

KANSER HÜCRELERİNDE ER STRESİ VE OTOFAJİK YOLAKLARDAKİ GENLERİN EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Comparison of Epigenetic Changes of Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagic Pathways in Various Cancer Cell Lines

Nazmi ÖZGEN¹  Şengül YÜKSEL² 

¹İnönü Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Malatya

²İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Malatya

Geliş Tarihi / Received: 06.09.2024

Kabul Tarihi / Accepted: 28.01.2025

ÖZ

Post translasyonel modifikasyonların gerçekleştiği endoplazmik retikulumda (ER) işlenmiş protein yükü ile protein katlanma kapasitesi arasındaki dengenin bozulması sonucu, adaptif ER stresi oluşur ve otofajinin aktif olması beklenir. ER stresi ve otofajik bozuklukların kanser ile ilişkisi belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada çeşitli kanser hücrelerinde bu yollardaki anahtar genlerdeki metilasyon değişikliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada çeşitli kanser hücrelerinde (HepG2, MCF-7) ve sağlıklı hücrelerdeki (MCF-10A) ilgili genlerin metilasyon düzeyleri RT-PZR tekniği ile araştırıldı. Çalışmamızda MCF7 hücrelerinde ER stresi genlerinden MAP3K5, ATF6 ve MAOA'nin DNA metilasyon düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı XBP1 ve EIF2AK3 genlerinde ise arttığı belirlendi. HEPG2 hücrelerinde ise MAP3K5, EIF2AK3 ve MAOA genlerinde hipometilasyon saptandı. Otofaji yolağı genlerinden ise sadece GBA geninde her iki hücrede anlamlı hipometilasyon olduğu belirlendi. Bu sonuçlarla, kanser hücrelerinde ER stresi ve otofajik yollardaki çoğu protein genlerinin epigenetik olarak aktivitelerinin değiştirildiği böylece hücrelerin transformasyon sürecini hızlandırıldığı söylenebiliriz.

Anahtar kelimeler: DNA Metilasyonu, ER stresi, HepG2, Kanser, Otofaji, MCF-7, MCF-10A.

ABSTRACT

Disruption of the balance between processed protein load and protein folding capacity in the endoplasmic reticulum (ER), where post-translational modifications occur, results in the occurrence of adaptive ER stress, leading to the expectation of active autophagy. The relationship between ER stress and autophagic dysfunctions with cancer remains uncertain. The aim of this study is to investigate methylation changes in key genes in various cancer cells within these pathways. In this study, methylation changes in some major genes involved in ER stress and autophagic pathways were investigated in various cancer cells (HepG2, MCF-7) and healthy cells (MCF-10A) using the RT-PCR technique. Our study found that in MCF7 cells, the DNA methylation levels of ER stress genes MAP3K5, ATF6, and MAOA significantly decreased, while they increased in the XBP1 and EIF2AK3 genes. In HEPG2 cells, hypomethylation was detected in MAP3K5, EIF2AK3, and MAOA genes. Only GBA gene showed significant hypomethylation in both cells among autophagy pathway genes. With these results, it can be speculated that the epigenetic activities of most protein genes in ER stress and autophagic pathways are altered in cancer cells, thus accelerating the transformation process of cells.

Key words: Autophagy, Cancer, DNA Methylation, ER stress, HepG2, MCF-7, MCF-10A.

