Dicle Tıp Dergisi / Dicle Med J (2022) 49 (1) : 220-228

www.diclemedj.org

Özgün Araştırma / Original Article

CTBP1 ve NF2 Gen Ekspresyonlarının Prostat Kanser Hücrelerinde KDM6A/B Aracılı Epigenetik Regülasyonunun İncelenmesi

Gökçe Yıldırım Buharalıoğlu[1]

1 Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Geliş: 13.09.2021; Revizyon: 24.02.2022; Kabul Tarihi: 25.02.2022

Öz

Amaç: Çalışmanın amacı, epigenetik regülatörlerden lizin demetilaz 6A (KDM6A) ve/veya lizin demetilaz 6B'nin (KDM6B) prostat kanseri oluşumu ve progresyonunda rol oynayan C Terminal bağlayıcı protein1 (CTBP1) ve Nörofibromatozis Tip2 (NF2) ekspresyonlarının regülasyonu üzerindeki modüle edici rolünün aydınlatılmasıdır.

Yöntemler: Prostat kanseri metastatik hücreleri LNCaP'lere KDM6 ailesi selektif inhibitörü GSK-J4 uygulanıp, total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak; CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerindeki değişiklikler reverse transcription-quantitative real time PCR (RT-qPCR) ile gösterilmiştir. Saptanan değişikliklerin transkripsiyonel inhibisyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmak üzere CTBP1 ve NF2 pre-spliced mRNA düzeylerindeki değişiklikler RT-qPCR ile ölçülmüştür. KDM6A ve/veya KDM6B'nin (KDM6A/B) small interfering RNA (siRNA) aracılı susturulduğu hücrelerde CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerindeki değişiklikler RT-qPCR ile gösterilerek bu genlerin KDM6 enzimlerinin hangisi tarafından regüle edildiği belirlenmiştir.

Bulgular: CTBP1 ve NF2 rölatif mRNA düzeyleri GSK-J4 ile %45 ve %49 azalmıştır. Saptanan azalmaların CTBP1 ve NF2 mRNA ekspresyonlarının GSK-J4 tarafından transkripsiyonel baskılanmasıyla ilişkili olup olmadığını belirlemek üzere yapılan RT-qPCR deneylerinde CTBP1 ve NF2 pre-spliced mRNA düzeyleri de %43, %29 azalmıştır. GSK-J4'ün KDM6 ailesine selektif bir inhibitör olması nedeniyle CTBP1 ve NF2 mRNA ekspresyonlarının hangi KDM6 enzimi tarafından kontrol edildiğini belirlemek amacıyla KDM6A ve/veya KDM6B susturulduğunda; KDM6A ve KDM6B dual inhibisyonunda CTBP1 ve NF2 mRNA düzeyleri %56, %39 azalmıştır.

Sonuç: Özetle; GSK-J4 uygulanmasıyla CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinde saptadığımız azalmaların transkripsiyondaki değişiklikten kaynaklandığı pre-spliced mRNA verilerimizle güçlü bir şekilde desteklenmiştir. KDM6A ve KDM6B'nin her ikisinin de CTBP1 ve NF2 ekspresyonlarının prostat kanserindeki regülasyonunda kontrol edici rollerinin olduğunun gösterilmesi; terapötik olarak hedeflenebilecek, KDM6A ve KDM6B aracılığıyla CTBP1 ve NF2 ekspresyonlarını modüle eden yeni bir mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: CTBP1, NF2, prostat kanseri, epigenetik, KDM6A/B

DOI: 10.5798/dicletip.1086401

Yazışma Adresi / Correspondence: *Gökçe Yıldırım Buharalıoğlu, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye, e-mail: yildirim5559@hotmail.com*

Investigations on KDM6A/B Mediated Epigenetic Regulation of CTBP1 and NF2 Gene Expression in Prostate Cancer Cells

Abstract

Objective: Our aim is to investigate the modulatory role of epigenetic regulators, lysine demethylase 6A (KDM6A) and/or lysine demethylase 6B (KDM6B), on the regulation of C Terminal binding protein1 (CTBP1) and Neurofibromatosis type2 (NF2), which play a role in prostate cancer development and progression.

Methods: LNCaP cells were treated with KDM6 family selective inhibitor, GSK-J4, followed by total RNA isolation and cDNA synthesis. Change in CTBP1 and NF2 mRNA and pre-spliced mRNA levels were measured by RT-qPCR. To identify which KDM6 enzyme is responsible for regulation of CTBP1 and NF2 expression individually, changes in mRNA levels of aforementioned genes were measured by RT-qPCR in KDM6A and/or KDM6B (KDM6A/B) silenced cells via small interfering RNA (siRNA) mediated silencing.

