



***OVER KANSERİ HÜCRELERİNDE PRİMA-1^{Met} TEDAVİSİNE YANIT OLARAK DEĞİŞEN miRNA EKSPRESYON ANALİZİ**
ANALYSIS OF DIFFERENTIAL miRNA EXPRESSION IN RESPONSE TO PRİMA-1^{Met} THERAPY IN OVARIAN CANCER CELLS

Nilüfer Gülmen İMİR^{1,2,*}, Esra AYDEMİR³, Ece ŞİMŞEK⁴

¹ Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji AD, Antalya,

² Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD, Antalya,

³ Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya,

⁴ Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Antalya,

ÖZ

Tümör hücrelerinde p53 fonksiyonunun restorasyonu, over kanseri tedavisinde çekici bir strateji olacağı düşünülmektedir, çünkü p53 mutasyonlarının over kanserlerinde görülme sıklığı %50-60 arasındadır. Küçük molekül Prima-1^{Met}'in, p53'ün tümör baskılayıcı fonksiyonunu geri kazandırdığı ve insan tümör hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. MikroRNA'lar hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenler ve hücre proliferasyonu, farklılaşma ve hematopoez gibi çok çeşitli fizyolojik ve biyolojik süreçlerde etki yapar. Epitelyalover kanserinde yapılan çok sayıda miRNA profillemesi çalışmalarında, kemoterapi direnci ve hastalık progresyonu ile ilişkili miRNA'lar tanımlanmıştır, fakat, Prima-1^{Met}'e yanıt olarak miRNA'ların tutulumu hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu çalışmada, apoptotik etkisi olduğu bilinen Prima-1^{Met} ile muamele edilmiş over kanseri hücre hatlarında, bu ilaca yanıt olarak ekspresyonu değişen miRNA'ların belirlenmesini hedeflendi ve bunun için ilaç verilen hücre hatlarında hem kanser hem de apoptosis yollarını hedefleyen miRNA'ların ekspresyonları miScript PCR array ile belirlenip analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, her iki hücre hattında da hem over kanseri hem de apoptosisle ilişkili olarak Prima-1^{Met} uygulamasıyla ekspresyonu artan miRNA'lar; miRNA-1, miRNA-134, miRNA-141, miRNA-143, miRNA-145, miRNA-204, miRNA-205, miRNA-214, miRNA-29a ve miRNA-29c olarak belirlenmiştir. Ekspresyonu azalan miRNA'lar ise miRNA-21, miRNA-221 ve miRNA-222 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma Prima-1^{Met} indüklediği apoptosisin moleküler mekanizmasının aydınlatılması için bir temel oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: Prima-1^{Met}, miRNA, PCR-array, over kanseri, ekspresyon.

*Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2017-2656 nolu proje ile desteklenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 22.03.2019

Makale Kabul Tarihi: 13.03.2020

ABSTRACT

Restoration of p53 function in tumor cells will be an attractive strategy for ovarian cancer therapy since p53 mutations are found in more than 50 % of ovarian cancers. The small molecule Prima-1^{Met} has been shown to restore tumor suppression function of p53, inhibit cell growth and induce apoptosis in human tumor cells. MicroRNAs (miRNAs) regulate gene expression at both transcriptional and translational levels as well as acting in a wide variety of physiological and biological processes. Numerous miRNAs associated with chemotherapy resistance and disease progression have been described in a large number of miRNA profiling studies in epithelial ovarian cancer, but little is known about the involvement of miRNAs in response to Prima-1^{Met}. We aimed to determine the expression of miRNAs in response to Prima-1^{Met} treatment, which is known to have apoptotic effects in ovarian cancer cell lines. The expressions of miRNAs targeting both cancer and apoptosis pathways in drug-delivered cell lines were determined and analyzed by miScript PCR array. As a result of the assay, the expression of miRNA-1, miRNA-134, miRNA-141, miRNA-143, miRNA-145, miRNA-204, miRNA-205, miRNA-214, miRNA-29a and miRNA-29c increased in response to Prima-1^{Met} in both cell lines, while the expression of miRNA-21, miRNA-221 and miRNA-222 was reduced. In conclusion, this study provides a basis for elucidating the molecular mechanism of Prima-1^{Met}-induced apoptosis.