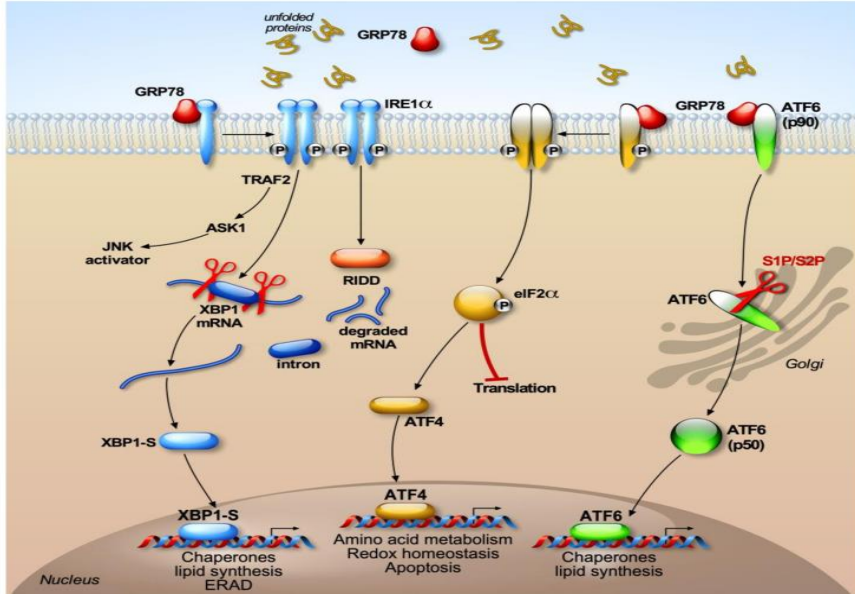
GİRİŞ

Hücrelerin çoğalma, gelişim, farklılaşma ve ölümü genlerle düzenlenen ve yönetilen biyolojik süreçlerdir. Kanser, moleküler seviyede hücrelerin kontrolsüz çoğalımı ve yayılımı ile seyreden bir dizi hastalıktır. Genlerdeki mutasyonel veya epigenetik değişimler hücre fonksiyonları bozarak hücre transformasyonuna yol açmaktadır. Epigenetik değişimler, DNA dizisinde yapısal bir değişim olmaksızın, gen ifadesinin susturulması veya aktivite hızının değişmesi yoluyla meydana gelir ve kanser oluşumunda mutasyonlar kadar etkilidir (Gu, Ren, Fang vd., 2024). Bu değişimler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin değişimleri ve bazı kodlanmayan RNA türlerinin varlığında şekillenir (Bhootra, Jill, Shanmugam, Rakshit, Sarkar vd., 2023). DNA metilasyonu tüm canlılarda sıklıkla görülen bir epigenetik modifikasyondur. Replikasyon aşamasında sitozin bazına DNA metiltransferaz enzimleri aracılığıyla eklenen metil grubu gen susturma mekanizması olarak bilinir. CpG dinükleotidlerinde meydana gelen hipermetilasyon, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını bloke ederek veya okuma yapan enzimlerin okumasını engelleyerek gen transkripsiyon aktivitesini inhibe edebilir. DNA molekülündeki metilasyon profilleri dokuya özgü bir özellik gösterirken farklı hücrelerdeki metilasyon profillerinin işleyişleri de farklıdır (Güler ve Peynircioğlu, 2016).

Endoplazmik retikulum (ER), ribozomlardan yönlendirilen proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarının gerçekleştiği ve orijinal katlanmalarının yapıldığı ağı yapıda bir organeldir. ER'de gerçekleşen protein modifikasyon ve katlanma işleyişindeki hatalar yanlış katlanmış protein birikimine neden olup ER stresine yol açar. ER stresi baş edebilir durumda ise ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) sistemi ile hatalı veya katlanmamış proteinler ortadan kaldırılır. Baş edemediği durumda ise katlanmamış protein tepkisi olan UPR (unfolded protein response) sinyal kaskadı devreye girer. Protein homeostazisi sağlanamaz ise hücre apoptoza yönlendirilir (Robinson, Duggan ve Forrester, 2024). Stres mekanizmasına yanıt olarak bir dizi karmaşık sinyal yolu ile katlanmamış proteinlerin birikiminin azaltılması hedeflenir (Costa, Manaa, Duplan vd., 2020).

UPR sistemi 3 ana yolak üzerinden çalışır. Bunlar: 1. Protein kinaz RNA benzeri ER Kinaz (PERK) 2. IRE1 İnositol düzenleyici enzim 1 (IRE) ve 3. Aktive edici transkripsiyon faktör 6 (ATF6) yolaklarıdır (Şekil 1). Bu yolakların her biri spesifik genler üzerinden ER stresine yanıt verirken birbirleriyle de yakın bağlantılı çalışırlar. ER lümeninde hatalı katlanmış ve birikmiş proteinler ER iç membran yüzeyinde lokalize olmuş şaperon üyesi olan

immünoglobulin bağlayıcı protein (BiP) tarafından bağlanarak bu üç yolak proteinlerine sunulurlar (Costa, Manaa, Duplan vd., 2020).



Şekil 1. UPR Sinyal Yolakları (Costa, Manaa, Duplan vd., 2020)

Bu yollardaki protein genlerinin hiperaktivasyonu veya inaktivasyonu kanser dahil çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ve bazı metabolik hastalıkların etyopatolojisinde önemli rol oynamaktadır (Tatar ve Tatar, 2019).

Otofaji, metabolik stres ya da besin eksikliği esnasında hasarlı organellerin ve proteinlerin geri dönüşümünü sağlayarak hücreli biyosentezin devam etmesini sağlayan katabolik süreçtir. Otofajik anomaliler enfeksiyonel hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda önemli role sahiptir (Kwantwi, 2024). Otofaji kanserde iki role sahiptir. Birincisi, tümör baskılayıcı olarak hasarlı proteinlerin ve organellerin birikmesini engellemek, ikincisi ise hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktır (White, 2015). ER stres yolları ile otofajik reaksiyonlar yakın ilişkili çalışırlar. Bazı çalışmalarda ER stresi şartlarında PERK yolağı proteinlerinden eIF2 α 'ın aktivasyonunun otofajiyi tetiklediği bildirilmiştir (Hart, Cunningham, Datta vd., 2012).

