



## AIFM3 ARACILI APOPTOZ SİNYALİNİN KANSER HÜCRELERİNDE MİR-96-5P İLE BASKILANMASI

Suppression of AIFM3-Mediated Apoptosis Signal by miR-96-5p in Cancer Cells

Esra BOZGEYİK 

Adıyaman Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü, Adıyaman, TÜRKİYE.

### Öz

**Amaç:** Kanser dünya genelinde yaygın olarak görülen önemli bir halk sağlığı problemidir. Mikro RNA'lar (miRNA), kanser gibi karmaşık hastalıkların moleküler mekanizmasında önemli fonksiyonları olan küçük kodlanmayan RNA transkriptleridir. Bu çalışmada, miR-96-5p'nin meme, akciğer ve osteosarkom kanser hücrelerinde AIFM3 (apoptosis inducing factor mitochondria associated 3) geni ve apoptoz üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Osteosarkom (U2-OS), meme (MCF7) ve akciğer (A549) kanseri hücreleri normal kültür koşullarında çoğaltılıp ardından miR-96-5p mimik transfeksiyonu yapılmıştır. Mimik transfekte edilen hücreler toplanarak miRNA ve total RNA izolasyonları yapılmıştır. Real-Time PCR ile gen ifadesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Kanser hücrelerinde miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında AIFM3 geninin ifade düzeyinin meme ( $p=0,015$ ) ve akciğer ( $p=0,024$ ) kanseri hücrelerinde ciddi derecede azaldığı gösterilmiştir. Osteosarkom hücrelerinde ise miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında AIFM3 geninin ifade düzeyinde azalma olduğu gösterilmiştir, ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca, bu hücrelerde miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında apoptoz ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinde önemli değişiklikler olduğu saptanmıştır. MiR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında, MCF7 hücrelerinde BCLxL ( $p=0,043$ ) ve BCL2 ( $p=0,0147$ ) genlerinin, A549 akciğer kanseri hücrelerinde BCL2 ( $p=0,026$ ) geninin ifade düzeyinin arttığı bulunmuştur.

**Sonuç:** Sonuç olarak, kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin ifade düzeyinin artırılması ile AIFM3 geninin ifade düzeyinin azaldığı ve apoptoz ilişkili sinyal yolağının baskılandığı bulunmuştur. MiR-96-5p'nin apoptoz üzerine etkilerin net olarak anlaşılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** AIFM3, apoptoz, kanser, miR-96-5p.

### Abstract

**Aim:** Cancer is an important public health problem that is common throughout the world. Micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNA transcripts that have important functions in the molecular mechanism of complex diseases such as cancer. In this study, it was aimed to reveal the effects of miR-96-5p on AIFM3 (apoptosis inducing factor mitochondria associated 3) gene and apoptosis in breast, lung and osteosarcoma cancer cells.

**Materials and Methods:** Osteosarcoma (U2-OS), breast (MCF7) and lung (A549) cancer cells were grown under normal culture conditions and subsequently subjected to miR-96-5p mimic transfection. Mimic transfected cells were harvested and miRNA and total RNA isolations were performed. Gene expression analyzes were performed by Real-Time PCR.

**Results:** Expression of AIFM3 gene was shown to be significantly reduced in breast ( $p=0.015$ ) and lung ( $p=0.024$ ) cancer cells after miR-96-5p mimic transfections. In osteosarcoma cells, the expression level of the AIFM3 gene was shown to be decreased after miR-96-5p mimic transfections, but this change was not statistically significant. In addition, significant changes were found in the expression levels of apoptosis-related genes after mimic transfection in cancer cells. After miR-96-5p mimic transfection, the expression level of BCLxL ( $p = 0.043$ ) and BCL2 ( $p = 0.0147$ ) genes in MCF7 cells and BCL2 ( $p = 0.026$ ) gene in A549 lung cancer cells were found to be increased.

**Conclusion:** Consequently, it was found that by increasing the expression level of miR-96-5p in cancer cells, the expression level of AIFM3 gene decreased and apoptosis-associated signaling was suppressed. Further more comprehensive studies are needed to clearly understand the effects of miR-96-5p on apoptosis.