Keywords: Prima-1^{Met}, miRNA, PCR-array, ovarian cancer, expression.

Corresponding Author: Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer Gülmen İMİR, Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Biyoloji AD, Antalya
Telefon : 0 242 310 6935
Fax : 0 242 226 1953
ORCID ID: 0000-0002-5508-8666, ngimir@akdeniz.edu.tr
ORCID ID: 0000-0002-5206-7333esra@akdeniz.edu.tr
ORCID ID: 0000-0002-7642-6601 ecesimsek@akdeniz.edu.tr

GİRİŞ

Her yıl, dünya üzerinde 100.000'den fazla kadın over kanseri nedeniyle ölmektedir (1). Epitelyalover kanseri (EOC) tüm over malignitelerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturur ve kadınlardaki jinekolojik maligniteler arasında en ölümcül olanıdır. Tümör baskılayıcı p53, özellikle hücre döngüsü düzenlemesi, apoptoz ve genomikstabilite ile ilgili çoklu genlerin transkripsiyonunu aktive ederek hücre büyümesine aracılık eder (2-4). P53 ayrıca antikanser tedavileri dahil olmak üzere çeşitli stres sinyallerine karşı cevaptan sorumludur (3). P53 tümör baskılayıcı genin mutasyonu, insan kanserlerinde en sık bildirilen genetik kusurdur ve over tümörlerinin yaklaşık %50'sinden fazlasında gözlenir (5-8). Sonuç olarak, mutant p53 proteinleri, tümörün baskılanmasına aracılık eden hedef genlere bağlanamaz ve bunları harekete geçiremez. Son yıllarda, p53'ün kanseri tedavi etmek için bir hedef olarak kullanılması için çeşitli girişimler yapılmıştır ve mutant p53'ün onkojenik özelliklerini tersine çevirebildikleri iddiasıyla çeşitli moleküller tanımlanmıştır (9). Bunlardan en yaygın olarak araştırılan Prima-1 (2,2-bis (hidroksimetil) -l-azabisiklo (2,2,2) oktan-3-on) ve metillenmiş türevi olan Prima-1^{Met}'dir (10). Prima-1^{Met}'in farklı p53 mutasyonlarını içeren malignan hücre kültürlerinde ve bazı ksenograft hayvan tümörlerinde hücreyi büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (11-18).

Mikro RNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 22 bp boyutunda, kısa kodlamayan ve yüksek oranda korunmuş RNA'ların bir sınıfıdır (19). MiRNA'lar hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenler ve hücre proliferasyonu, farklılaşma ve hematopoiez gibi çok çeşitli fizyolojik ve biyolojik süreçlerde etki yapar (20). Son zamanlardaki çalışmalardan elde edilen kanıtlar, miRNA'ların, onkogenler veya tümör süpresör genler olarak işlev görerek tümör patogeneğinde kritik bir rol oynadığına (21), ayrıca miRNA'ların, tümör gelişiminde yer alan sinyal yollarını ve kritik genlerin ekspresyonunu modüle edebilmesiyle tümör fenotipinin regülatörleri olduğuna işaret etmektedir (22,23). Epitelyalover kanserinde yapılan çok sayıda miRNA profillemesi çalışmalarında, kemoterapi direnci ve hastalık progresyonu ile ilişkili miRNA'lar tanımlanmıştır (24-29). Yapılan başka bir çalışmada ise miR-138'in, over kanseri hücrelerinde SOX4 ve HIF-1a genlerini hedefleyerek invazyon ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir (30). Bununla birlikte, refraktör hematolojik malignansiler de ve prostat kanserinde ilk insan klinik çalışmasında test edilen küçük molekül ağırlıklı antitümör ajan olan Prima-1^{Met}'e yanıt olarak miRNA'ların tutulumu hakkında çok az şey bilinmektedir (31). Bu çalışmada, Prima-1^{Met} ile muamele edilmiş p53 yabanıl tip ve mutant formlarını içeren over kanseri hücre hatlarında, bu ilaca yanıt olarak ekspresyonu değişen miRNA'ların belirlenmesini hedefledik. Prima-1^{Met}'in antikanser etkisini apoptotik yollar üzerinden göstermesi nedeniyle, özellikle over kanseri ve apoptosis yollarını hedefleyen miScriptmiRNA PCR array panelleri seçilerek Prima-1^{Met} uygulamasının bu yollarda hangi miRNA'ların ekspresyonlarını değiştirdiği analiz edildi. Her iki yolak için seçilen miScriptmiRNA PCR array panellerinde toplam 168 (Tablo I) adet miRNA'nın ekspresyonları değerlendirildi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürü Koşulları ve İlaç uygulama