Results: CTBP1 and NF2 mRNA levels were decreased by 45% and 49% with GSK-J4. CTBP1 and NF2 pre-spliced mRNA levels, which are surrogate marker of transcriptional rate, were also shown to be decreased by 43% and 29%, respectively with GSK-J4. Our data obtained from siRNA mediated silencing of KDM6A/B demonstrated that CTBP1 and NF2 mRNA levels were decreased by 56% and 39%, respectively by dual inhibition of KDM6A and KDM6B.

Conclusion: Our pre-spliced mRNA data strongly supported that the reductions in mRNA levels by GSK-J4 were caused by the changes in transcriptional rate. Demonstration of both KDM6A and KDM6B controlling roles in the regulation of CTBP1 and NF2 levels has contributed to elucidating a novel therapeutically targetable mechanism that modulates CTBP1 and NF2 expressions via KDM6A and KDM6B in prostate cancer.

Keywords: CTBP1, NF2, prostate cancer, epigenetic, KDM6A/B

GİRİŞ

Prostat kanseri sadece genetik değil epigenetik değişiklikler sonucunda ortaya çıkan kompleks ve heterojen bir hastalıktır[1-3]. Epigenetik, orijinal tanımıyla, DNA sekansında değişiklik olmadan kromatin yapısında meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak ifade edilir[4,5]. Tümör oluşumunun erken evrelerinde başlayan ve hastalığın progresyonu boyunca devam eden epigenetik değişikliklerin katkıda bulunduğu prostat kanseri "epigenetik katastrof" olarak tanımlanmaktadır[6,7]. Epigenetik regülasyon mekanizmalarından biri olan post translasyonel histon modifikasyonlarının kanser hücrelerindeki değişimi; ilgili histon modifiye edici enzimlerin ekspresyonları veya aktivitelerindeki değişimler ile ilişkilendirilmiştir[2]. KDM6A ve KDM6B enzimleri ise gen ekpresyonunda baskılanmaya neden olan post translasyonel modifikasyonlardan histon3 lizin27 trimetilasyonunu (H3K27met3) azaltarak ilgili genin ekspresyonunda artışa neden olan histon demetilaz enzimleridir[8].

CTBP1 çeşitli kanser tiplerinde rol oynadığı bilinen transkripsiyonel bir ko-represördür[9-11]. CTBP1'in metastatik prostat kanserinde aşırı eksprese edildiği, susturulmasının prostat kanseri hücrelerinde bazı tümör ve metastaz baskılayıcı genlerin ekspresyonunu aktive ettiği, proliferasyonu ve invazyonu inhibe ettiği ve prostat kanseri hücrelerinin radyasyon tedavisine duyarlılığının sağlanmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiş[12] ve CTBP1 ekspresyonunu regüle eden mekanizmaların aydınlatılmasının prostat kanseri progresyonu için fonksiyonel önem taşıyan bir terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir. NF2 ise farklı kanser tiplerinde rol oynadığı bilinen bir tümör baskılayıcı gendir[13]. NF2'nin prostat kanserindeki rolünü inceleyen literatürde yer alan son derece sınırlı sayıdaki çalışmalardan birinde tümör baskılayıcı gen NF2'nin genetik veya epigenetik mekanizmalar aracılı inaktivasyonunun hastalığın daha agresif evrelere ilerlemesine katkıda bulunduğu

bildirilmiş[14] ve NF2'yi regüle eden yeni mekanizmaların aydınlatılmasının yeni kemoterapötik yaklaşımlar açısından önemli olduğu belirtilmiştir.

Bu bağlamda; epigenetik değişikliklerin geri dönüşlü (reversibl) dinamik değişiklikler olduğu, farmakolojik olarak hedeflenebilen histon modifiye edici enzimler tarafından regüle edildikleri ve genetik değişikliklerden önce meydana gelmeleri nedeniyle hastalık etiyolojisine daha yakın oldukları göz önüne alındığında; prostat kanseri oluşumu ve progresyonunda rol oynayan CTBP1 ve NF2 gen ekspresyonlarının KDM6A/B aracılı epigenetik regülasyonunun araştırılması çalışmanın ana hedefini oluşturmaktadır.

YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

Çalışmada prostat kanseri lenf nodu metastatik hücre hattı LNCaP kullanılmıştır. Çalışma ticari olarak tedarik edilebilen hücre hatlarından LNCaP hücre hattında gerçekleştirildiği için etik kurul onayı gerektirmemektedir. Hücre kültürü %10 fetal sığır serumu (FBS, (GIBCO, katalog no: 10270098)), %1 L-glutamin (GIBCO, katalog no: 25030024), %1 penisilin-streptomisin (GIBCO, katalog no: 15140122) eklenmiş RPMI-1640 (GIBCO, katalog no: 21875034)[15] medyumunda %5 CO_2 sağlanan 37 °C inkübatörde yapılmıştır. Pasajlama işlemi rutin olarak hücrelerin Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, (GIBCO, katalog no: 14190094) ile yıkanmasından sonra Tripsin-EDTA (GIBCO, katalog no: 25200056) uygulanması sonrasında yeni kültür kabına ekilmeleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan KDM6 ailesi selektif inhibitörü GSK-J4[16] stokları üretici firmanın direktiflerine uygun olarak DMSO içinde hazırlanmıştır. Kontrol grubundaki LNCaP hücrelerine DMSO (%0,1), inhibitör uygulanan hücrelere ise optimizasyon çalışmaları (veri gösterilmedi) ile belirlediğimiz 30 µM GSK-J4[16] 18 saat süreyle uygulanmıştır.

RNA İzolasyonu, cDNA sentezi, RT-qPCR (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

İnkübasyon sürelerinin sonunda en az üç biyolojik replikadan toplanan örneklerden RNeasy Mini Kit (QIAGEN, katalog no: 74104) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda total RNA izolasyonu yapılmış ve RNA örneklerinin konsantrasyonları Nanovette (Beckman Coulter) cihazında ölçülmüştür. 100 ng RNA örneği QuantiTect Reverse Transcription Kiti (QIAGEN, katalog no: 205311) kullanılarak üreticinin direktiflerine uygun şekilde cDNA'ya çevrilmiştir. cDNA örnekleri LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix'i ve Tablo I'de gösterilen dizayn ettiğimiz primer setleri kullanılarak LightCycler® 480 Real-Time PCR System cihazında amplifiye edilmiştir. Çalışmamızda yer alan bütün PCR verileri housekeeping gen olarak kullandığımız 36B4'e göre normalize edilerek sunulmuştur. Her gen için rölatif ekspresyon düzeylerindeki değişiklik $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır[17].

Tablo I: Çalışmada kullanılan RT-qPCR primer listesi

Primer adı	5'-3' yönünde primer dizisi	
CTBP1	forward	CGCAGTCCACGCAGGAGATCCA
	reverse	CGATGATGCGGAGGGCTTTGAACT
Pre-spliced CTBP1	forward	ATGGTCAAACTGAGGCACAGAGGC
	reverse	CGTAGAAGAGCACGTTGAAGCCGA
NF2	forward	AGAGGAAGCAACCCAAGACGTTCA
	reverse	GGCCAAGAAGTGAAAGGTGACTGG
Pre-spliced NF2	forward	TGTCCCATCTCAGTGTTCAAGGCA
	reverse	CCAGAAGTTTTGCCTCCTCCTCGG
36B4	forward	GCCAGCGAAGCCACGCTGCTGAAC
	reverse	CGAACACCTGCTGGATGACCAGCCC

siRNA Aracılı Gen Susturumu

LNCaP hücreleri 24 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna yaklaşık olarak $6x10^4$ hücre olacak yoğunlukta ekildikten sonra gece boyunca inkübatörde inkübe edilmiştir.

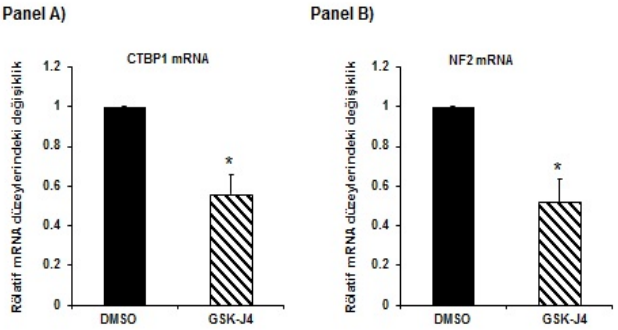
Ardından yaptığımız validasyon çalışmalarına (veri gösterilmedi) göre KDM6A veya KDM6B düzeylerini anlamlı olarak azalttığını belirlediğimiz optimum transfeksiyon koşulları gereği LNCaP hücreleri üretici firmanın direktiflerine uygun şekilde Lipofectamine 2000 Transfeksiyon Reajanı kullanılarak her bir siRNA'dan 20 pmol olacak şekilde siNegatif kontrol (Ambion, Silencer TM Select Negative Control No.1, katalog no: 4390843), siKDM6A (Ambion, si oligo ID: s14736, 5' GCAUUGUGAAAGUAAUAGAtt 3') ve/veya siKDM6B (Ambion, si oligo ID: s23109, 5' UCCUGUUCGUGACAAGUGAtt 3') ile transfekte edilerek 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler toplanarak yukarıda belirtildiği şekilde total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR yapılarak rölatif CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerindeki değişiklikler ölçülmüştür.

İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında yapılan bütün deneylerde birbirinden bağımsız 3 biyolojik replikadan gelen hücreler ile yapılan 3 deneysel tekrara (n=3) ait deney verileri GraphPad Prism istatistiksel analiz programı kullanılarak ortalama ± ortalamanın standart hatası verilerek sunulmuştur. Verilerin istatistiksel analizi veri setine uygun olarak seçilen unpaired t test veya one way ANOVA sonrası Dunnett post testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılıklar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ olarak gösterilmiştir.

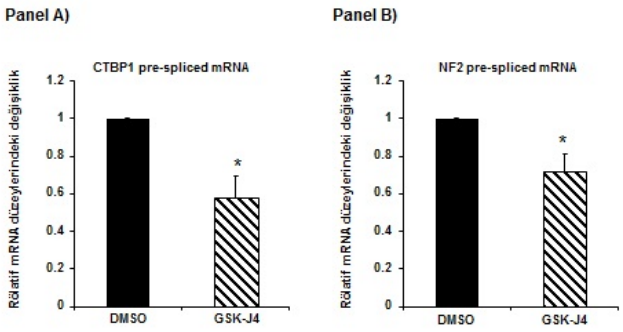
BULGULAR

KDM6 ailesi üyeleri KDM6A ve KDM6B'nin demetilaz aktivitelerini inhibe ederek fonksiyonel rollerini araştırmak üzere dizayn edilmiş KDM6 ailesi (KDM6A ve KDM6B) selektif inhibitörü GSK-J4 ile CTBP1 ve NF2 rölatif mRNA düzeylerinde meydana gelen değişiklikleri ölçmek amacıyla GSK-J4 uygulanan LNCaP hücrelerinden sırasıyla total RNA izolasyonu, cDNA sentezi yapılmış, ardından Tablo I'de gösterilen primerler kullanılarak RT-qPCR deneyleri yapılmıştır. GSK-J4 uygulaması ile CTBP1 rölatif mRNA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde %45 (Şekil 1, Panel A), rölatif NF2 mRNA düzeyleri ise %49 azalmıştır (Şekil 1, Panel B).



Şekil 1: GSK-J4 rölatif CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinde kontrol grubu DMSO'ya göre GSK-J4 ile meydana gelen rölatif değişikliği göstermek amacıyla grafiklerde DMSO örneklerinin düzeyi "1" olarak gösterilmiş ve GSK-J4 örnekleri buna göre kıyaslanarak verilmiştir. Veriler ± ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur (n=3). P değerleri unpaired t test uygulanarak hesaplanmıştır. * $p< 0.05$ kontrol grubu olarak kullanılan DMSO ile karşılaştırıldığında.

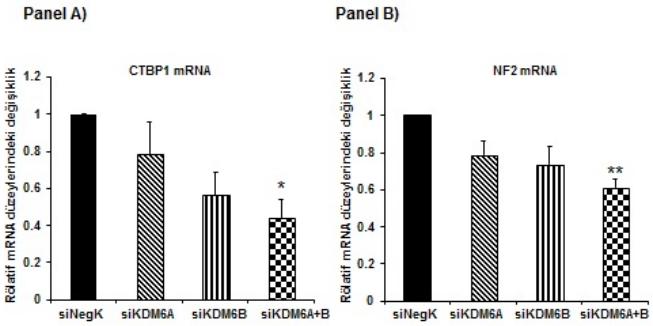
Rölatif mRNA düzeylerinde (steady state mRNA) saptadığımız azalmaların transkripsiyonel baskılanmayla ilişkili olup olmadığını test etmek üzere ise transkripsiyonel sentezdeki değişikliği yansıtan belirteçlerinden biri olan pre-spliced mRNA[18] düzeylerindeki rölatif değişiklikler her iki gen için dizayn ettiğimiz Tablo I'de gösterilen ilgili pre-spliced primerleri kullanılarak RT-qPCR ile ölçülmüştür. Rölatif CTBP1 pre-spliced mRNA düzeyleri GSK-J4 uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde %43 azalırken (Şekil 2, Panel A), NF2 pre-spliced mRNA düzeyleri %29 (Şekil 2, Panel B) azalmıştır.