**Keywords:** AIFM3, apoptosis, cancer, miR-96-5p.

### GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde sık görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önde gelen ölüm sebebidir. 2019 yılı kanser istatistikleri verilerine göre yaklaşık 1,7 milyon kişide yeni kanser vakası teşhis edileceği ve yaklaşık 600 bin kişinin bu hastalıktan

### Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Esra BOZGEYİK

**Adres:** Adıyaman Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri, Adıyaman /TÜRKİYE

**E-posta:** ebozgeyik@adiyaman.edu.tr

### Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 22.03.2020

Date Accepted / Kabul Tarihi: 02.08.2020

Namık Kemal Tıp Dergisi 2020; 8(3): 361 - 368

hayatını kaybedeceği öngörülmektedir<sup>1</sup>. Bu istatistiksel veriler, tanıya ve tedaviye yönelik yapılan çalışmaların ciddi önem taşıdığını biz araştırmacılara net bir şekilde göstermektedir.

Kanser ile ilgili yapılan çalışmalar, gelişen teknolojinin beraberinde getirdiği yenilikçi teknikler ile yeni bir boyut kazanmıştır. Sadece protein kodlayan genlerde değil aynı zamanda miRNA gibi kodlanmayan RNA'ların düzenlenmesinde meydana gelen bozuklukların da kanserin moleküler mekanizmasında oldukça etkili olduğu yapılan birçok çalışma ile ortaya konulmuştur<sup>2</sup>. miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlama kapasitesi bulunmayan RNA transkriptleridir. Bu RNA molekülleri mRNA'ların 3'UTR bölgelerine bağlanarak onların translasyonel baskılanmasına veya mRNA yıkımına neden olarak negatif yönde düzenlerler. miRNA'lar kanserde çok önemli yolları etkileyerek onkojenik veya tümör baskılayıcı özellik gösterebilirler<sup>2</sup>. Bu özelliklerinden dolayı birçok kanser çeşidinde düzensiz olan miRNA'lar tanıya ve/veya tedaviye yönelik olarak hedeflenebilmektedirler<sup>2</sup>.

MiR-96-5p, prostat kanseri<sup>3,4</sup>, hepatosellüler karsinom<sup>5</sup>, meme kanseri<sup>6</sup> ve kolorektal kanser<sup>7</sup> gibi birçok kanser çeşidinde tümör ilerlemesi, metastaz, invazyon ve apoptozda önemli rolleri olduğu ortaya konulan onkojenik bir miRNA'dır. MiR-96-5p'nin FOXO1 (forkhead box O1), FOXO3a (forkhead box O3A) ve MTSS1 (metastasis suppressor-1) gibi kanserde önemli işlevleri olan genleri düzenlediği gösterilmiştir<sup>3,6</sup>. Ancak apoptozda görevli olan AIFM3 (apoptosis inducing factor mitochondria associated 3) geni ile ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma mevcut değildir. AIFM3 geni 598 amino asitten oluşan Aifm3 proteinini kodlamaktadır, Rieske ve nükleotit-disülfid oksidoredüktaz domaini olmak üzere iki büyük domaini bulunmaktadır<sup>8</sup>. AIFM3 geni, sağlıklı hücrelerde mitokondriyal intermembran boşluğunda bulunur ve apoptotik hücrelerde nükleer bozunma için gerekli olan bir flavoproteini kodlamaktadır<sup>9</sup>. Apoptozun uyarılması bu proteinin çekirdeğe translokasyonuna neden olur ve burada kromozom yoğunlaşmasına ve parçalanmasına etki eder<sup>9,10</sup>. AIFM3'ün kanser oluşumu ve gelişimindeki rolü yaygın bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen<sup>8</sup>, miR-96-5p ile ilişkisi hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Dolayısıyla, bu çalışmada çeşitli kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin ifade seviyesinin artırılması ile AIFM3 geninin ifadesindeki değişimler ve buna bağlı olarak apoptoz ile ilişkili genler üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Kanser hücrelerinin kültür edilmesi**

Bu çalışmada U2-OS (osteosarkom), MCF7 (meme kanseri) ve A549 (akciğer kanseri) hücre hatları kullanıldı. Hücreler ATCC firmasından tedarik edildi ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren %95 nemli ortamda kültür edildi. Hücreler, %10 FBS (Fetal bovine serum; Sigma-Aldrich, Almanya) ve %5 oranında 50 U/ml penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich, Almanya) besi yerinde çoğaltıldı. Hücreler flasklar içinde çoğaltıldıktan sonra tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya) ile kaldırıldı. Tripsinin etkisini nötrlemek için DMEM eklendi ve 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılarak hücreler Thoma lamı ile sayıldı ve sonraki deneyler için kullanıldı.

