






İnsan Akciğer Kanseri LC-3 Hücre Hatlarında Trpm5 İyon Kanalının Otofajik Hücre Ölümündeki Rolünün Araştırılması

Investigation of the Role in Autophagic Cell Death of Trpm5 Ion Channel in Human Lung Cancer LC-3 Cell Lines

 Siyami AYDIN,^a
 Akın Eraslan BALCI,^a
 Ebru ÖNALAN,^b
 Ahmet TEKTEMUR,^b
 Muharrem ÇAKMAK^a

^aGöğüs Cerrahisi AD,
^bTıbbi Biyoloji ve Genetik AD,
 Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,
 Elazığ, TÜRKİYE

Received: 18.06.2018
 Received in revised form: 17.09.2018
 Accepted: 18.09.2018
 Available online: 19.12.2018

Correspondence:
 Muharrem ÇAKMAK
 Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,
 Göğüs Cerrahisi AD, Elazığ,
 TÜRKİYE/TURKEY
 drcakmak@gmail.com

ÖZET Amaç: Akciğer kanserli dokularda, iyon kanalı olan transient reseptör potansiyel melastatin (TRPM) grubu TRPM2, 4, 5, 7, 8 ile Piezo 1, 2'nin RNA ekspresyonları çalışılmış ve adenokanserli hastalarda, TRPM5 iyon kanalı seviyesinin çok yüksek olduğu, otofajik aktiviteyi bloke ettiği saptanmıştır. Bu çalışmada, akciğer adenokanserli hücre hattında Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-TRPM5 (LC3-TRPM5) geninin durdurulmasıyla otofajik genlerin aktivasyonunun, dolayısıyla kanser hücrelerinin yok edilmesinin sağlanıp, sağlanamayacağını belirlemek amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** A549 adeno kanser hücre hattı sırasıyla, hücre beslenmesi, pasajlanması, dondurulması ve çözülmesi, siRNA uygulaması, total RNA izolasyonu, spektrofotometrik RNA ölçümü, komplementer DNA sentezi, kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu ile cDNA çoğaltımı işlemlerine tabi tutuldu. Sonuçlar değerlendirildi. **Bulgular:** A549 adeno kanser hücre hattı üzerinde yapılan kantitatif real time-polimeraz zincir reaksiyon analizi bulgularına göre, TRPM5 siRNA'sının %83 oranında baskılandığı, kontrol siRNA ve TRPM5 siRNA gruplarında otofajik genlerin sayısında iki kat artış olduğu görüldü. **Sonuç:** TRPM5-siRNA uygulaması, otofajik yollardaki genlerin ekspresyonunu açıkça artırmaktadır. TRPM5 süpresyonunun, otofajik mekanizmaları harekete geçirdiği, otofaji ile kanserli hücrelerin ölümüne yol açtığı saptanmıştır. TRPM5 otofajisi hedef alınarak inhibisyon ya da aktivasyon yapılabilir. Bu durum, akciğer kanserli hücrelerde kanserli hücrelerin otofajik ölümüne yol açan kanser tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri; TRPM kanalları; otofaji

ABSTRACT Objective: RNA expressions of TRPM2, 4, 5, 7, 8 into the transient receptor potential melanin (TRPM) group which is ion channel in lung cancer tissues and Piezo 1, 2 were studied. In patients with adenocarcinoma, TRPM5 ion channel level, which blocks autophagic activity, is found to be very high. In our study, we aimed to whether can be provided the activation of autophagic genes and thus the destruction of cancer cells by stopping the microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-TRPM5 (LC3-TRPM5) gene in the lung adenocarcinoma cell line. **Material and Methods:** The A549 adeno-cancer cell line was subjected to process as cell feeding, passaging, freezing and thawing, siRNA application, total RNA isolation, spectrophotometric RNA measurement, complementary DNA synthesis, quantitative real-time polymerase chain reaction and cDNA amplification. **Results:** According to the quantitative real time-polymerase chain reaction analysis on the A549 adeno-cancer cell line, it was observed that the number of autophagic genes in the control siRNA and TRPM5 siRNA groups increased 2 fold and 83% of the TRPM5 siRNA was suppressed. **Conclusion:** TRPM5-siRNA application clearly increases the expression of genes in the autophagic pathways. TRPM5 suppression has been found to cause autophagic cancer cells to die, with autophagic mechanisms acting. Inhibition or activation can be performed by targeting to TRPM5 autophagy. This may contribute to the development of cancer treatments leading to autophagic death of cancerous cells in lung cancer cells.