Bu çalışmada, amacımıza yönelik olarak, p53 mutant Caov-3 ve (ATCC, HTB-75) ve p53 yabanıl tip A2780 (Sigma, 93112519) olmak üzere iki farklı over kanseri hücre hattı seçilmiştir. Hücreler %10 fetalbovin serum (FBS), 100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin içeren DMEM(Gibco) besiyeri içinde 37°C ve %5 CO₂'li inkübatör de kültüre edilmiştir. Hücreler belirli zaman aralıklarında tripsinize edilerek stokları oluşturulmuş ve deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Prima-1^{Met} (SantaCruz), UltraPure su (Sigma) içinde sulandırılarak 50µM konsantrasyonluk stok solüsyonu hazırlanıp -20°C'de saklanmıştır.

Hücreler 60mm'lik petrilere 1x10⁶ hücre/petri olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra Prima-1^{Met}p53 yabanıl tip A2780 hücrelerine 20 µM ve p53 mutant Caov-3 hücrelerine ise 40 µM dozlarında uygulanmış ve 8 saat 37°C ve %5 CO₂'li inkübatör de inkübe edilmiştir (32).

miRNA PCR Array Analizi

Prima-1^{Met} uygulanmış ve uygulanmamış A2780 ve Caov-3 hücrelerinden miRNA Easy kiti (Qiagen, 217004) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların miktar tayini Nanodrop özelliği olan ELISA okuyucuda (Thermo Fisher Scientific) spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Ardından, miScript II RT kit (Qiagen, 218160) protokolüne göre revers transkriptaz yöntemiyle cDNA elde edilmiştir. Örnekler PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C dondurucuda saklanmıştır. Array PCR için -20°C dondurucuda saklanan cDNA örnekleri ve reaksiyonda kullanılacak tüm bileşenler oda ısısına getirildikten sonra PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım 96 kuyucuklu PCR array plaklarına her bir kuyucukta 25 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından Applied Step-One Realtime PCR cihazında, başlangıçta 1 döngü (95°C'de 15 dk) ve sonrasında 40 döngüden (denatürasyon için 94°C'de 15 sn, annealing için 55°C'de 30 sn ve zincir uzama için 70°C'de 30 sn) oluşan programda yürütülmüştür (33). Her bir reaksiyon üç kez tekrarlanmıştır.

Verilerin Analizi

Döngü eşiği (Ct), floresan sinyalin gerçek zamanlı PCR'de eşiği geçmesi için gereken devir sayısı olarak tanımlandı. Ct değerleri 35'den büyük olanlar, testin tespit seviyesinin altında kabul edildi. PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri, Qiagen SA Biosciences tarafından sağlanan miScript miRNA PCR Array web tabanlı yazılım aracı kullanılarak analiz edildi. Çalışma grupları arasında her miRNA için nispi ekspresyon seviyelerinin kat değişiklikleri, 2^(-ΔΔ Ct) metodu (34) ile analiz edildi ve referans grubuna göre kat değişikliği olarak sunuldu. Elde edilen tüm veriler ortalama ± SD değerleri halinde kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Graph Pad Instat 3 istatistik programında Kolmogorov-Smirnov testiyle değerlendirildikten sonra kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farklılık, Student's t-testi ile belirlendi. P değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

A2780 ve Caov-3 hücrelerinin Prima-1^{Met} ile 8 saat muamelesi sonucunda Over Kanseri ile ilişkili miRNA PCR