### **Hücrelerden Total RNA ve miRNA izolasyonu**

Kültür kaplarından alınarak çöktürülmüş hücrelerden total RNA izolasyonu yapmak için RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Santrifüj sonrası süpernatantı uzaklaştırılan hücrelerin üzerine 700 µl

QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Almanya) eklendi. Çözünen hücreler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. İzolasyonlar üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Hücrelerden miRNA izolasyonu yapmak için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Total RNA izolasyonunda olduğu gibi izolasyon işlemi üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonlarını ve saflıklarını ölçmek için NanoDrop® ND-1000 spektrofotometrede 260-280 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Bir sonraki deneysel aşamaya kadar RNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.

#### **Tek sarmal cDNA sentezi ve Real-Time PCR**

Spektrofotometre ile konsantrasyonları belirlenen RNA örneklerinin yoğunlukları eşitlenerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Total RNA izole edilen örneklerden cDNA sentezi RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, Almanya) ile yapıldı. Uygun miktarlarda karışımı hazırlanan örnekler PCR cihazında sırasıyla 42 °C'de 15 dk ve 95 °C'de 5 dk termal şartlara tabii tutuldu. miRNA örneklerinden cDNA sentezi için miScript® II RT Kit miRNA cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Konsantrasyonları eşitlenen örnekler uygun miktarlarda karıştırılarak PCR cihazında 37 °C'de 60 dk ve 95 °C'de 5 dk termal şartlara tabii tutuldu. Her iki reaksiyon sonucu elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR deneylerinde kullanılabilmek için -80 °C'de muhafaza edildi.

Real-Time PCR deneyleri özgün tasarlanmış primerler kullanılarak Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) Real-Time PCR cihazında yapıldı. cDNA sentezlenmiş miRNA'lardan miR-96-5p'nin (miR-96-5p hedef dizilimi: 5'—UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU—3') ifade düzeyini belirlemek için miScript SYBR® Green PCR Kit kullanıldı. Ayrıca miR-96-5p'nin ifade düzeyinin belirlenmesinde küçük RNA molekülü RNU6 referans gen olarak kullanıldı. Kitin prosedürüne uygun olarak hazırlanan karışım Rotor-Gene Q cihazında 95 °C'de 15 dk, 95°C'de 15 sn 55 °C'de 30 sn ve 70 °C'de 30 sn (40 döngü) sıcaklığa maruz bırakıldı. Reaksiyon sonrasında belli bir eşik değeri belirlenerek Ct (cycle threshold) değerleri kaydedildi. Ayrıca, total RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezi yapılan örneklerden gen ifadesini belirlemek için QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Kitin prosedürüne uygun olarak karışım hazırlandı ve her bir gen için özel tasarlanmış primerler kullanılarak gen ifadesi deneyleri yapıldı (Tablo 1). Hazırlanan karışım Rotor-Gene Q cihazında 95 °C'de 15 dk, 95°C'de 15 sn 55-65 °C'de (her primer için farklı sıcaklık) 30 sn, 72 °C'de 30 sn (40 döngü) ve 72 °C'de 10 dk sıcaklığa maruz bırakıldı. Reaksiyon sonrasında belli bir eşik değeri belirlenerek Ct değerleri kaydedildi. İlgili genlerin ifade seviyesini belirlemek için GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) geni ile normalizasyon yapıldı.

**Tablo 1.** Gen ifadesi deneylerinde kullanılan gen-spesifik PCR primerleri ve özellikleri

Gen ve primer adı	Dizilimi (5'—3')
AIFM3-Fw	GTCCTGGCTTACGGGAAAG
AIFM3-Rv	GCCTTGAGGGTTGAGCATCT
BAX-Fw	GTCGCCCTTTTCTACTTTGCC
BAX-Rv	TGGTCACGGTCCAACCACC
BCL2-Fw	ATAACGGAGGCTGGGATGC
BCL2-Rv	TCACTTGTGGCCAGATAGG
BCL2L1-Fw	TCAGCCACCATTGCTACCAG
BCL2L1-Rv	CCAAGGAGCTGGTTTAGGGG
GAPDH-Fw	GATCATCAGCAATGCCTCCT
GAPDH-Rv	TGTGGTCATGAGTCCCTCCA

Fw:Forward, Rv:Reverse

#### **MiR-96-5p'nin kanser hücrelerine mimik transfeksiyonu**

U2-OS, MCF7 ve A549 kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin ifade düzeyini arttırmak için sentetik olarak sentezlenmiş miR-96-5p mimik (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Kanseri hücreleri 12 kuyucuklu kültür

kaplarına  $1 \times 10^5$  hücre/ml olarak ekildi. FBS ve antibiyotik içermeyen 100  $\mu$ l DMEM içerisinde 4  $\mu$ l HiPerFect Transfection Reagent ve 0,6  $\mu$ l 5mol miR-96-5p mimik eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında hücrelerin üzerine damla damla verildi. Bu işlemden 3-4 saat sonra hücrelerin üzerine 10  $\mu$ l FBS eklendi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak total RNA ve miRNA izolasyonları için çöktürüldü.