Keywords: Lung cancer; TRPM channels; autophagy

Karsinogenezde, hücrede oluşan genetik mutasyon düzeltilmeden hücre çoğalmaya başlamakta ve apoptoza uğramaz ise oluşan transforme hücre bölünerek çoğalmaya devam etmektedir.¹ Plazma membranında yer alan iyon kanalları ise apoptoz, proliferasyon ve farklılaşma gibi doku homeostazının korunması için gerekli olan tüm temel hücre davranışlarının yerine getirilmesinde görev almakta ve transient reseptör potansiyel melastatin (TRPM) katyon kanalları ve kalsiyum homeostazı kontrolü altındadır. Otofajik yollar ise hücre içi kalsiyum seviyeleri ve kalsiyum iyon kanalları tarafından kontrol edilmektedir. İyon kanallarının aktivasyonu ya da blokajı, hücreler üzerindeki otofajik aktivite üzerinde önemli etkiye sahiptir.²

Akciğer kanserli dokular üzerinde yapılan bir çalışmada, iyon kanalı olan TRPM grubu; TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM7, TRPM8 ile Piezo 1 ve Piezo 2'nin RNA ekspresyonları çalışılmış ve adenokanserli hastalarda, TRPM5 iyon kanalı seviyesinin çok yüksek olduğu ve otofajik aktiviteyi bloke ettiği saptanmıştır.³

Bu çalışmada, akciğer adenokanserli hücre hattında, Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-TRPM5 (LC3-TRPM5) geninin durdurulması ile otofajik genlerin aktivasyonunun, dolayısıyla kanser hücrelerinin yok edilmesinin sağlanıp, sağlanamayacağını belirlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda, A549 adenokanser hücre hattı temin edilmiştir (ATCC; CCL-185). Bu hücre hattı şu işlemlere tabi tutulmuştur.

1. aşamada (hücre beslenmesi); A549 hücreleri, %10 fetal bovine serum (FBS), %1 antibiyotik ve %1 L-glutamin ilave edilen Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) besiyeri içeren 25 ve 75 cm²lik flasklarda karbondioksitli (CO₂) etüvde 37 °C'de çoğaltılmıştır. Her gün canlılık, çoğalma, enfeksiyon bakımından inverted mikroskop kullanılarak değerlendirilen flasklardaki besiyeri her 2-3 günde bir değiştirilmiştir.

2. aşamada (hücrelerin pasajlanması); inverted mikroskop altında değerlendirilen flasklardaki yü-

zeyeye tutunmuş olan hücre yoğunluğunun %90-100 olduğu saptandığında, flask içindeki besiyeri dökülmüş ve flask yüzeyine tutunmuş olan hücreler serbest hâle gelmeleri için 4 mL tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile muamele edilmiştir. Beş dk 37°C'de inkübe edildikten sonra, inverted mikroskop altında hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Flask içinde serbest hâle geldikleri saptanan hücrelere 4 mL besiyeri ilave edilerek tripsin-EDTA'nın olumsuz etkisi nötralize edilmiştir. Falcon tüplere aktarılan bu karışım 2.300 g'da 3 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım dökülerek yerine taze besiyeri eklenmiştir. Flask içerisine aktarılmadan önce homojen bir süspansiyon oluşması için vorkteks yapılmış ve hücreler iki farklı flaska aktarılmıştır.

3. aşamada (hücrelerin dondurulması ve çözülmesi); hücrelerin dondurulması için flask içindeki besiyeri dökülerek hücreler 4 mL tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir. Beş dk 37°C'de inkübe edildikten sonra, flask içinde serbest hâle geldikleri saptanan hücrelere 4 mL besiyeri ilave edilmiştir. Falcon tüplere aktarılan bu karışım 2.300 g'da 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti üzerine %70 oranında Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), %20 oranında FBS ve %10 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) içeren solüsyon ilave edilmiştir. Kriyo tüplere bu karışımdan 1'er mL aktarılacak aşamalı olarak (oda sıcaklığı/+4°C/-20°C/-80°C) soğutulup, -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Donmuş olarak saklanan hücrelerin çözülmesi işlemi sırasında hücrelerin hemolizini önlemek amacıyla, çözülme işlemi dondurma işleminin aksi yönde aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. -80 °C derin dondurucudaki hücreler çıkarılarak -20, +4 ve oda sıcaklığı ve ardından 37 °C'ye ısıtılmış besiyeri ilave edilerek flaslara ekilmiştir.