Tablo I. Çalışmada analizi yapılan miRNA'lar ve ilişkili olduğu paneller

miRNA	İlgili Panel	miRNA	İlgili Panel	miRNA	İlgili Panel	miRNA	İlgili Panel
let-7a	Ortak	miR-154	Over kanseri	miR-214	Ortak	miR-373	Over kanseri
let-7b	Over kanseri	miR-155	Over kanseri	miR-218	Apoptosis	miR-375	Over kanseri
let-7c	Ortak	miR-15a	Ortak	miR-22	Over kanseri	miR-376a	Over kanseri
let-7d	Over kanseri	miR-15b	Apoptosis	miR-221	Ortak	miR-377	Over kanseri
let-7e	Apoptosis	miR-16	Over kanseri	miR-222	Ortak	miR-378a	Apoptosis
let-7g	Apoptosis	miR-17	Apoptosis	miR-223	Over kanseri	miR-379	Over kanseri
let-7i	Over kanseri	miR-181a	Apoptosis	miR-224	Over kanseri	miR-409	Apoptosis
miR-1	Ortak	miR-181b	Apoptosis	miR-22	Over kanseri	miR-410	Over kanseri
miR-10b	Over kanseri	miR-181c	Apoptosis	miR-23a	Apoptosis	miR-424	Over kanseri
miR-100	Over kanseri	miR-181d	Apoptosis	miR-24	Apoptosis	miR-429	Over kanseri
miR-101	Ortak	miR-182	Over kanseri	miR-25	Apoptosis	miR-432	Over kanseri
miR-103a	Over kanseri	miR-183	Apoptosis	miR-26a	Ortak	miR-449a	Apoptosis
miR-105	Over kanseri	miR-185	Apoptosis	miR-26b	Apoptosis	miR-451a	Apoptosis
miR-106b	Ortak	miR-186	Apoptosis	miR-27a	Ortak	miR-487b	Over kanseri
miR-122	Apoptosis	miR-192	Apoptosis	miR-29a	Ortak	miR-491	Apoptosis
miR-125a	Apoptosis	miR-193a	Apoptosis	miR-29b	Apoptosis	miR-492	Over kanseri
miR-125b	Ortak	miR-193b	Apoptosis	miR-29c	Ortak	miR-493	Over kanseri
miR-126	Over kanseri	miR-194	Apoptosis	miR-302b	Over kanseri	miR-497	Apoptosis
miR-128	Apoptosis	miR-195	Ortak	miR-30a	Ortak	miR-507	Over kanseri
miR-1285	Apoptosis	miR-199a	Over kanseri	miR-30b	Apoptosis	miR-512	Apoptosis
miR-133a	Ortak	miR-200a	Over kanseri	miR-30c	Apoptosis	miR-514a	Over kanseri
miR-133b	Apoptosis	miR-200b	Over kanseri	miR-30d	Apoptosis	miR-519d	Over kanseri
miR-134	Ortak	miR-200c	Ortak	miR-30e	Ortak	miR-519e	Over kanseri
miR-137	Over kanseri	miR-203a	Ortak	miR-31	Apoptosis	miR-520e	Over kanseri
miR-140	Over kanseri	miR-204	Ortak	miR-32	Apoptosis	miR-542	Apoptosis
miR-141	Ortak	miR-205	Ortak	miR-325	Over kanseri	miR-637	Over kanseri
miR-143	Ortak	miR-206	Ortak	miR-335	Over kanseri	miR-7	Apoptosis
miR-144	Apoptosis	miR-20a	Apoptosis	miR-338	Apoptosis	miR-708	Apoptosis
miR-145	Ortak	miR-200a	Over kanseri	miR-346	Over kanseri	miR-9	Ortak
miR-146a	Apoptosis	miR-21	Ortak	miR-34a	Apoptosis	miR-92a	Apoptosis
miR-147a	Over kanseri	miR-210	Apoptosis	miR-34b	Over kanseri	miR-93	Over kanseri
miR-149	Apoptosis	miR-211	Over kanseri	miR-34c	Apoptosis	miR-98	Apoptosis
miR-152	Over kanseri	miR-212	Apoptosis	miR-365a	Ortak	miR-99a	Over kanseri
miR-153	Apoptosis	miR-154	Over kanseri	miR-370	Over kanseri		

array analizine göre ekspresyonu değişen 15 adet miRNA tespit edildi. Bu 15 miRNA'nın Prima-1^{Met} uygulanmış hücrelerdeki, kontrole göre (Prima-1^{Met} uygulanmamış) değişen ekspresyonlarındaki kat değişiklikleri Tablo II ve Tablo IV'de verildi.