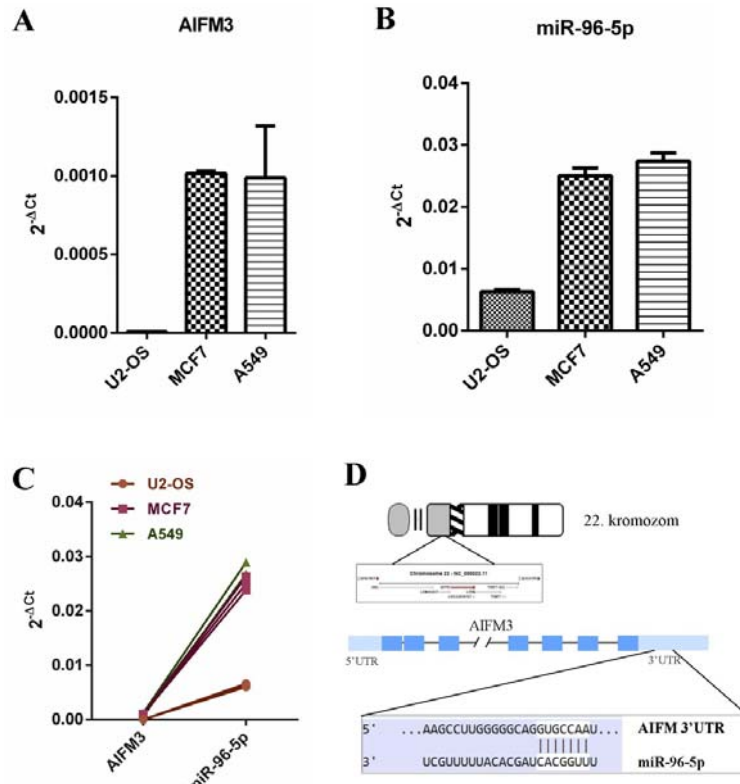
### İstatistiksel Analizler

Real-Time PCR cihazında kaydedilen Ct değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta Ct}$  ( $\Delta Ct = \text{Hedef gen} - \text{Referans Gen}$ ) yöntemi ile gen ifadesi analizleri yapıldı. Elde edilen verilerden GraphPad Prism6 programında istatistiksel analizler yapıldı. İkili karşılaştırmalar için t testi (non-parametrik Mann Whitney U testi), çoklu karşılaştırmalar için ise non-parametrik Kruskal Wallis testi kullanıldı. Bütün sonuçlar için  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### Kanser hücrelerinde miR-96-5p ve AIFM3 ifade seviyeleri

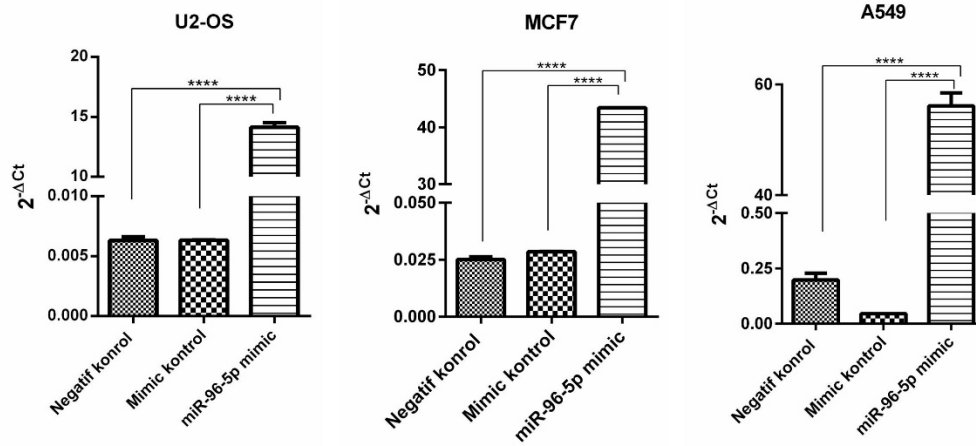
Kanser hücrelerindeki AIFM3 ve miR-96-5p'nin ifade seviyeleri Şekil 1A ve Şekil 1B'de sırası ile gösterilmiştir. U2-OS hücrelerinde genel olarak AIFM3 ve miR-96-5p'nin ifade düzeyleri diğer iki hücreye kıyasla daha düşük oranda olduğu gösterilmiştir. A549 ve MCF7 hücrelerinde ise ifade düzeylerinin birbirine yakın olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra her üç hücre türünde de AIFM3 ve miR-96-5p'nin ifade düzeyleri arasında negatif yönlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 1C). miRNA-hedef etkileşimlerini gösteren online veri tabanlarında AIFM3 genini hedefleyebilecek olası miRNA'lara bakılmıştır. TargetScan veritabanında<sup>11</sup> ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) AIFM3 geninin 3'UTR bölgesinde 68-74 pozisyonları arasında miR-96-5p'nin 7mer-m8'lik (7mer-m8: Olgun miRNA'nın 2-8 pozisyonları ile tam eşleşme) uyumu gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1D).