Şekil 2: GSK-J4 rölatif CTBP1 ve NF2 pre-spliced mRNA düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. CTBP1 ve NF2 pre-spliced mRNA düzeylerinde kontrol grubu DMSO'ya göre GSK-J4 ile meydana gelen rölatif değişikliği göstermek amacıyla grafiklerde DMSO örneklerinin düzeyi "1" olarak gösterilmiş ve GSK-J4 örnekleri buna göre kıyaslanarak verilmiştir. Veriler ± ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur (n=3). P değerleri unpaired t test uygulanarak hesaplanmıştır. * p< 0.05 kontrol grubu olarak kullanılan DMSO ile karşılaştırıldığında.

GSK-J4'ün KDM6A ve KDM6B'nin üyesi oldukları KDM6 ailesine selektif bir inhibitör olarak dizayn edilmiş[16] olması sebebiyle mRNA ve pre-spliced mRNA düzeylerinde GSK-J4 tarafından regüle edildiğini gösterdiğimiz (Şekil 1, Şekil 2) CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinin KDM6 ailesi üyeleri KDM6A ve KDM6B enzimlerinin hangisi tarafından regüle edildiğini belirlemek amacıyla KDM6A ve KDM6B'nin siRNA aracılı gen susturumu yoluyla tek başına ve birlikte susturulduğu örneklerde rölatif CTBP1 ve NF2 mRNA ekspresyonu düzeylerindeki değişiklikler RT-qPCR ile ölçülmüştür.

KDM6A veya KDM6B'nin siRNA aracılı olarak susturulduğu hücrelerde rölatif CTBP1 mRNA düzeylerinde azalma yönünde eğilim gözlenmekle birlikte istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Şekil 3, Panel A). Ancak KDM6A ve KDM6B'nin birlikte susturulduğu koşullarda CTBP1 mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde %56 azalmıştır. CTBP1 mRNA düzeylerindeki değişim paternine benzer şekilde KDM6A veya KDM6B'nin siRNA aracılı olarak ayrı ayrı susturuldukları örneklerde rölatif NF2 mRNA ekspresyon düzeylerinde düşüş yönünde eğilim gözlenmekle birlikte istatistiksel anlamlılığa ulaşmazken; KDM6A ve KDM6B'nin dual inhibisyonunda rölatif NF2 mRNA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde %39 azalmıştır (Şekil 3, Panel B).



Şekil 3: CTBP1 ve NF2 mRNA ekspresyonları LNCaP'lerde KDM6A ve KDM6B tarafından regüle edilmektedir. CTBP1 ve NF2 rölatif mRNA düzeylerinde kontrol grubu siNegatif Kontrol'e (siNegK) göre siKDM6A ve/veya siKDM6B ile transfekte edilen örneklerde meydana gelen rölatif değişiklikleri göstermek amacıyla grafiklerde siNegK örneklerinin düzeyi "1" olarak gösterilmiş ve siKDM6A ve/veya siKDM6B ile transfekte edilen örneklerdeki düzey buna göre kıyaslanarak verilmiştir. Veriler ± ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur (n=3). P değerleri one-way ANOVA sonrası Dunnett post-testi kullanılarak hesaplanmıştır. * p< 0.05, ** p< 0.01 kontrol grubu olarak kullanılan siNegK ile karşılaştırıldığında.

TARTIŞMA

Epigenetik mekanizmalar kanser oluşumu ve progresyonuna mutasyonlar ile birlikte katkıda bulunmaktadır. Bugüne kadar farklı epigenetik mekanizmaları inhibe ederek etki gösteren altı ilaç (DNA metil transferaz inhibitörleri; Azasitidin ve Desitabin, Histon Deasetilaz inhibitörleri; Romidepsin, Panobinostat, Belinostat ve Vorinostat) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından hematolojik kanserlerin tedavilerinde kullanılmak üzere onaylanmıştır[19]. Kanser oluşumuna katkıda bulunan epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasının yeni ilaç ve tedavilerin bulunması açısından son derece önemli olduğu açıktır. Prostat kanserinde rol oynadığı önceki çalışmalarda gösterilen CTBP1 ve NF2

genlerinin ekspresyonlarının regülasyonunda epigenetik regülatörlerden KDM6A ve/veya KDM6B'nin rolünü araştırdığımız çalışmada, KDM6 ailesi selektif inhibitörü GSK-J4 ile CTBP1 ve NF2 mRNA ve pre-spliced mRNA düzeylerinin azaldığı ve bu genlerin ekspresyonlarının KDM6A ve KDM6B tarafından birlikte kontrol edildikleri gösterilmiştir. Bu veriler ileri çalışmalar ile desteklenmek suretiyle prostat kanseri tedavisinde kullanılabilecek epigenetik ilaçların bulunmasına katkı sağlayıcı olabilir.

