28-36.
20. Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, Ganser A, Eder M, Scherr M. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. Blood 2007;109(10):4399–405.
21. Machová Poláková K, Lopotová T, Klamová H, Burda P, Trněný M, Stopka T, Moravcová J. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. Mol Cancer 2011;10:41.
22. Flamant S, Richie W, Guilhot J, Hols J, Bonnet ML, Chomel JC, Guilhot F, Turhan AG, Rasko JEJ. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. Haematologica 2010;95:1325–1333.
23. Enériz ESJ, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Garate L, Maritn V, Coredu L, Vilas-Zornoza A, Rodríguez-Otero P, Calasanz MJ, Pr'ésper F, Agirre X. MicroRNA expression profiling in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients without clinically significant ABLI-mutations. Mol Cancer 2009;8:69–72.
24. Li Y, Wang H, Tao K, Xiao Q, Huang Z, Zhong L, Cao W, Wen J, Feng W. miR-29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of BCR/ABL1 protein. Exp Cell Res 2013;319(8):1094–1101.
25. Zofia L, Machalinski B. miRNAs in chronic myeloid leukemia: small molecules, essential function. Leukemia & Lymphoma 2016;58(6):1297-1305.
26. Mott J, Kobayashi S, Bronk SF, Gores JG. miR-29 Regulates Msl-1 Protein Expression and Apoptosis. Oncogene 2007;26(42):6133-6140.
27. Xu L, Xu Y, Jing Z, Wang X, Zha X, Zeng C, Chen S, Yang L, Luo G, Li B, Li Y. Altered expression pattern of miR-29a, miR29b and the target genes in myeloid leukemia. Exp Hematol Oncol 2014;3:17.
28. Zhi F, Cao X, Xie X, Wang B, Dong W, Gu W, Ling Y, Wang R, Yang Y, Liu Y. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia. PLoS One 2013;8(2):e56718.
29. Wang B, Li W, Guo K, Xiao Y, Wang Y, Fan J. miR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. Biochem Biophys Res Commun 2012;421(1):4-8.
30. Wu PY, Zhang XD, Zhu J, Guo XY, Wang JF. Low expression of microRNA-146b-5p and microRNA-320d predicts poor outcome of large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. Hum Pathol 2014 ;45(8):1664-73.
31. Zhao J, Lu Q, Zhu J, Fu J, Chen Y. Prognostic value of miR-96 in patients with acute myeloid leukemia. Diagn Pathol 2014;9:76.
32. Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A et al. Downregulation of Mir-31, Mir-155, and Mir-564 in Chronic Myeloid Leukemia Cells. PlosOne 2012;7(4):1-12.
33. Dell'Aversanal C, Altucci L. miRNA-mediated deregulation in leukemia. Front Genet 2012;3:252.
34. Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest AR, Kolle G, Gabrielli B, Grimmond SM. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. Genome Biol 2008;9(8):127.
35. Wong P, Iwasaki M, Somervaille TC, Ficara F, Carico C, Arnold C, Chen CZ, Cleary ML. The miR-17-92 microRNA Polycistron Regulates MLL Leukemia Stem Cell Potential by Modulating p21 expression. Cancer Res 2010;70(9):3833-42.
36. Kang CD, Yoo SD, Hwang BW, Kim KW, Kim DW, Kim CM et al. The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells. Leuk Res 2000; 24(6):527-34.