**Şekil 1.** Kanser hücrelerinde AIFM3 ve miR-96-5p'nin ifade düzeylerinin gösterilmesi. **A.** U2-OS, MCF7 ve A549 kanser hücrelerinde AIFM3 geninin ifade düzeyi. **B.** U2-OS, MCF7 ve A549 kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin ifade düzeyi. **C.** Farklı kanser hücrelerinde AIFM3 ile miR-96-5p arasındaki korelasyon. **D.** AIFM3 geninin 3'UTR bölgesinde miR-96-5p'nin hedef uyumu dizilimlerinin gösterilmesi.

### Kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin overekspresyonu

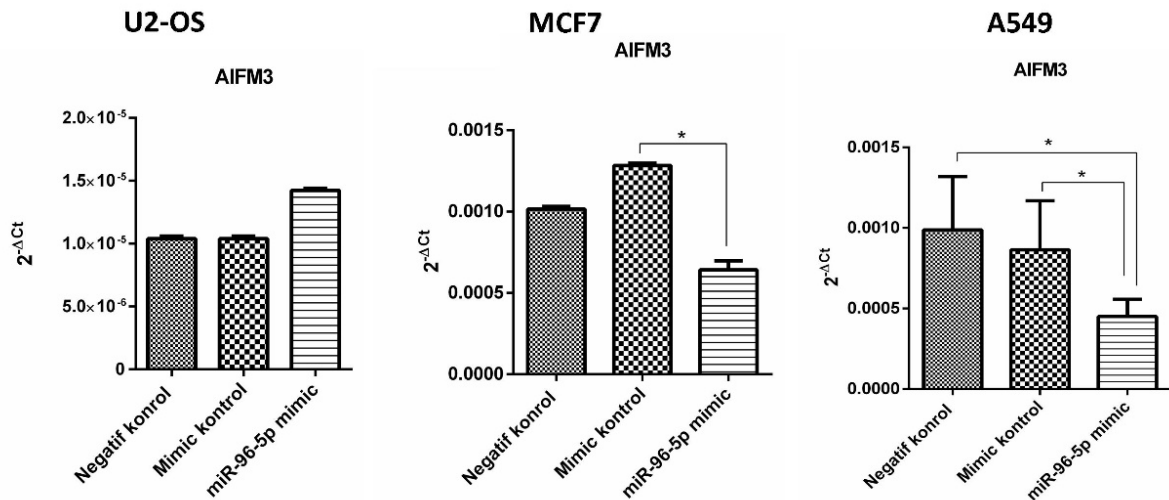
Farklı kanser türlerinde ifade düzeyleri gösterilen miR-96-5p'nin mimiği bu hücelere transfekte edilmiştir ve ifade düzeyleri artırılmıştır. Lipofektamin aracılı yapılan bu transfeksiyon sonucu farklı kanser hücrelerinde kontrol mimik ve negatif kontrole kıyasla miR-96-5p mimiği verilen gruplarda bu miRNA'nın ifade düzeyinin ciddi oranda arttığı gösterilmiştir (Şekil 2). U2-OS osteosarkom hücrelerinde mimik kontrole kıyasla mimik verilen grupta miR-96-5p'nin yaklaşık 2300 kat ( $p<0,0001$ ) artış gösterdiği bulunmuştur. Bununla beraber MCF7 hücrelerinde yaklaşık 1500 kat ( $p<0,0001$ ), A549 hücrelerinde ise yaklaşık 1200 kat ( $p<0,0001$ ) artış olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2. U2-OS, MCF7 ve A549 hücrelerinde miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasındaki miR-96-5p ifade seviyesinin gösterilmesi. \*\*\*\* $p<0,0001$