Bu çalışmada, meme ve karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2, MCF-7) protein katlanma mekanizmasıyla ilişkili UPR sisteminin 3 ana yolağındaki ve otofaji ana yollarındaki majör genlerdeki metilasyon ile oluşmuş epigenetik değişiklikler sağlıklı hücre hattı (MCF-10A) ile karşılaştırıldı. Böylece kanser ile ER stresi ve otofajik yollarla ilişkili genlerin epigenetik değişim profilleri ortaya kondu.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

Etidyum Bromid, PBS, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ve EDTA Sigma-Aldrich'ten, DMSO, penicillin/streptomycin ve Fetal Bovine Serum (FBS), Thermo Fisher Scientific'ten ve Trypan Blue Merck'ten satın alındı.

Kitler

Hücre kültürü DNA izolasyon kiti (Dneasy Blood & Tissue Kit) Qiagene'den ve RT PZR için Syber Green (2x with High ROX Syber Green) Ampliqon'dan satın alındı.

Hücre Kültürü

Çalışmada östrojen ve progesteron reseptörü pozitif meme adenokarsinomu hücre hattı (MCF7; ATCC Katalog No: HTB-22) ve sağlıklı meme epitel hücre hattı (MCF10A; ATCC; Katalog No: CRL-10317) ile insan hepatosellüler karsinom hücre dizisi (HepG2; Katalog No: HB-8065) ticari olarak temin edildi.

Besi yeri için %10 FBS, L-glutamin, sodyum-pruvat ve %1 penicilin-streptomisin içeren DMEM hazırlandı. MCF-7 için High Glukoz-DMEM ve HEPG2 için low Glukoz-DMEM besi yerleri oluşturuldu. MCF10A hücreleri için ise 20 ng/ml EGF, 0,5 mg/ml hidrokortizon, 100 ng/ml cholera toksin, 10 mg/ml insülin ile desteklenmiş %5 FBS içeren DMEM/F12 hazırlandı. Hücreler 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatörde kültüre edildi.

Hücre canlılığının tespiti

Hücre canlılığını analiz etmek için 10 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl Tripan mavisi solüsyonu (% 0,25'lik) karıştırılarak (Dilüsyon faktör: 2) Thoma sayım lamına yüklendi. Işık mikroskopunda 100x büyütme de hücreler sayıldı ve canlılık oranı aşağıdaki formüle göre değerlendirildi.

Mililitredeki hücre sayısı: Sayılan hücre sayısı x 2 x 10⁴

Canlı hücre oranı: Boyanmamış hücrelerin sayısı / Toplam hücre sayısı

Hücre canlılık testinden sonra her grup için 3 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde hücre kültürü devam ettirildi. Kolonileşen hücreler kültür ortamından Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Santrifüj sonrası besi yeri uzaklaştırıldı. Yaklaşık 4x10⁶/ml hücre PBS içerisinde süspansiyon edilerek DNA izolasyonuna hazırlandı.

DNA İzolasyonu ve Kontrolü

DNA izolasyonu, uygun kit (Comparison of epigenetic changes of endoplasmic reticulum stress and autophagic pathways in various cancer cell lines, DNeasy Blood ve Tissue Kit) kullanılarak ve protokol doğrultusunda yapıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA molekülünün saflığı ve miktarını tayin etmek için son aşamada kullanılan elüsyon solüsyonu blank olarak kullanıldı. İzolasyondan sonra 1 µl DNA örnekleri alınarak nanodrop'ta konsantrasyonu tayini yapıldı. DNA'ların kalitatif değerlendirilmesi için jel elektroforezinde yürütme işlemi yapıldı. Bunun için %1'lik agaroz içeren, 50 ml Tris-Asetik asit-EDTA tamponunda hazırlanmış ve 0.5 µg/ml EtBr boyası eklenmiş jel kullanıldı. Jel polimerleşmesi sağlandıktan sonra 1 µl DNA binding tamponu ve 5 µl DNA örneği karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. DNA örnekleri 90 Volt 45 dakika yürütüldü. Elektroforez sisteminde DNA fragmentlerinin ayrımı, 1 kb marker DNA fragmenti ile karşılaştırılarak yapıldı. Jel analiz işlemi G:BOX Chemi XRQ 33 (SYNGENE, Cambridge UK) jel görüntüleme sistemi ile gerçekleştirildi. Böylelikle DNA izolasyonunun uygunluğu sonraki aşamalar için kontrol edildi. O.D260 ve O.D280 değerleri baz alınarak 1 µl DNA miktarı nanogram birimi olarak tespit edildi. Kontrol sağlandıktan sonra genomik DNA -20 °C'de saklandı.

Primerlerin elde edilmesi

Çalışmaya konu olan genlerin (ER stresi için: ATF6, XBP1, EIF2AK3, MAP3K5, MAOA ve otofaji için: LRRK2, PRKN, GBA, NDR1) sekansları <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> adresinden bulunduktan sonra promotor bölgeleri belirlendi. Genlerin metilasyon düzeylerini saptamak için metilasyon sensitive restriksiyon enzim bazlı PZR (MSRE-PZR) tekniği uygulandı. Çalışmanın efektif olması için primerler MSRE kesim bölgelerinden en az birini içermelidir. Bu nedenle şu işlemler uygulandı.