hücre hattı ve her iki PCR array sonuçları birlikte ele alındığında bu miRNA'lardan sadece miR-141'in artışı istatistiksel olarak önemli değildir ($p>0.05$). Söz konusu diğer miRNA'lar hem her iki hücrede, hem de her iki PCR array sonucunda Prima-1^{Met} uygulamasıyla istatis-

Tablo II.A2780 ve Caov-3 hücrelerinde Prima-1-met tedavisine yanıt olarak ekspresyonları artan over kanseri ile ilişkili miRNA'lar

miRNA	A2780 (Ort±SD)	P değeri	Caov-3 (Ort±SD)	P değeri
miRNA-1	4,37±0,73	<0,0001	4,28±0,83	<0,0001
miRNA-134	4,39±0,77	<0,0001	4,32±1,12	0,0001
miRNA-141	3,72±0,90	<0,0001	3,82±0,88	<0,0001
miRNA-143	3,81±0,73	<0,0001	3,75±0,66	<0,0001
miRNA-145	3,60±0,89	<0,0001	3,61±0,71	<0,0001
miRNA-204	6,37±1,50	<0,0001	6,23±0,83	<0,0001
miRNA-205	5,99±0,75	<0,0001	6,06±0,72	<0,0001
miRNA-214	7,50±0,83	<0,0001	7,46±1,85	<0,0001
miRNA-29a	15,42±3,46	<0,0001	14,86±3,94	<0,0001
miRNA-29c	8,21±1,65	<0,0001	8,31±2,05	0,0001

Tablo IV:A2780 ve Caov-3 hücrelerinde Prima-1-met tedavisine yanıt olarak ekspresyonları azalan over kanseri ile ilişkili miRNA'lar

miRNA	A2780 (Ort±SD)	P değeri	Caov-3 (Ort±SD)	P değeri
miRNA-21	1,78±0,67	0,0015	1,84±0,90	<0,0001
miRNA-221	0,38±0,09	<0,0001	0,28±0,13	0,0003
miRNA-222	0,96±0,13	<0,0001	0,85±0,28	<0,0001
miRNA-93	1,67±0,19	<0,0001	1,61±0,27	<0,0001
miRNA-99	1,93±0,15	<0,0001	1,87±0,77	<0,0001

A2780 ve Caov-3 hücrelerinin Prima-1^{Met} ile sekiz saat muamelesi sonucunda Apoptosis ile ilişkili miRNA PCR array analizine göre ekspresyonu değişen 19 adet miRNA tespit edildi. Bu 19miRNA'nınPrima-1^{Met} uygulanmış A2780 hücrelerindeki kontrole göre (Prima-1^{Met} uygulanmamış) değişen ekspresyonlarındaki kat değişiklikleri Tablo III ve Tablo V'de verildi.

TARTIŞMA

Mutant p53'ün kanser hücrelerinde işlevini eski haline getirmek için çeşitli stratejiler tasarlanmıştır (35). Bunlar arasında, mutant p53'ün onkogenik özelliklerini tersine çevirebildikleri iddiasıyla çeşitli küçük moleküllerin tanımlanması önemli yer teşkil etmektedir (36-38). Prima-1^{Met}, yabanıl tip fonksiyonunu mutantp53'e geri kazandırdığı bildirilen düşük moleküler ağırlıklı bir bileşiktir (38). Bu çalışmada, ilk kez, Prima-1^{Met} ile muamele edilmiş p53 yabanıl tip ve mutant formlarını içeren over kanseri hücre hatlarında, bu moleküle yanıt olarak ekspresyonu değişen over kanseri ve apoptosisle ilişkili miRNA'ları belirledik.

Yapılan PCR array deneyleri sonucunda, her iki hücre hattında da hem over kanseri hem de apoptosisle ilişkili olarak Prima-1^{Met} uygulamasıyla ekspresyonu artan miRNA'lar; miRNA-1, miRNA-134, miRNA-141, miRNA-143, miRNA-145, miRNA-204, miRNA-205, miRNA-214, miRNA-29a ve miRNA-29c olarak belirlenmiştir. Her iki

tiksel olarak önemli derecede artmıştır ($p<0.05$). Yine array analizleri sonucunda, her iki hücre hattında da hem over kanseri hem de apoptosisle ilişkili olarak Prima-1^{Met} uygulamasıyla ekspresyonu azalan miRNA'lar ise miRNA-21, miRNA-221 ve miRNA-222 olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$).