4. aşamada (siRNA uygulaması); transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmeden önceki gün altılık platelelere her bir kuyucukta 2x10⁵ hücre/mL olacak şekilde ekim yapılarak CO₂'li etüvde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Besin ortamı değiştirilerek kuyucuk başına 2,3 mL DMEM eklenmiştir. On

μM 'lık siRNA'dan 9 μl alınarak 100 μl opti-minimum essential media (OptiMEM) içerisinde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş siRNA üzerine 12 μl HiPerFect eklenmiş ve üç kez birer saniye vortekslenerek karıştırılmıştır. Lipozomların oluşumu için oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edildikten sonra bu karışım pipetaj yapılmadan hücreler üzerine damla damla olacak şekilde eklenmiş ve plate hafifçe karıştırılmıştır. CO_2 'li etüvde 37°C 'de inkübe edilmiş ve transfeksiyon işleminden 24 saat sonra besiyeri değiştirilmiştir. siRNA transfeksiyon işlemi toplamda 48 saat sürdürülmüştür.

5. aşamada (total RNA izolasyonu); flaklardan alınan A549 hücreleri 15 mL'lik falkon tüplerine aktarılmış ve 5 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. 2.300g'da 3 dk santrifüj işlemi ardından pellet oluşturan hücrelerin üstünde kalan sıvı kısım dikkatli bir şekilde dökülerek PBS ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti 1,5 mL'lik ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra, 1 mL trizol ilave edilerek 18 gauge enjektör ile pellet parçalanmış ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 200 μl kloroform (trizol hacminin 1/5'i kadar) ilave edilerek 30 saniye vorteks yapılmış ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. $+4^\circ\text{C}$ 'de 10.000 g'da 20 dk santrifüj edildikten sonra en üstteki sıvı kısım yeni ependorf tüplere aktarılmıştır. Eldeki sıvı kısım ile eşit hacimde izopropanol eklenerek vorteks yapılmış ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. RNA pelleti için $+4^\circ\text{C}$ 'de 10.000 g'da 20 dk santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL. %75'lik etanol ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. $+4^\circ\text{C}$ 'de 10.000 g'da 5 dk santrifüj işleminin ardından bu yıkama işlemi tekrarlanmış ve etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 30 μl nükleaz-free su eklenerek kullanılana kadar -80°C 'de saklanmıştır.

6. aşamada (spektrofotometrik RNA ölçümü); işleme geçmeden önce DNAaz-RNAaz içermeyen steril su ile kör ölçüm yapılmıştır. BioSpec-nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 μl RNA konularak RNA miktarı ng/ μl olarak ölçülmüştür. Bu işlem her bir örnek için tekrarlanmıştır.

7. aşamada [komplementer DNA (cDNA) sentezi]; beş yüz μl hacimli ependorf tüplerde top-

lamda 20 μl hacimde gerçekleştirilen cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 μl kullanılırken; 2 μl 10xRT Buffer, 0,8 μl 25xdNTP mix, 2 μl 10xRT Random Primers, 1 μl Multiscribe™ Reverse Transcriptase ve 4,2 μl nükleaz-free su kullanılmıştır. Termal döngü cihazına yerleştirilen örnekler; 25°C 'de 10 dk, 37°C 'de 120 dk, 85°C 'de 5 dk ve 4°C 'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletilerek sonunda oluşan cDNA örnekleri -20°C 'de saklanmıştır.

8. aşamada [kantitatif gerçek zamanlı (real time)-polimeraz zincir reaksiyonu ile cDNA çoğaltımı]; revers transkripsiyon sonucunda elde edilen cDNA'lar spesifik primerlerin varlığında gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltılmıştır. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz [glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)], TRPM2, Beta aktin (Actb), Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (MAP1LC3A), Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (MAP1LC3B), BCL-2 associated X protein (BAX), B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2), Autophagy/beclin-1 regulator 1 (AMBRA1), Autophagy protein 12 (ATG12), ATG16L1, ATG5, BECL1N1, BECN1L1, Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1), Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), Lysosomal-associated membrane protein 3 (LAMP3), Phosphoinositide-3-kinase class 3 (PIK3C3), Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4 (PIK3R4), RB1-inducible coiled-coil 1 (RB1CC1), SH3-domain GRB2-like endophilin B1 (SH3GLB1), Tumor protein p53 (TP53), Tumor protein p73 (TP73), Unc-51-like kinase 1 (ULK1), Unc-51-like kinase 2 (ULK2) ve UV radiation resistance associated (UVRAG) genlerinin ekspresyonları belirlenmiştir.

Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen kantitatif RT-PZR yönteminde plate hazırlanırken her bir kuyucuğa 1 μl cDNA örneği konulmuştur. Her bir örnek için 2 μl qPCR miks, 1 μl primer ve 6 μl DNAaz ve RNAaz içermeyen steril su ilave edilmiştir.

Gen ekspresyon düzeyleri Applied Biosystems 7500 RT-PZR sistemi ile belirlenmiştir. Çalışmada kontrol gen (housekeeping) olarak GAPDH ve

beta-aktin kullanılmıştır. Isı koşulları 1 kez 95°C'de 15 dk ve 40 kez 95°C'de 15 saniye-60°C'de 30 saniye-72°C'de 30 saniye olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için IBM, SPSS Statistics programı 22. sürüm paket programı kullanıldı. Hücre sağkalım verilerinin gruplar arasındaki karşılaştırılmasında ki-kare, RT-PZR parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması için t testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı. siRNA susturma yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki hesaplama metodu kullanıldı.

$$\Delta\Delta CT \text{ değeri} = \Delta CT \text{ siRNA} - \Delta CT \text{ kontrol}$$

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{Susturma yüzdesi} = 100 \times (1 - \text{kat değişimi})$$

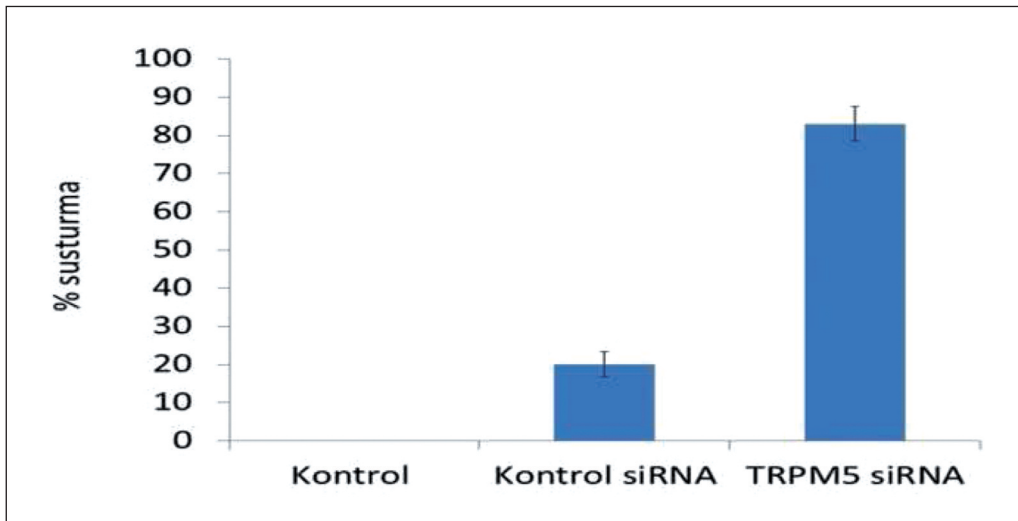
BULGULAR

A549 adenokanser hücre hattı üzerinde yapılan kantitatif RT-PZR analizi bulgularına göre, TRPM5 siRNA'sının %83 oranında baskılandığı belirlendi. Kontrol siRNA ve TRPM5 siRNA gruplarında oto-fajik genlerin sayısında iki kat artış olduğu görüldü. RT-PZR bulguları kontrolle karşılaştırıldığında,