CTBP1 aşırı-ekspresyonunun pro-tümörojenik olarak değerlendirildiği birçok kanser türünde hücrelerin malign davranışlarıyla ilişkili genlerin transkripsiyonel regülasyonlarındaki rolleri nedeniyle CTBP1; kanseri karakterize eden birçok süreçle ilişkilendirilmiştir[20]. Bu bağlamda günümüze kadar yapılan çalışmalarda CTBP1 aşırı-ekpresyonunun ilişkilendirildiği en iyi anlaşılmış mekanizmaların hücre ölümünden kaçış, artan epitelyal mezenkimal geçiş, proliferasyona yol açma ve hücre büyümesinin baskılanmasından kaçış olduğu bildirilmiştir[20]. CTBP1'in prostat kanserinde aşırı-eksprese edildiği farklı çalışmalarda rapor edilmiştir[12,21]. CTBP1'in prostat kanserindeki rolünü aydınlatmaya yönelik yapılmış çalışmalardan birinde metastatik prostat kanserinde aşırı-eksprese edilen CTBP1'in susturulduğu prostat kanseri hücrelerinin proliferasyon ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve yapılan ekspresyon profili çalışmalarında birçok tümör baskılayıcı genin ekspresyonunun CTBP1 tarafından baskılandığı bildirilmiştir[12]. Bir diğer çalışmada ise CTBP1 aşırı-ekspresyonunun hücre adezyonunu büyük olasılıkla kadherinler, integrinler gibi adezyon moleküllerini baskılamalarına bağlı olarak azalttığı bildirilmiştir[22]. Bu çalışmalardan CTBP1'in prostat kanseri progresyonunda önemli rol oynadığının anlaşılması CTBP1 ekspresyonunun regülasyon mekanizmalarının araştırılması gerekliliğini de beraberinde getirmiştir. Bu bağlamda gastrik kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada; CTBP1'in mikroRNA'lardan miR-539-3P'nin doğrudan hedefi olduğu ve yüksek CTBP1 ekspresyonunun epitelyal mezenkimal geçişe yol açarak gastrik karsinom progresyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiş ve CTBP1'in miR-539-3P aracılı epigenetik regülasyonun teşhis ve tedavi açısından potansiyel önem taşıdığı belirtilmiştir[23]. Ancak bildiğimiz kadarıyla literatürde CTBP1 ekspresyonunun prostat kanserindeki epigenetik regülasyon mekanizmalarını araştırmış bir çalışma bulunmamaktadır, bu nedenle CTBP1 ekspresyonunun KDM6A/B enzimleri aracılı epigenetik regülasyon mekanizmasının aydınlatılmasını sağlayan çalışmamız bu açıdan katkı sağlayabilir.

NF2 geni tarafından kodlanan Merlin proteini kontakt-bağımlı proliferasyonun önemli regülatörlerindendir ve serin-518 rezidüsünden fosforilasyonunun Merlinin hücre büyümesini baskılayıcı fonksiyonunu inaktive ettiği gösterilmiştir[24]. Prostat kanserinde NF2 inaktivasyonunun kanserin daha invaziv ve kemorezistan evreye progresyonuna, Merlinin prostat kanseri hücre hatlarında yokluğu veya inaktivasyonunun tümör gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir[13]. NF2'nin en iyi karakterize edildiği santral sinir sisteminin benign tümörlerinden schwannomda yapılan bir çalışmada mutasyonel NF2 inaktivasyonunun NF2 ilişkili schwannomlar ve sporadik schwannomların çoğunun nedeni olmakla birlikte; NF2'nin transkripsiyonel inaktivasyonunun NF2 ilişkili schwannomların %15,3'ü, sporadik schwannomların ise %19,3'ünün nedeni olduğu bildirilmiştir[25]. NF2 ekspresyonunu regüle eden moleküler mekanizmaların ve NF2 gen ekspresyonunun mutasyon veya epigenetik değişiklikler ile down-regüle edilip edilmediğinin araştırıldığı

bir çalışmada; vestibular schwannomların yaklaşık olarak %60'ında NF2 promotorunda üç CpG bölgesinin metile olduğu ve bu durumun azalan promotor aktivitesi ve mRNA ekspresyonu ile korele olduğu gösterilmiştir[26]. Oldukça agresif tümörlerden malign mezotelyomalıların %40'ında Merlin fonksiyonel aktivitesini ortadan kaldıran NF2 genetik bozuklukları saptanmış ve NF2'yi inaktive eden mekanizmaların araştırılmasının gerekliliği vurgulanmıştır[27]. Bir diğer çalışmada ise kolorektal kanser hücrelerinde NF2 ekspresyonunun azaldığı, NF2 aşırı-ekspresyonunun ise kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir[28]. NF2/Merlin inaktivasyonun farklı kanser türlerindeki rolü dikkate alındığında; kanser teşhisi, progresyonu ve tedavi açısından taşıdığı potansiyel nedeniyle NF2 ekspresyonunu regüle eden yeni moleküler mekanizmaların aydınlatılmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