MikroRNA'lar, mRNA translasyonunu baskılayarak ve mRNA stabilitesini azaltarak gen ekspresyonunu düzenleyen 18-25 nükleotit uzunlukta, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir (39-41). İnsan kanserlerinde yapılan sayısız araştırma, miRNA'ların ekspresyonunun düzensiz olduğunu göstermiştir ve bu miRNA'lar, düzenleyici moleküller olarak, tümör hücrelerinin farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz da dahil olmak üzere doğal biyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (42,43). Birçok miRNA, birçok tümörde azaltılmış durumdadır ve tümör baskılayıcı genler olarak işlev görmektedir (44) ve bu tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun artırılması kanser tedavileri arasında önemli bir yer teşkil etmeye başlamıştır. Bu çalışmada, over kanseri hücrelerinin Prima-1^{Met}ile muamele edilmesi sonucunda ekspresyonu artan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar arasında yer almaktadır. Örneğin miRNA-1, insan kanserlerinde en tutarlı olarak aşağı regüle edilmiş miRNA'lardan biridir. Ayrıca, miRNA-1 ekspresyonunun metastatik hastalıkta azaldığı gösterilmiştir ve tümör nüksünün aday bir göstergesidir.

Tablo III:A2780 ve Caov-3 hücrelerinde Prima-1-met tedavisine yanıt olarak ekspresyonları artan apoptos ile ilişkili miRNA'lar

miRNA	A2780 (Ort±SD)	P değeri	Caov-3 (Ort±SD)	P değeri
miRNA-1	3,91±1,32	0,0006	3,53±1,03	0,0004
miRNA-134	4,21±1,10	0,0001	3,95±0,43	<0,0001
miRNA-141	3,51±1,31	0,0009	3,72±0,88	<0,0001
miRNA-143	3,68±1,13	0,0002	3,59±1,00	0,0002
miRNA-145	3,72±0,96	<0,0001	3,62±0,78	<0,0001
miRNA-204	5,54±1,46	0,0162	6,18±0,90	<0,0001
miRNA-205	5,52±1,74	0,0002	5,14±1,10	<0,0001
miRNA-214	6,85±2,08	0,0001	6,50±0,86	<0,0001
miRNA-29a	12,48±2,32	<0,0001	11,52±1,93	<0,0001
miRNA-29b	5,42±1,17	<0,0001	4,46±1,51	0,0002
miRNA-29c	7,03±1,89	0,0002	6,18±1,06	<0,0001
miRNA-34a	2,17±0,76	0,0125	1,96±0,62	0,0001
miRNA-34c	2,25±0,95	0,0401	2,16±0,44	0,0008

Tablo V:A2780 ve Caov-3 hücrelerinde Prima-1-met tedavisine yanıt olarak ekspresyonları azalan apoptos ile ilişkili miRNA'lar

miRNA	A2780 (Ort±SD)	P değeri	Caov-3 (Ort±SD)	P değeri
miRNA-17			0,66±0,34	<0,0001
miRNA-21	1,47±0,63	<0,0001	1,22±0,77	0,0012
miRNA-221	0,41±0,35	<0,0001	0,52±0,27	0,0002
miRNA-222	0,90±0,57	0,0021	0,69±0,32	0,0002
miRNA-23a	0,38±0,28	0,0004	0,27±0,18	<0,0001
miRNA-92	1,69±0,54	0,0003	1,09±0,37	<0,0001

MiRNA-1'in, Met, HDAC4, PIM1 ve Slugdahlil olmak üzere onkogenlerin ve / veya transkripsiyonel faktörlerin aşağı regülasyonu yoluyla kanser hücresi büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (45,46). Dolayısıyla Prima-1^{Met} muamelesi ile miRNA-1'in ekspresyonunun artmış olması, over kanseri hücrelerinde Prima-1^{Met} tedavisinin miRNA-1 aracılı büyüme inhibisyonuna sebep olabileceğine ışık tutan bir sonuçtur.