1. Hedef bölgeler ve CpG'lerin belirlenmesi UCSC genom tarayıcı ile yapıldı ve FASTA format alındı

2. Primer-3 online programına bu format yüklenerek primerler elde edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Genlerin Bağlanma Bölgelerine Göre Spesifik Primerleri

Primerler	İleri primer	Geri primer
MAP3K5	CTTCTGGAGTGCCACAGTCA	CCCTGAAGCATTCCAGTGT
ATF6	GCCGCTGAAATTTAAAATGG	AAAGTCCAAGCGAGTCTACCC
XBP1	CAAGCAATCTCCCTGCTTC	CTCGGTGGCTCACACTTGTA
EIF2AK3	CTTCTGCTGCTTCGCTTTT	GTCTGCGCTAACTGCCTCTT
MAOA	CAACCTAGTGAGGGCTGGAG	GTGGGCTCTCAACCTAGTGC
LRRK2	CTTTCGGGTGTCCCAAGTA	GGATGGAAAGAGGGGTTAGC

PRKN	CTCGTAGTGCCAGGTTGAT	TTCAGGCCAGCAATCTTAC
GBA	CGCTGCAGAGGAGCCGCACT	AGGATGGCTTCACAGAGGAA
NBR1	CGAGTCTCGGGCAAGTAGTC	GCCATTGATTGGTGGAGATT

MAP3K5 (ASK1): Mitojen-aktive edici protein kinaz, ATF6: Transkripsiyon aktive edici faktör 6, XBP1: X kutusu bağlayıcı protein 1, EIF2AK3: Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör, MAOA: Monoamin oksidaz A, LRRK2: Lösinden zengin tekrarlayan kinaz 2, PRKN: Parkin, GBA: Glukoserebrozidaz, NBR1: BRCA1 komşusu 1

Metilasyon spesifik PZR reaksiyonu öncesinde, çalışmada kullanılacak olan primer çiftlerinin bağlanma sıcaklıkları, önerilen sıcaklık değerinin ± 2 °C aralığında test edilmesinden sonra en iyi CT değerini veren 61 °C optimal sıcaklık olarak belirlendi. Primerlerin kontrolü için DNA oranı 1/10'a kadar seri sulandırmalar ile azaltılıp PZR analizi yapıldı ve azalan DNA miktarına bağlı olarak CT değerinin de azaldığı görüldü.

Metilasyon Spesifik Restriksiyon Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi

Hedef genlerin promotor bölge metilasyon profillerini saptayabilmek için metillenmemiş bölgelerin kesilmesi gerekir. DNA'nın birden fazla enzimle kesilmesi spesifikliği artırır. Bu nedenle çalışmada Acil, HpaII ve Hin6I restriksiyon enzimleri kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2. MSRE Enzim Kesim Bölgeleri

Restriksiyon enzimleri	Tanıma bölgeleri
Acil	5'-CCGC-3' 3'-GGCG-5'
HpaII	5'-GCGC-3' 3'-CGCG-5'
Hin6I	5'-CCGG-3' 3'-GGCC-5'

Kesim reaksiyonları tek enzim, çift enzim ve üçlü enzim mix'i kullanılarak kontrol DNA ile gerçekleştirildi. Bu enzimler ile genomik DNA 37 °C'de 8 saat inkübatörde bekletildi. Bu sürenin sonunda enzimler ısı bloğunda 70 °C de 15 dk inaktive edildi. En iyi kesimi sağladığı için PZR işlemi Acil-HpaII çift enzim reaksiyonu baz alınarak kuruldu. DNA'larda PZR reaksiyonunda kullanılan ikili restriksiyon enzimleri bileşenleri Tablo 3'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Kesim işlemleri sonrasında jel elektroforezi uygulanarak kesim reaksiyonları görüntülendi.

Tablo 3. PZR Reaksiyonunda Kullanılan İkili Restriksiyon Enzim Kesim Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	MCF7	MCF-10A	HEPG2
DNA	6480 ng	6480 ng	6480 ng
UP Su	3 µl	3 µl	3 µl
Enzimler	2 µl (Acil) - 4µl (HpaII)	2 µl (Acil) - 4µl (HpaII)	2 µl (Acil) - 4µl (HpaII)
Buffer tango	10 µl	10 µl	10 µl
Toplam hacim	100 µl	100 µl	100 µl

RT-PZR Analizi

Hücrelerin kalıp DNA örneklerini içeren ve içermeyen PZR reaksiyonları RT-PZR’da yürütüldü. Veriler sisteme bağlı StepOne RT-PZR yazılımı kullanılarak ve her primer çifti için 3’er kez tekrar edilerek alındı. PZR’de metile olmayan yerler amplifiye olmazken metillenmiş bölgeler amplifiye olarak qPZR analizine tabi tutuldu. PZR reaksiyonu sırasıyla 95°C-10 dk, 95°C-15 sn ve 61°C-30 sn programı ile 40 döngü olarak yapıldı. Genlerin promotor bölge metilasyon konsantrasyon farkının ortaya konmasında livak metodu ($2^{\Delta CT}$) kullanıldı. (Livak ve Schmittgen, 2001)