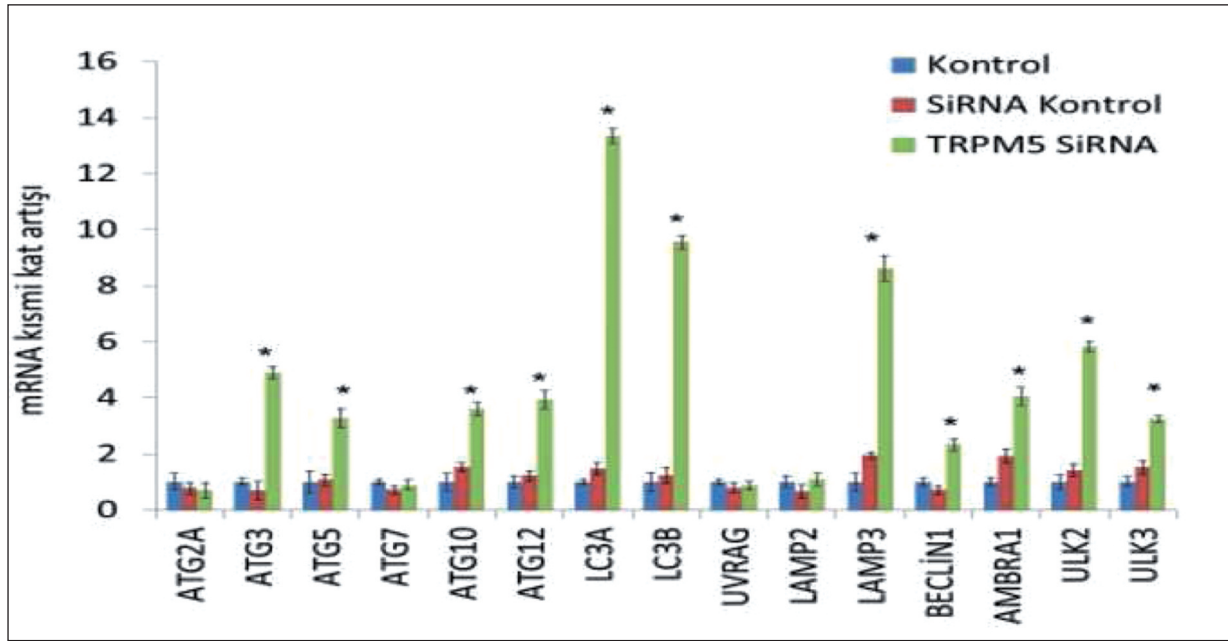
siRNA kontrol gruplarında otofajik genler açısından anlamlı bir azalma ya da anlamlı bir artış belirlenmedi. Ancak, hem kontrol hem de siRNA kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, TRPM5 siRNA grubunda ATG3 4,89 kat, ATG5 3,28 kat, ATG10 3,59 kat, ATG12 3,93 kat, LC3A 13,35 kat, LC3B 9,56 kat, LAMP3 8,62 kat, BECLIN1 2,34 kat, AMBRA1 4,06 kat, ULK2 5,83 kat ve ULK3'ün 3,24 kat istatistiki olarak anlamlı düzeyde arttığı saptandı. Ancak, yine otofajide görevli olan ATG2A, ATG7, UVRAG ve LAMP2 gen mRNA ifadelerinde kontrol ve kontrol siRNA gruplarıyla karşılaştırıldığında, TRPM5 siRNA grubu açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Şekil 1, 2).

TARTIŞMA

Unc-51-like kinase 3 ve homoloğu olan ULK2, otofajinin indüklenmesinde yer alan kilit moleküllerdir. Otofajinin indüklenmesinde ULK'nin rolü tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen, ULK3'ün otofagozomların öncül formları olan fagoforların oluşumunu düzenlemek için, otofaji indüklenmesinde bir diğer kilit aracı olan PIK3C3 ile etkileşim kurduğu gösterilmiştir.⁴ Jung ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada, ULK2 ve ULK3'ü tümör baskılayıcı p53'ün kesin birer transkripsiyonel hedefi olduğunu göstermişlerdir.⁴ DNA hasarına yanıtta p53'ün, ULK2/3 transkripsiyon düzeylerini artırdı-



ŞEKİL 1: Kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyon analizi bulguları. TRPM: Transient reseptör potansiyel melastatin.



ŞEKİL 2: TRPM5 siRNA tranfeksiyonu sonrası kontrol.

TRPM: Transient reseptör potansiyel melastanin; RNA: Ribonükleik asit; ATG: Autophagy protein; LC: Microtubule - associated protein 1A/1B-light chain; LAMP: Lysosomal-associated membrane protein; BECLIN1: B-cell CLL/ lymphoma 2; AMBRA: Autophagy/beclin- 1 regulator, ULK: Unc- 51- like kinase.