### MiR-96-5p'nin apoptoz ilişkili genlerin ifadesine etkisi

MiR-96-5p ile transfekte edilmiş farklı türdeki kanser hücrelerinde RNA izolasyonu yapılarak AIFM3 ve bazı apoptoz ile ilişkili genlerin ifade düzeyleri analiz edilmiştir (Şekil 3). Bu bağlamda miR-96-5p ile transfekte edilen U2-OS hücrelerinde AIFM3 geninin ifade düzeyinde herhangi anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. Ancak, MCF7 ( $p=0,015$ ) ve A549 ( $p=0,024$ ) hücrelerinde kontrole kıyasla miR-96-5p mimik verilen gruplarda AIFM3 geninin ifade seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu bulunmuştur. Aralarındaki negatif korelasyona ek olarak artmış miR-96-5p'nin ifadesine karşın AIFM3'ün ifadesinin azalması aralarında direkt bir ilişki olabileceğini desteklemektedir.

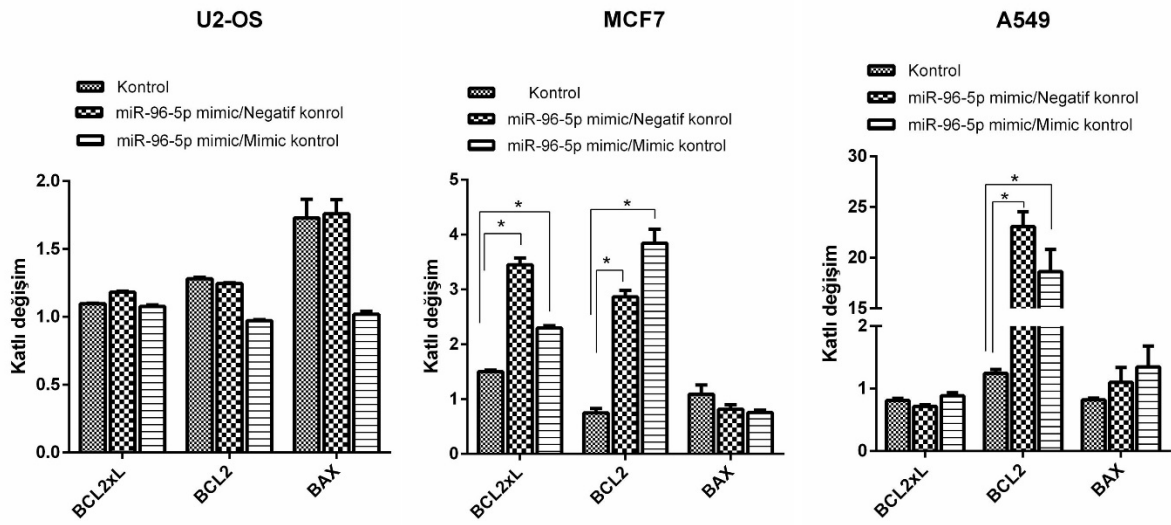


Şekil 3. miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında AIFM3 geninin ifade düzeyindeki değişimlerin gösterilmesi. \* $p<0,05$

MiR-96-5p AIFM3 genini negatif yönde düzenleyerek onun ifade seviyesinin düşmesine neden olmaktadır (Şekil 4). Bunun yanında anti-apoptotik BCLxL (BCL2 like 1), BCL2 (B cell



leukemia/lymphoma 2 apoptosis regulator) ve pro-apoptotik BAX (BCL2 associated X, apoptosis regulator) gibi apoptoz ile ilişkili genlerini de doğrudan ve/veya dolaylı olarak etkileyerek apoptozun baskılanmasında görev alabilir. U2-OS hücrelerinde miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında AIFM3 geninin ifade düzeyinde herhangi anlamlı bir değişim saptanmamıştı. Buna benzer olarak BCLxL, BCL2 ve BAX genlerinin ifade düzeylerinde de herhangi anlamlı bir değişim görülmemiştir. MCF7 hücrelerinde ise miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında BCL2 ve BCLxL genlerinin ifade düzeyleri kontrole kıyasla artış göstermektedir. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır (BCL2 için  $p=0,0147$ ; BCLxL için  $p=0,043$ ). Bunun aksine MCF7 hücrelerinde BAX geninin ifade düzeyinde bir azalma olduğu ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. A549 hücrelerinde, BCL2 geninin ifade düzeyinde mimik transfeksiyonu sonrasında ciddi bir artış olduğu bulunmuştur ( $p=0,026$ ). Ama BCLxL ve BAX genlerinin ifade düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.