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS for Windows (Version-21) yazılım programı kullanıldı. Kolmogorov-Smirnov testi ile verilerin normalitesi belirlendikten sonra One Way Anova, Kruskal-Wallis testi ile gruplar arası ve Conover ve Tukey testi ile de ikili karşılaştırmalar yapıldı. Veriler medyan, minimum ve maksimum değerler olarak değerlendirildi. Veriler arası anlamlılık farkı $p < 0.05$ ’e göre değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, kanser ve sağlıklı hücrelerde ER stres yolağı genlerinden MAP3K5, ATF6, XBP1, EIF2AK3 ve MAOA’nın promotor CpG bölgesi metilasyon düzeylerine ilişkin veriler Tablo 4’de sunulmuştur. Buna göre MAP3K5 geni metilasyon değerlerinin her iki kanser hücresinde de kontrol hücrelerine göre anlamlı düşük olduğu görüldü ve HEPG2 de genlerin metilasyonunun daha az olduğu görüldü. ATF6 geni promotor metilasyonu HEPG2 hücrelerinde değişmezken MCF-7 hücrelerinde anlamlı düşük bulundu. MCF-7’nin hipometilasyon düzeyi HEPG2’den anlamlı düşük bulundu. XBP1 geni metilasyon düzeyi MCF-7 hücrelerinde anlamlı yüksek bulunurken HEPG2 hücrelerinde anlamlı farklılık bulunmadı. EIF2AK3 geni metilasyon düzeyi MCF-7 hücrelerinde anlamlı oranda yüksek bulunurken HEPG2 hücrelerinde anlamlı oranda düşük bulundu. MAOA geni metilasyonu her iki kanser hücresinde kontrol hücresine göre anlamlı düşük bulundu. MCF-7 hücrelerindeki azalma HEPG2’ye göre daha fazla bulundu.

Otofaji yolağı genlerinden LRRK2, PRKN, GBA ve NBR1’nin metilasyon düzeylerine ilişkin veriler Tablo 5’de sunulmuştur. Çalışma sonuçlarımıza göre her iki kanser hücresinde sadece GBA geninin metilasyon değeri anlamlı düşük bulundu. Hücreler arasında ise HEPG2 hücrelerindeki azalma daha fazla bulundu. Diğer genlerin metilasyon değerleri anlamlı farklılık göstermedi.

Tablo 4. ER Stresi Yolaklarında Rol Alan Majör Genlerin Metilasyon Değerleri

GENLER	MCF 10A (Kontrol)	MCF 7	HEPG2	p
	Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)	
MAP3K5	0,4931 (0,4665-0,5000)	0,3077 ^a (0,2871-0,3298)	0,1349 ^{a,b} (0,1174-0,2044)	0,0273
ATF6	0,7578 (0,7071-0,8122)	0,3789 ^a (0,3535-0,4352)	0,6643 ^b (0,6198-0,7120)	0,0389
XBP1	0,5358 (0,4897-0,5547)	1,0281 ^a (0,9794-1,0424)	0,4632 ^b (0,4352-0,5069)	0,0389
EİF2AK3	0,1285 (0,125-0,1638)	2,4283 ^a (2,3456-2,5140)	0,0769 ^{a,b} (0,0669-0,0883)	0,0273
MAOA	0,0625 (0,0544-0,0656)	0,0078 ^a (0,0071-0,0089)	0,0164 ^{a,b} (0,0153-0,0175)	0,0273

^a: MCF-10A'dan farklı, ^b: MCF-7'den farklı

MAP3K5 (ASK1): Mitojen-aktive edici protein kinaz, ATF6: Transkripsiyon aktive edici faktör 6, XBP1: X kutusu bağlayıcı protein 1, EİF2AK3: Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör, MAOA: Monoamin oksidaz A

Tablo 5. Otofaji Yolaklarında Rol Alan Majör Genlerin Metilasyon Değerleri

GENLER	MCF 10A (Kontrol)	MCF 7	HEPG2	p
	Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)	
LRRK2	0,2414 (0,1496-0,2642)	0,1947 (0,1150-0,2030)	0,0328 (0,0210 -0,1103)	0,0509
PRKN	0,1934 (0,1855-0,2465)	0,1855 (0,1684-0,1947)	0,3056 (0,2534 -0,3120)	0,0594
GBA	0,3634 (0,3511-0,3737)	0,2993 ^a (0,2891-0,3142)	0,1881 ^{a,b} (0,1780 -0,1934)	0,0273
NBR1	0,0036 (0,0035-0,0040)	0,0034 (0,0030-0,2294)	0,0043 (0,0028-0,0052)	0,9565

^a: MCF-10A'dan farklı, ^b: MCF-7'den farklı

LRRK2: Lösinden zengin tekrarlayan kinaz 2, PRKN: Parkin, GBA: Glukoserebrozidaz, NBR1: BRCA1 komşusu 1,

TARTIŞMA

Kanser tanısı ve tedavisi için epigenetik mekanizmaların araştırılması ve tedaviye yönelik yaklaşımlar sunulması son yıllarda dikkat çekici oranda artmıştır. (Güler ve Peynircioğlu, 2016; Gu, Ren, Fang vd, 2024). Bu araştırmaların bir parçası olarak ER stresi ile oluşan adaptif cevap yolakları ve otofajik yolakların genlerindeki epigenetik düzenlemeler ile birlikte hücre transformasyonu arasındaki ilişki belirsizliğini korumaktadır. Kanser hücrelerinde bu iki hücresel yolaktaki majör genlerin metilasyon profillerini ortaya koyarak değişimlerini saptamak çalışmamızın hedefini oluşturmuştur.