Prima-1^{Met} muamelesi ile ekspresyonu anlamlı bir şekilde artan bir diğer miRNA, miRNA-134'tür. Over kanseri hücreleriyle yapılan bir miRNA-profilleme çalışmasında, miRNA-134'ün ekspresyonu oldukça düşük seviyelerde bulunmuştur, fakat bu miRNA'nın nekropik olarak aşırı ekspresyonu sağlandığında over kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu azalttığı görülmüştür (47). Bu çalışma sonucu da, Prima-1^{Met} in over kanseri hücrelerinde miRNA-134'ün ekspresyonunu arttırarak benzer etkilere sahip olabileceğine dair ön bilgi sunmaktadır.

MiRNA-29a, yaptığımız miRNA-PCR-array analizleri sonucunda, Prima-1^{Met} uygulamasıyla ekspresyonu en çok artan miRNA olarak bulunmuştur. Literatürde de çeşitli kanserlerde miRNA-29'un tümör baskılayıcı rolü olduğu gösterilmiştir (48,49). Ayrıca, Saha vd. (2016), miRNA-29a'nın myelomahücrelerinde Prima-1^{Met} ile indüklenerek tümör baskılayıcı aktivite gösterdiğini

rapor etmişlerdir (33).

Tümörlerde ekspresyonu artmış olan miRNA'laronkogen olarak kabul edilebilir. "Oncomirs" olarak adlandırılan bu onkojen miRNA'lar genellikle hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden tümör baskılayıcı gen ve/veya genleri inhibe ederek tümör gelişimini teşvik eder. Farklı kanserlerde belirgin olarak aşırı eksprese edilen birçok miRNA geninin olduğu bulunmuştur. Bunların hepsi onkojenler olarak işlev görür, ancak, sadece birkaçı iyi karakterize edilmiştir (21). Oncomir'ler arasında yer alan miRNA-221 ve miRNA-222, kontrol hücrelerinde ekspresyonu fazla iken Prima-1^{Met} ile muamele edilmiş hücrelerde ekspresyonu anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05). Bu sonuçlarımız literatürü desteklemektedir.

Sonuç olarak, gerçek zamanlı PCR kullanılarak Prima-1^{Met} uygulanmış p53 mutant ve yabancıl tip over kanseri hücrelerinde kontrollere kıyasla ekspresyonları artan ve azalan miRNA'ları gösterdik. Bu miRNA'ların bir veya birkaçının Prima-1^{Met} aracılı apoptosiste yer alıp almadığının daha ileri moleküler çalışmalarla belirlenmesi hedeflerimiz arasındadır.