**Şekil 4.** miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında U2-OS, MCF7 ve A549 hücrelerinde BCLxL, BCL2 ve BAX genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. \* $p<0,05$

## TARTIŞMA

Kanser ile ilgili çalışmalar son yıllarda ciddi bir ivme kazanmıştır. Kanserinin moleküler mekanizmaları aydınlatılırken önemli yollarda görevli birçok miRNA molekülünün olduğu gösterilmiştir. Kanserde düzensiz ifade edilen bu küçük moleküllerin ayırıcı tanı ve tedavide hedeflenebilir olması gündeme gelmiştir<sup>2</sup>. Tedaviye yönelik olarak, kanserde yüksek ifade edilen miRNA'lar antogomiR'leri kullanılarak baskılanabilmektedir veya düşük ifade edilen miRNA'lar mimikleri kullanarak ifade seviyeleri artırılabilir<sup>12</sup>. Biz bu çalışmada farklı kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin ifade seviyesini artırarak AIFM3 geni ve dolayısıyla apoptoz ile ilişkisini inceledik.

Daha önceki yapılan çalışmalarda miR-96-5p'nin birçok kanser çeşidinde yüksek ifade edildiği gösterilmiştir. Meme kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri ve kolon kanseri gibi farklı kanserlerde miR-96-5p yüksek ifade edilerek onkogenik fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir<sup>3,5,8</sup>. Ayrıca, miR-96-5p'nin meme kanserinde invazyonu ve metastazı artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir<sup>13</sup>. Bizim çalışmamızda ise miR-96-5p'nin akciğer ve meme kanseri hücrelerinde osteosarkom hücrelerine kıyasla ifade seviyesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Osteosarkom ve renal kanser gibi bazı kanser türlerinde miR-96-5p'nin ifade seviyesinin düşük olduğu ve tümör baskılayıcı özellik gösterdiği

bildirilmiştir<sup>14,15</sup>. Bizim çalışmamızda ise bu bulguları destekler biçimde U2-OS osteosarkom hücrelerinde miR-96-5p'nin ifade seviyesinin düşük olduğu bulunmuştur.

Günümüze kadar yapılan miR-96-5p ile ilişkili çalışmalarda miR-96-5p'nin onkojenik veya tümör baskılayıcı rollerinin olduğu ve birden fazla geni hedeflediği gösterilmiştir<sup>3,6,14</sup>. Bir molekülün/genin hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik fonksiyonlarının olması bu genin hedeflediği moleküllerin farklı olması ile açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda farklı kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin birden fazla hedeflediği gen olduğu gösterilmiştir. Örneğin; prostat ve mesane kanseri hücrelerinde miR-96-5p'nin mimik transfeksiyonu sonrasında FOXO1 geninin ifade seviyesinin azaldığı ve bu genin direk hedefi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada artmış miR-96-5p ifade seviyesi prostat ve mesane kanseri hücrelerinde apoptozun baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir<sup>3</sup>. Bunun yanı sıra, meme kanseri hücrelerinde miR-96-5p'nin MTSS1 genini baskılayarak metastazı arttığı gösterilmiştir<sup>6</sup>. Hepatosellüler kanser hücrelerinde ise onkojenik fonksiyon gösteren miR-96-5p CASP9'ü hedefleyerek apoptozda etkili olabilmektedir<sup>5</sup>. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde miR-96-5p'nin SMAD9'u baskılayarak cisplatinle uyarılmış apoptozu azalttığı ve cisplatin dirençliliğini arttırdığı gösterilmiştir<sup>16</sup>. Ancak kanserde miR-96-5p'nin AIFM3 genini hedeflediğini gösteren herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bizim çalışmamızda online veri tabanlarında AIFM3 genini hedefleyebilecek potansiyel miRNA'lar arasında miR-96-5p'nin en iyi uyum gösteren miRNA olduğu bulunmuştur. Bununla beraber meme, akciğer ve osteosarkom kanser hücrelerinde mimik transfeksiyonu yapılarak AIFM3 geninin ifade değişimleri gösterilmiştir. Meme ve akciğer kanser hücrelerinde miR-96-5p'nin mimik transfeksiyonu sonrasında AIFM3 geninin ifade seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı, ancak osteosarkom hücrelerinde herhangi bir değişim olmadığı gösterilmiştir. Farklı kanser türlerindeki bu farklı sonuçlar miR-96-5p'nin onkojenik veya tümör baskılayıcı roller oynayabileceğini ve bunu da farklı genleri hedefleyerek yapabileceği kanıtını desteklemektedir.