Araştırmalar kanser hücre genomlarında yaygın hipometilasyon olduğunu bununla birlikte özellikle tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerde ise hipermetilasyon olduğunu göstermektedir. Global hipometilasyon kanser hücrelerinde genomik kararsızlık ve onkogenik aktivasyon artışına neden olabilmektedir. Genlerin hipometilasyonu gen aktivitesini artırıcı yönde çalışırken hipermetilasyon gen susturucu nitelikte çalışmaktadır ([Lakshminarasimhan ve Liang, 2016](#)).

Birçok çalışmada ER stresi kanserle ilişkilendirmiştir (Wang, Groenendyk ve Michalak, 2014). Kanser hücreleri genellikle glikolitik yolları tercih ederek aşırı glikoz tüketimine bağlı olarak fazla laktik asit salınımı yaparlar. Bu durum tümör çevresinin pH'sını düşürür. Ayrıca

anjyogenez ile oluşturulan damarlarda kan akışının zayıf olması nedeniyle besin ve oksijen taşınımı ve atıkların drenajı azalır (Evyapan, Gülsevinç, Cömertpay ve Lüleyap, 2019).

Tümör mikroçevresindeki bu değişimler stres oluşturarak ER homeostazisinin bozulmasına neden olabilmektedir (Wang, Groenendyk ve Michalak, 2014; Giampietri vd, 2015). ER’de katlanmamış protein birikimine cevaben oluşan UPR'nin üç yolağının (IRE1, PERK ve ATF6) aktivite artışına bağlı olarak hücre transformasyonunu ve malignitesinin de arttığı rapor edilmiştir (Evyapan, Gülsevinç, Cömertpay ve Lüleyap, 2019).

Çalışmamızda sağlıklı hücre ile karşılaştırıldığında MCF7 hücrelerinde ER stresi ile ilişkili genlerden MAP3K5, ATF6, ve MAOA'nin DNA metilasyon düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı XBP1 ve EIF2AK3 genlerinde ise arttığı belirlendi. HEPG2 hücrelerinde ise MAP3K5, EIF2AK3 ve MAOA genlerinde hipometilasyon saptandı.

MAP3K5 proteini (ASK1), hücre çoğalması ve sağ kalımından sorumlu mitojen aktif protein kinaz (MAPK) yolağının önemli bileşenlerinden biridir. ER stresine yanıt olarak c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitogen aktive protein kinazlarını raftan bağımsız bir şekilde aktivite ederek hücrelerin transformasyonunda önemli rol oynamaktadır (Baig, Baker, Ashraf ve Dong, 2019). Çalışmamızda her iki kanser hücresinde MAP3K5 gen metilasyonunda azalma saptandı. MAP3K5 hipometilasyonu, gen ifadesinin artmasına ve onkogenik özellik kazanmasına neden olmaktadır. MAP3K5 geni özellikle stres şartlarında aktive olmaktadır. Kanser mikroçevresi değişimlerinin ER stres cevabını tetiklediği birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Bu durum literatür ile uyumlu olarak kanser hücrelerinde beklenen değişimlerdir.

Çalışmamızda ATF6 geninin de önemli oranda hipometile olduğu ve ifadesinin arttığı belirlendi. ATF6, katlanmamış proteinlerin birikmesine yanıt olarak ER'den golgiye geçip proteolitik kesimle aktivite kazanarak nukleusa geçer ve ER şaperon genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. ATF6 aynı zamanda birçok insan tümöründe aşırı eksprese edilerek besin eksikliği durumunda hücrenin yaşamsallığını sağlamada önemli rol oynamaktadır ve ATF6'nın aşırı ifadesi hücre senesens yolaklarındaki genleri de baskılayarak kanser oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Wang, Hu, Ding vd, 2018). ATF6, XBP1 gen ifadesinin düzenlenmesinden de sorumludur. Her iki genin aktivitesi ile protein katlanma proteinlerinden ER şaperon proteini BiP'nin (GRP78) ifadesi artırılarak karsinogeneze yol açtığı bildirilmiştir (Li ve Lee, 2006). BiP'nin pek çok kanser tipinde yüksek düzeyde ifade edildiği rapor edilmiştir (Dudek, Benedix, Cappel vd, 2009).