ğını ve devamlı otofajiyi başlattığını öne süren bu araştırmacılar, böyle bir senaryoda otofaji indüklenmesinin artmış apoptotik olmayan hücre ölümüne yol açtığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda, TRPM5-siRNA grubunda ULK3 düzeyinde anlamlı artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRPM5 ile ULK3 arasında ters orantı olduğunu ortaya koymaktadır. BECLIN1, otofajide merkezi bir role sahiptir. BECLIN1 etkileşimli bir protein olan AMBRA1, BECLIN1 bağımlı otofajiyi pozitif bir şekilde düzenlemektedir. AMBRA1'in fare embriyolarındaki fonksiyonel eksikliği, otofajinin azlığı (bozukluğu) ile ilişkili olan nöroepitelyal hiperplaziye ve aşırı apoptotik hücre ölümüne sebebiyet vermiştir. AMBRA1, otofaji başlangıcının düzenlenmesinde hayati öneme sahip bir faktör olarak tanımlanabilmektedir. Bir antiapoptotik faktör olan BCL-2'nin aşırı ekspresyonu, çoğu apoptoz indükleyicisine karşı koruyucu bir etki başlatmaktadır. Strappazon ve ark., 2011 yılında yaptıkları çalışmada, AMBRA1 ve BCL-2'nin BECLIN1'e aynı bölge üzerinden bağlandığını, bu yüzden AMBRA1'in BECLIN1'e bağlanmak için BCL-2 ile yarıştığını göstermişlerdir.⁵ Strappazon ve ark.na

göre, AMBRA1'in ekspresyonundaki azalma, rapamisin düzeyi ve besin yokluğu ile indüklenen otofajide önemli düzeyde bir düşüşe yol açar iken, AMBRA1'in aşırı ekspresyonu bazal ve rapamisin indüklü otofajiyi artırmaktadır.⁵ Kang ve ark., çalışmamızdaki RT-PZR sonuçlarına göre, AMBRA1 mRNA düzeyinin TRPM2-siRNA grubunda anlamlı olarak arttığını belirlemişlerdir.⁶ Bu sonuçlar TRPM5 ile AMBRA1 arasında ters orantı olduğunu ortaya koymaktadır.

Memeli hücrelerde MAPLC3 (LC3), yaygın bir şekilde bulunmaktadır ve otofagozomların oluşumu için esansiyeldir. Besin yetersizliğine bağlı olarak indüklenen otofajide, LC3 ekspresyonu artmaktadır. Bu yüzden otofaji için spesifik bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Wu ve ark.nın çalışmasına göre, memeli hücrelerinde LC3'ün; LC3A, LC3B ve LC3C olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır, ancak LC3B diğer iki izoforma kıyasla daha sık bir şekilde otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır.⁷ Ouyang ve ark. ile Wu ve ark.nın 2015 yılında yaptıkları çalışmada, LC3'ün, kolorektal kanser dokularında kanserli olmayanlara kıyasla hem mRNA hem de protein düzeyindeki

ekspresyonunun önemli derecede artmış olduğu saptanmıştır.^{7,8} Ayrıca, kanser hücrelerinde otofajik aktivite ya da otofaji potansiyelinin arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada elde ettiğimiz verilere göre, MAPLC3A ve MAPLC3B mRNA ekspresyonlarının, TRPM5-siRNA grubunda istatistiki açıdan anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, MAPLC3A ve MAPLC3B'nin, TRPM5 ile ters orantılı olduğunu göstermektedir.

Otofaji ile ilişkili genler-5, otofagozom uzamasında yer almasından dolayı otofaji için gerekli olan merkezi bir düzenleyicidir. ATG5'in zorunlu ekspresyonu hem in vivo hem de in vitro olarak tümör hücrelerini antikanser ilaç uygulamalarına karşı hassas hâle getirmektedir. Buna karşın siRNA aracılığıyla inhibe edilmesi kemoterapiye karşı kısmi bir direnç oluşmasına neden olmaktadır.⁹ İnsan prostat kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, VPA (antikanser etkilere sahip bir histon deasetilaz inhibitörü) uygulanmasıyla LNCap ve PC-3 hücrelerinde otofajinin indüklendiği, ancak DU145 hücrelerinde ise engellendiği gözlemlenmiştir. ATG5'in, LNCAP ve PC3 hücrelerinde saptandığı, ancak DU145 hücrelerinde ATG5 mRNA alternatif splicelerinin fonksiyonel olmayan kesik ürünlere yol açmasından dolayı ATG5'in eksik olduğu belirlenmiştir. Wild tip ATG5 geninin DU145 hücrelerine transfekte edilmesinin ardından, hücrelerde otofaji sağlandığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada, ATG5 mRNA ekspresyonunun, TRPM5-siRNA gruplarında istatistiki açıdan anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRPM5 ile ATG5 arasında mRNA düzeyinde ters yönlü bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