KAYNAKLAR

1. Sankaranarayanan R and Ferlay J. World wideburden of gynaecological cancer: The size of

- the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006; 20: 207-225.
2. Levine AJ. p53, the cellular gate keeper for growth and division. *Cell* 1997, 88:323-331.
 3. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310.
 4. El-Hizawi S, Lagowski JP, Kulesz-Martin M, et al. Induction of gene amplification as a gain-of-function phenotype of mutant p53 proteins. *Cancer Res* 2002, 62: 3264-3270.
 5. Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RL, et al. p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res* 1993; 53:3103-3108.
 6. Mazurek R, Pujol P, Maudelonde T, et al. p53 mutations in ovarian cancer: a late event? *Oncogene* 1991; 6:1685-1690.
 7. Eccles DM, Brett L, Lessells A, et al. Over expression of the p53 protein and allelic loss at 17p13 in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 1992; 65:40-44.
 8. Kohler MF, Kerns BJ, Humphrey PA, et al. Mutation and over expression of p53 in early stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1993; 81:643-650.
 9. Hoe KK, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: under standing their out etoclinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13: 217-236.
 10. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low molecular-weight compound. *Nat Med* 2002; 8:282-288.
 11. Bykov VJ, Zache N, Stridh H, et al. PRIMA-1 MET synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 2005; 24: 3484-3491.
 12. Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G, et al. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anti cancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 2002; 23: 2011-2018.
 13. Shi H, Lambert JM, Hautefeuille A, et al. In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53 ser249. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1428-1434.
 14. Liang Y, Besch-Williford C, Hyder SM. PRIMA-1 inhibits growth of breast cancer cells by reactivating mutant p53 protein. *Int J Oncol* 2009; 35: 1015-1023.
 15. Zandi R, Selivanova G, Christensen CL, et al. Prima-1 met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. *Clin Cancer Res* 2011, 17: 2830-2841.
 16. Zache N, Lambert JM, Wiman KG, et al. PRIMA-1 MET inhibits growth of mouse tumors carrying mutant p53. *Cell Oncol* 2008; 30: 411-418.
 17. Liang Y, Besch-Williford C, Benakanakere I, et al. Re-activation of the p53 pathway inhibits in vivo and in vitro growth of hormone-dependent human breast cancer cells. *Int J Oncol* 2007; 31: 777-784.
 18. Synnott N, Pierce A, Mullooly M, et al. Mutant p53: a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer? *J Clin Oncol* 2014; 32(5s) [suppl]; abstr 1118].
 19. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, function. *Cell* 2004; 116:281-297.
 20. Ambros V. The functions of animal micro RNAs. *Nature* 2004; 431:350-355.
 21. Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. Micro RNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302:1-12.
 22. Yang D, Sun Y, Hu L, et al. Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer Cell* 2013; 23: 186-199.
 23. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673-677.
 24. Mateescu B, Batista L, Cardon M, et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med* 2011; 17: 1627-1635.
 25. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. Micro RNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 8699-8707.
 26. Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2690-2695.
 27. Yang N, Kaur S, Volinia S, et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker anti-therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 10307-10314.
 28. Dahiya N, Morin PJ. MicroRNAs in ovarian carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: 77-89.
 29. Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, et al. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One* 2008; 18: e2436.
 30. Yeh YM, Chuang CM, Chao KC, et al. MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1a. *Int J Cancer* 2013; 133: 867-878.
 31. Lehmann S, Bykov VJ, Ali D, et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3633-3639.
 32. Yoshikawa N, Kajiyama H, Nakamura K, Utsumi F, Niimi K, Mitsui H, Sekiya R, Suzuki S, Shibata K, Callen D, Kikkawa F. PRIMA-1/MET induces apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species irrespective of p53 status and chemo-sensitivity in epithelial ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 2016; 35: 2543-2552.
 33. Saha MN, Abdi J, Yang Y, et al. MiRNA-29a as a tumor suppressor mediates Prima-1 met-induced anti-metastatic activity by targeting c-Myc. *Oncotarget* 2016; 7(6): 7149-7160.
 34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
 35. Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and the therapeutic potential. *Oncogene* 2007; 26:2243-2254.
 36. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, et al. Restoration of p53 function leads to tumor regression in vivo. *Nature* 2007; 445:661-665.

37. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, et al. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 1999; 286:2507-2510.
38. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *NatMed* 2002; 8:282-288.
39. Izaurralde E. Gene regulation. Breakers and blockers-miRNAs at work, *Science* 2015; 349: 380-382.
40. Thomson DW, Dinger ME. Endogenous micro RNA sponges: evidence and controversy. *Nat Rev Genet* 2016; 17: 272-283.
41. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. Oncomi Raddiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cellymphoma. *Nature* 2010; 467:86-90.
42. Nip H, Dar AA, Saini S, et al. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer. *Oncotarget* 2016; 187(42):68371-68384.
43. Yin K, Liu M, Zhang M, et al. miR-208a-3p suppresses cell apoptosis by targeting PDCD4 in gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7(41):67321-67332.
44. Yamamoto H, Mori M. MicroRNAs as the therapeutic targets and colorectal cancer the therapeutics. *Adv Exp Med Biol* 2016; 937: 239-247.
45. Han C, Zhou Y, An Q, et al. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET. *Tumour Biol* 2015; 36: 6715-6723.
46. King IN, Yartseva V, Salas D, et al. The RNA-binding protein TDP-43 selectively disrupts micro RNA-1/206 incorporation in to the RNA-induced silencing complex. *J Biol Chem* 2014; 289: 14263-14271.
47. Chang C, Yongyi Huang TL, Qin W, et al. MicroRNA-134-3p is a novel potential inhibitor of human ovarian cancer stemcells by targeting RAB27A, *Gene* 2017; 605: 99-107.
48. Zhang YK, Wang H, Leng Y, et al. Over expression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414:233-239.
49. Xu L, Xu Y, Jing Z, et al. Altered expression pattern of miR29a, miR-29b and the target genes in myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol* 2014; 3:17.