XBP1, ER stres cevabında IRE1 yolağının en önemli proteini. Çalışmamızda bu protein geninin metilasyon profili HEPG2 hücresinde değişmezken MCF7 hücresinde

hipermetile olduğu belirlendi. XBP1 transkripsiyon faktörü olup ER şaperonları ve protein katlama enzim genlerinin upregüle ettiği ayrıca spesifik mRNA degradasyonu ile protein sentezini kontrol ettiği bilinmektedir (Park, Kang ve So, 2021). XBP1'in kanser hücrelerinde hipermetilasyonla inaktivasyonu ER homeostasisindeki bozunmanın göstergesidir. Bu bilgiler ışığında literatür ile uyumlu olarak ATF6 geninin kanser hücrelerinde daha fazla ifade edildiği ve XBP1 gen ifadesini de etkileyerek kanserleşmeyi indüklediğini söyleyebiliriz.

EIF2AK3 genin metilasyonu MCF-7 hücrelerinde yüksek, HEPG2 hücrelerinde ise düşük bulundu. EIF2AK3 proteini UPR sisteminin 3 ana yolağından PERK yolunun en önemli bileşenlerindedir. ER stresine yanıt olarak ökaryotik translayon başlama faktörü 2'yi (IF2) inaktive ederek hücre genelinde protein sentezini azaltır ve hücrelerin strese yanıt vermesi için zaman kazandırılır. Ayrıca ER stresi durumunda EIF2AK3'in ifadesi artarak transkripsiyon faktörü olan ATF4'ü aktive eder. ATF4 ise radikal süpürücü enzim ve proteinlerin genlerini upregüle eder. Aynı zamanda bu yolla apoptik yolaklarda aktifleştirilir (Lee, Ryu, Lee, vd 2023). Bu genin hipermetile olması genin susturulduğunu ve böylece hücrede genel protein sentezi baskılanmasının ortadan kalktığını göstermektedir. HEPG2 hücrelerinde ise tersine genin hipometile durumda olup ifadesinin aktif olduğu böylece global protein sentezinin azaldığını göstermektedir.

MAOA enzimi, mitokondri dış membranında lokalize olup nörotransmitter kimyasalların oksidatif deaminasyon ile bozunumunu sağlamakta ve hücrel ROS artışına neden olmaktadır. MAOA'nın indüklediği ROS artışı mitokondrial disfonksiyona ve ER stresine neden olmaktadır. Diğer açıdan kronik ER stresinin de MAOA aktivesini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Deshwal, Forkink, Hu vd, 2018). Çalışmamızda her iki kanser hücresinde de MAOA genlerinde metilasyonun azaldığı ve genin aktivitesinin arttığını bulduk. Bu sonuçlar literatür ile uyumlu olarak kanser hücrelerinde ROS ile ilişkili ER stresinin arttığını göstermektedir.

Çalışmamızda otofaji yolağı genlerinin (LRRK2, PRKN, GBA ve NBR1) promotor metillenme yoğunlukları karşılaştırıldığında sadece GBA geninin hem HEPG2 hem de MCF-7 hücrelerinde hipometile olduğu belirlendi. Otofaji ile ER stresi ilişkisi belirsizliğini korumakla birlikte yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin azaltılması için otofajik yolakların aktive edildiğine dair bazı çalışmalar bulunmaktadır (Sano ve Reed, 2013). GBA gen ürünü lizozomal bir enzimdir. GBA mutasyonları ile Parkinson ve Gaucher hastalıkları arasında anlamlı bağlantı olduğu bilinmektedir (Sturchio, Dwivedi, Vizcarra vd, 2020). GBA genindeki önemli orandaki hipometilasyon durumu kanser hücrelerinde beklenen global hipometilasyon

durumuyla uyumlu bir sonuçtur. GBA geninin metilasyonunun azalması lizozomal aktivite artışının ve spesifik olarak ta alfa sinüklein aggregasyonunun azaltılmasına yönelik savunma mekanizması olarak yorumlanabilir.

SONUÇ

Tümör mikroçevresi değişkenleri uzun süreçte ER homeostasisinin bozulmasına neden olduğu için kanser hücrelerinde apoptozun indüklemesi beklenir ancak kanser hücrelerinin metabolik ve moleküler adaptasyon başarıları ile bundan kaçınırlar. Yaptığımız çalışmada kanser hücrelerinde UPR ve otofaji yolaklarında genlerin çoğunda hipometilasyon yoluyla epigenetik olarak aktive edilmesi bu modifikasyonlara önemli kanıt oluşturmaktadır. Çalışmada kanser hücrelerinde ER stres ilişkili genlerdeki metilasyon profilindeki değişikliklerin transformasyon patogenezinde rol oynadığı anlaşılmaktadır. Çalışma verilerimiz farklı hücre hatlarında ve geniş gen profillerinde yapılacak ileri çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Araştırma Desteği

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından 21-2431 nolu proje ile desteklenmiştir.