Otofaji ile ilişkili genler-12, hem otofagozom oluşumunu başlatarak hem de bazı BCL-2 ailesi üyelerine bağlanıp inaktif hâle getirmek suretiyle apoptozu doğrudan düzenleyerek iki farklı şekilde hizmet edebilmektedir.¹⁰ Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, ATG12 mRNA ekspresyonunun, TRPM5-siRNA grubunda istatistiki olarak anlamlı arttığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, TRPM2 ile ATG12 arasında mRNA düzeyinde ters orantı olduğu şeklinde yorumlanabilmektedir.

Çalışmamızda, LAMP3 mRNA ekspresyonunun TRPM5-siRNA grubunda istatistiki olarak anlamlı arttığı belirlenmiştir. Bu sonuç, TRPM5 ile LAMP3 arasında ters orantılı ilişkinin olduğu şeklinde yorumlanabilmektedir.

SONUÇ

TRPM5-siRNA uygulaması, otofajik yollardaki genlerin ekspresyonunu açıkça arttırmaktadır. Bu veriler, TRPM5 süpresyonunun, otofajik mekanizmaları harekete geçirebileceğini göstermiştir. Kanserde otofajinin, hücrelerin hem sağkalımına hem de ölümüne yol açabilen iki farklı fonksiyon gösterebileceği saptanmıştır. TRPM5 ile ilişkili otofajın belirlenmesi ile TRPM5 otofajisi hedef alınarak inhibisyon ya da aktivasyon yapılabilir. Bu durum, hücrelerin otofajik ölümüne yol açan kanser tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Siyami Aydın, Akın Eraslan Balcı, Ebru Önalın, Muharrem Çakmak; **Tasarım:** Siyami Aydın, Akın Eraslan Balcı, Ebru Önalın, Muharrem Çakmak; **Denetleme/Danışmanlık:** Muharrem Çakmak, Akın Eraslan Balcı; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Siyami Aydın; **Analiz ve/veya Yorum:** Siyami Aydın, Muharrem Çakmak; **Kaynak Taraması:** Siyami Aydın, Muharrem Çakmak; **Makalenin Yazımı:** Siyami Aydın, Muharrem Çakmak; **Eleştirel İnceleme:** Muharrem Çakmak, Akın Eraslan Balcı, Ebru Önalın; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Siyami Aydın; **Malzemeler:** Siyami Aydın.

KAYNAKLAR

1. Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 2007;28(7):1379-86.
2. Gautier M, Dhennin-Duthille I, Ay AS, Rybarczyk P, Korichneva I, Ouadid-Ahidouch H. New insights into pharmacological tools to TR(i)P cancer up. *Br J Pharmacol* 2014; 171(10):2582-92.
3. Hantute-Ghesquier A, Haustrate A, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPM family channels in cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018;11(2):58.
4. Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim DH. ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* 2011;7(10):1212-21.
5. Strappazon F, Vietri-Rudan M, Campello S, Nazio F, Florenzano F, Fimia GM, et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J* 2011;30(7):1195-208.
6. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011;18(4):571-80.
7. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, He S, et al. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(4):3882-91.
8. Ouyang DY, Xu LH, He XH, Zhang YT, Zeng LH, Cai JY, et al. Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5. *Autophagy* 2013;9(1):20-32.
9. Ge J, Chen Z, Huang J, Chen J, Yuan W, Deng Z, et al. Upregulation of autophagy-related gene-5 (ATG-5) is associated with chemoresistance in human gastric cancer. *PLoS One* 2014;9(10):e110293.
10. Hayat MA. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. 1st ed. Volume 2-Role in General Diseases. California: Academic Press; 2013. p.440.