Şekil 1, Panel A ve Panel B'de sunulan verilerimize göre rölatif CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinin KDM6 ailesi selektif inhibitörü GSK-J4 ile azaldığının gösterilmesi; KDM6 ailesi üyeleri KDM6A ve/veya KDM6B'nin CTBP1 ve NF2 mRNA ekspresyonunun regülasyonuna katkıda bulunduğu yönünde veri sağlamıştır. Bununla birlikte rölatif mRNA düzeylerinde saptanan bu azalmaların CTBP1 ve NF2 ekspresyonlarının transkripsiyonel inhibisyonuna bağlı olarak ortaya çıkıp çıkmadığını tespit edebilmek için söz konusu genlerin pre-spliced mRNA[18] düzeylerindeki değişiklikler ölçülmüştür. RT-qPCR ile ölçülen mRNA düzeyleri (steady state mRNA) temel olarak sentez (transkripsiyon) ve degradasyon olmak üzere iki parametre tarafından belirlendiği için[29] ölçülen değişiklikler her zaman transkripsiyondaki değişikliği yansıtmayabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda mRNA düzeylerindeki değişikliklere ek olarak pre-spliced mRNA düzeylerindeki değişiklikler ölçülmüştür[30]. Şekil 2 Panel A ve Panel B'de sunulan verilerimize göre CTBP1 ve NF2 pre-spliced mRNA düzeylerindeki değişikliklerin Şekil 1 Panel A ve Panel B'de sunulan CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerindeki değişiklikler ile azalma yönünde benzer patern çizdiği görülmektedir. Bu nedenle Şekil 1 ve Şekil 2'de sunulan verilerimize göre CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinde GSK-J4 ile meydana gelen azalma yönündeki değişikliklerin en azından kısmen transkripsiyondaki değişiklikten kaynaklandığı güçlü bir şekilde desteklenmektedir.

CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinin GSK-J4 ile transkripsiyonel inhibisyona bağlı olarak azaldığının gösterilmesinin ardından; GSK-J4'ün KDM6 ailesine selektif bir inhibitör olarak dizayn edilmiş olması nedeniyle hem GSK-J4 ile Şekil 1'de elde ettiğimiz verilerin validasyonu hem de CTBP1 ve NF2 mRNA ekspresyonlarının selektif olarak KDM6 enzimlerinden hangisi tarafından regüle edildiğini belirlemek amacıyla KDM6A ve/veya KDM6B'nin siRNA aracılı olarak susturulduğu örneklerde rölatif CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerindeki değişiklikler ölçülmüştür. Şekil 3 Panel A ve Panel B'de sunulan verilerimize göre rölatif CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinin her ikisinin de KDM6A ve KDM6B'nin dual inhibisyonu ile azalması, bu genlerin regülasyonunun hem KDM6A hem KDM6B bağımlı olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile CTBP1 ve NF2 mRNA düzeylerinin kromatin modifiye edici enzimlerden KDM6A/B aracılı epigenetik regülasyon mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlanarak; prostat kanseri progresyonundaki rolü önceki çalışmalarda gösterilen bu genlerin ekspresyonlarını kontrol eden, promotor düzeyinde yapılacak ileri çalışmalar ile desteklenmek koşuluyla antineoplastik olarak hedeflenebilecek yeni bir mekanizma aydınlatılmıştır.

Etik Kurul Kararı: Çalışma ticari olarak tedarik edilebilen hücre hatlarından LNCaP hücre hattında

gerçekleştirildiği için etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazar çıkar çatışması olmadığını bildirmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma 118S151 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The author declares that there is no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study is supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) [Grant Number 118S151].

KAYNAKLAR

1. Jerónimo C, Bastian PJ, Bjartell A, et al. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. Eur Urol. 2011; 60: 753-66.

2. Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Ramalho-Carvalho J, et al. Deregulated expression of selected histone methylases and demethylases in prostate carcinoma. Endocr Relat Cancer. 2014; 21: 51-61.

3. Graça I, Pereira-Silva E, Henrique R, et al. Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer. Clin Epigenetics. 2016; 8: 1-24.

4. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007; 128: 683-92.

5. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2010; 31: 27-36.

6. He W, Zhang MG, Wang XJ, et al. KAT5 and KAT6B are in positive regulation on cell proliferation of prostate cancer through PI3K-AKT signaling. Int J Clin Exp Pathol. 2013; 6: 2864-71.

7. Chinaranagari S, Sharma P, Bowen NJ, Chaudhary J. Prostate cancer epigenome. Methods Mol Biol. 2015; 1238: 125-40.

8. Agger K, Cloos PA, Christensen J, et al. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. Nature. 2007; 449: 731-4.

9. Deng Y, Deng H, Liu J, et al. Transcriptional down-regulation of Brca1 and E-cadherin by CtBP1 in breast cancer. Mol Carcinog. 2012; 51: 500-7.

10. Dorman K, Shen Z, Yang C, Ezzat S, Asa SL. CtBP1 interacts with Ikaros and modulates pituitary tumor cell survival and response to hypoxia. Mol Endocrinol. 2012; 26: 447-57.

11. Kuppuswamy M, Vijayalingam S, Zhao LJ, et al. Role of the PLDLS-binding cleft region of CtBP1 in recruitment of core and auxiliary components of the corepressor complex. Mol Cell Biol. 2008; 28: 269-81.

12. Wang R, Asangani IA, Chakravarthi BV, et al. Role of transcriptional corepressor CtBP1 in prostate cancer progression. Neoplasia. 2012; 14: 905-14.

13. Petrilli AM, Fernández-Valle C. Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. Oncogene. 2016; 35: 537-48.

14. Malhotra A, Shibata Y, Hall IM, Dutta A. Chromosomal structural variations during progression of a prostate epithelial cell line to a malignant metastatic state inactivate the NF2, NIPSNAP1, UGT2B17, and LPIN2 genes. Cancer Biol Ther. 2013; 14: 840-52.

15. Erzurumlu Y, Ballar P. Androgen Mediated Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and its Effects on Prostate Cancer. Sci Rep. 2017; 7: 1-12.

16. Kruidenier L, Chung C, Cheng Z, et al. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. Nature. 2012;488:404-408.

17. Yildirim-Buharalioglu G, Bond M, Sala-Newby GB, Hindmarch CC, Newby AC. Regulation of Epigenetic Modifiers, Including KDM6B, by Interferon-gamma and Interleukin-4 in Human Macrophages. Front Immunol. 2017; 8: 1-18.

18. Elferink CJ, Reiners JJ, Jr. Quantitative RT-PCR on CYP1A1 heterogeneous nuclear RNA: a surrogate for the in vitro transcription run-on assay. Biotechniques. 1996; 20: 470-7.

19. Ghasemi S. Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? Pharmacogenomics J. 2020; 20: 367-79.

20. Blevins MA, Huang M, Zhao R. The Role of CtBP1 in Oncogenic Processes and Its Potential as a Therapeutic Target. Mol Cancer Ther. 2017; 16: 981-90.

21. Moiola CP, De Luca P, Zalazar F, et al. Prostate tumor growth is impaired by CtBP1 depletion in high-fat diet-fed mice. Clin Cancer Res. 2014; 20: 4086-95.

22. Dalton GN, Massillo C, Scalise GD, et al. CTBP1 depletion on prostate tumors deregulates miRNA/mRNA expression and impairs cancer progression in metabolic syndrome mice. Cell Death Dis. 2019; 10: 1-12.

23. Zhou J, Su M, Zhang H, Wang J, Chen Y. miR-539-3P inhibits proliferation and invasion of gastric cancer cells by targeting CTBP1. Int J Clin Exp Pathol. 2019; 12: 1618-25.

24. Horiguchi A, Zheng R, Shen R, Nanus DM. Inactivation of the NF2 tumor suppressor protein merlin in DU145 prostate cancer cells. Prostate. 2008; 68: 975-84.

25. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, et al. CpG island methylation in sporadic and neurofibromatis type 2-associated schwannomas. Clin Cancer Res. 2003; 9: 5601-6.

26. Kino T, Takeshima H, Nakao M, et al. Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. Genes Cells. 2001; 6: 441-54.

27. Sato T, Sekido Y. NF2/Merlin Inactivation and Potential Therapeutic Targets in Mesothelioma. Int J Mol Sci. 2018; 19: 1-18.

28. Wu X, Mao F, Li N, et al. NF2/Merlin suppresses proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells. Front Biosci (Landmark Ed). 2020; 25: 513-25.

29. Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. Nat Immunol. 2009; 10: 281-8.

30. De Santa F, Narang V, Yap ZH, et al. Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. Embo j. 2009; 28: 3341-52.