Beyanlar

Bu araştırma Nazmi ÖZGEN'in İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı kapsamında yapmış olduğu "Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında ER Stresi ve Otofajik Yolaklardaki Epigenetik Değişikliklerin Karşılaştırılması" adlı tezinin verilerinden üretilmiştir. Araştırma 8th International Medical and Health Sciences Research Congress (25-26 Aralık 2021- Online) kongresinde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Baig, M.H., Baker, A., Ashraf, G. M. ve Dong, J. (2019). ASK1 and its role in cardiovascular and other disorders: available treatments and future prospects. *Expert Review Proteomics*, 16(10), 857-870.
- Bhootra, S., Jill, N., Shanmugam, G., Rakshit, S. ve Sarkar, K. (2023). DNA Methylation a cancer: transcriptional regulation, prognostic, and therapeutic perspective. *Medical Oncology*, 40(71), 1-17.
- Costa, C.A.D., Manaa, W.E., Duplan, E. ve Checler, F. (2020). The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response and their contributions to parkinson's disease physiopathology. *Cells*, 9(11), 2495.
- Deshwal, S., Forkink, M., Hu, C.H., Buonincontri, G., Antonucci, S., Di, Sante, M., Murphy, M.P., Paolocci, N., Mochly-Rosen, D., Krieg, T., Di, Lisa, F. ve Kaludercic, N. (2018). Monoamine oxidase-dependent endoplasmic reticulum-mitochondria dysfunction and mast cell degranulation lead to adverse cardiac remodeling in diabetes. *Cell Death Differentiation*. 25(9), 1671-1685.

- Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner M, Jalal C, Müller, L. ve Zimmermann, R. (2009). Functions and pathologies of bip and its interaction partners. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(9), 1556-1569.
- Evyapan, G., Gülsevinç, A.Y., Cömertpay, G. ve Lüleyp, H. Ü. (2019). Tümörögenizde endoplazmik retikulum stres cevabının rolü. *Cukurova Medical Journal*, 44(1), 241-248.
- Giampietri, C., Petrunaro, S., Conti, S., Facchiano, A., Filippini, A. ve Ziparo, E. (2015). Cancer microenvironment and endoplasmic reticulum stress response. *Mediators of Inflammation*, 1:417281.
- Gu, M., Ren, B., Fang, Y., Ren, J., Liu, X., Wang, X., Zhou, F., Xiao, R., Luo, X., You, L. ve Zhao, Y. (2024). Epigenetic regulation in cancer. *Med Comm*, 19(5), 2. <https://doi.org/10.1002/mco2.495>.
- Güler, C. ve Peynircioğlu, B. B. (2016). DNA Metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2,61-68.
- Hart, L.S., Cunningham, J.T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S.L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., Li, Y., Gao, Y., Liu, H., Li, C., Maity, A., Thomas-Tikhonenko, A., Perl, A.E., Koong, A., Fuchs, S.Y., Diehl, J.A., Mills, I.G., Ruggero, D. ve Koumenis, C. (2012). ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *The Journal of clinical investigation*, 122, 4621-4634.
- Kwantwi, L. B. (2024). The dual role of autophagy in the regulation of cancer treatment. *Amino Acids*, 56, 1-7.
- Lakshminarasimhan, R. ve Liang, G. (2016). The Role of DNA Methylation in cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 945, 151-72. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1-7>.
- Lee, J., Ryu, H., Lee, H., Yu, H.R., Gao, Y., Lee, K., Kim, Y. ve Lee, J. (2023). Endoplasmic reticulum stress in pancreatic β cells induces incretin desensitization and β -cell dysfunction via ATF4-mediated PDE4D expression, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 325(5), E448-E465
- Li, J. ve Lee, A. S. (2006). Stress Induction of GRP78/Bip and Its role in cancer. *Current Molecular Medicine*, 6(1), 45-54.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Park, S.M., Kang, T. I. ve So, J. S. (2021). Roles of XBP1s in transcriptional regulation of target genes. *Biomedicines*, 9(7), 791.
- Robinson, C.M., Duggan, A. ve Forrester, A. (2024). ER exit in physiology and disease. *Frontiers In Molecular Biosciences*, 11, 1-15.
- Sano, R. ve Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1833(12), 3460-3470
- Sturchio, A., Dwivedi, A.K., Vizcarra, J.A., Chirra, M., Keeling, E.G., Mata, I.F, Kauffman, M.A., Pandey, M. K., Roviello, G., Comi, C., Versino, M., Marsili, L. ve Espay, A.J. (2020). Genetic parkinsonisms and cancer: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in the Neurosciences*, 32(2), 159-67.
- Tatar, M. ve Tatar, T. (2019). Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 41(3), 294-303.
- Wang, S., Hu, B., Ding, Z., Dang, Y., Wu, J., Li, D., Liu, X., Xiao, B., Zhang, W., Ren, R., Lei, J., Hu, H., Chen, C., Chan, P., Li, D., Qu, J., Tang, F. ve Liu, G.H. (2018). ATF6 Safeguards organelle homeostasis and cellular aging in human mesenchymal stem cells. *Cell Discovery*, 4(2), 1-19.
- Wang, W. A., Groenendyk, J. ve Michalak, M. (2014). Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1843(10), 2143-2149.
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 42-6.