MiR-96-5p'nin bazı kanser hücrelerinde apoptozu arttırdığı bazılarında ise baskıladığı gösterilmiştir. Bu durum miR-96-5p'nin çift yönlü fonksiyonu olmasından kaynaklanmaktadır. Osteosarkom hücrelerinde miR-96-5p'nin ifade düzeyinin artırılması sonucunda apoptozun arttığı, hücre çoğalmasının, migrasyonun ve invazyonun azaldığı bulunmuştur<sup>14</sup>. Bunun aksine, meme kanserinde miR-96-5p'nin ifade düzeyinin artırılması apoptozun baskılanması ile sonuçlanmıştır<sup>13</sup>. Bizim çalışmamızda da bu bulguları destekler biçimde miR-96-5p'nin ifade düzeyinin artırılması sonucu meme ve akciğer kanseri hücrelerinde apoptotik sinyalin baskılandığı bulunmuştur. Bu hücrelerde miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında anti-apoptotik BCL2 ve BCLxL genlerinin ifade düzeyleri ciddi oranda artış göstermiştir. Ancak, U2-OS hücrelerinde miR-96-5p mimik transfeksiyonu sonrasında AIFM3 ve apoptoz ile ilişkili diğer genlerin ifade seviyelerinde bir değişim olmamıştır.

## Sonuç

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışmada, miR-96-5p'nin meme ve akciğer hücrelerinde, AIFM3 genini hedefleyerek apoptozu baskılayabileceği gösterilmiştir. Elde edilen bu bulguların desteklenmesi, miR-96-5p ve AIFM3 ile arasındaki direkt ilişkinin belirlenmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca miR-96-5p'nin AIFM3 aracılığı ile apoptozu baskıladığını kapsamlı bir şekilde gösterebilmek için miR-96-5p mimiği transfekte edilmiş hücrelerin apoptotik hücre popülasyonları Flow sitometri yöntemi ile belirlenmelidir.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma herhangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

#### Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019;69(1):7-34.
2. Dalmay T, Edwards D. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*. 2006;25(4):6170-5.
3. Yu J-J, Wu Y-X, Zhao F-J, Xia S-J. miR-96 promotes cell proliferation and clonogenicity by down regulating of FOXO1 in prostate cancer cells. *Med. Oncol*. 2014;31(4):910.
4. Bao Y, Wang Y, Liu Y, Wang S, Wu B. MiR-96 expression in prostate cancer and its effect on the target gene regulation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(20):4548-6.
5. Iwai N, Yasui K, Tomie A, Gen Y, Terasaki K, Kitaichi T, et al. Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2018;53(1):237-5.
6. Xie W, Sun F, Chen L, Cao X. miR-96 promotes breast cancer metastasis by suppressing MTSS1. *Oncol Lett*. 2018;15(3):3464-1.
7. Ress AL, Stiegelbauer V, Winter E, Schwarzenbacher D, Kiesslich T, Lax S, et al. MiR-96-5p influences cellular growth and is associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Mol. Carcinog*. 2015;54(11):1442-50.
8. Zheng A, Zhang L, Song X, Wang Y, Wei M, Jin F. Clinical implications of a novel prognostic factor AIFM3 in breast cancer patients. *BMC cancer*. 2019;19(1):451.
9. Ferreira P, Villanueva R, Martínez-Júlvez M, Herguedas B, Marcuello C, Fernandez-Silva P, et al. Structural Insights Into the Coenzyme Mediated Monomer-Dimer Transition of the Pro-Apoptotic Apoptosis Inducing Factor. *Biochemistry*. 2014;1;53(25):4204-15.
10. Xie Q, Lin T, Zhang Y, Zheng J, Bonanno JA. Molecular Cloning and Characterization of a Human AIF-like Gene With Ability to Induce Apoptosis. *J Biol Chem*. 2005;280(20):19673-81.
11. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-0.
12. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-9.
13. Hong Y, Liang H, Wang Y, Zhang W, Zhou Y, Yu M, et al. miR-96 promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PTPN9 in breast cancer. *Sci. Rep*. 2016;6:37421.
14. Yao Q, Pei Y, Zhang X, Xie B. microRNA-96 acts as a tumor suppressor gene in human osteosarcoma via target regulation of EZRIN. *Life Sci*. 2018;203:1-11.
15. Yu N, Fu S, Liu Y, Xu Z, Liu Y, Hao J, et al. miR-96 suppresses renal cell carcinoma invasion via downregulation of Ezrin expression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34(1):107.
16. Wu L, Pu X, Wang Q, Cao J, Xu F, Xu LI, et al. miR-96 induces cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by downregulating SAMD9. *Oncol Lett*. 2016;11(2):945-2.