

TÜBİTAK

2008-323
✓

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

Q/ 95938

USP32 Geninin Yapısal, Fonksiyonel Karakterizasyonu ve Göğüs Kanserindeki Rolü

**Proje No: 104S241
(Kariyer Projesi)**

Y.Doç. Dr. Ayşe Elif Erson

Haziran 2008
ANKARA

Önsöz

Meme kanseri gelişmekte olan ülke kadınları arasında yaygın ve ölümcül bir hastalıktır. Bu kanser vakalarının büyük bir bölümü bilinmeyen genetik mekanizmalara dayanmaktadır. Neoplastik transformasyon normal hücrelerde meydana çıkan genetik değişiklikler ve bunlara bağlı olarak düzensizleşen mekanizmaların sonucudur. Meme kanserine yol açan bu mekanizmaların anlaşılması yönünde ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, hala altında yatan moleküler ve biyokimyasal olaylar tam anlamıyla bilinmemektedir. Bu projede amacımız meme kanserlerinde amplifikasyona uğradığı bilinen 17q23 bölgesinde bir onkogen adayının incelenmesidir. Proje kapsamında bu onkogen adayının genomik yapısı, transkripsiyonu ve fonksiyonu incelendi. Bu proje kapsamında elde edilen bilgiler ışığında bu onkogen adayını daha detaylı incelememizi gerektirecek sonuçlar elde ettik. Projemiz, ODTÜ Biyoloji Bölümü'nde yürütülmüştür.

4) USP12 Transfeksiyonu

5) Dünden İle İnteraksiyon

6) USP12-GST Protein Yapısı

7) Hücre İçinde USP12 Lokalizasyonu

Teşekkür/Bönuç

Referanslar ...

İçindekiler

Özet.....	5
Abstract	6
Giriş/Genel Bilgiler	7
Gereç ve Yöntemler	10
Biyoinformatik Analizler/Kullanılan Araçlar	10
Transfeksiyon Deneyleri	10
Hücre Proliferasyonu Ölçümleri	10
Fokus Oluşumu	11
Yara Kapanması (wound healing)	11
Östrojen ile İndükleme Deneyleri	11
PCR Analizleri ve Koşulları	11
GST-Füzyon protein ifadesi	12
Hücre patlatma	12
Western Blot	12
Bulgular	14
1. USP32 aşırı üretimi	14
2. Genomik karakterizasyonu/mutasyon taraması	16
3. USP32/USP6 transkriptlerinin meme dokusunda incelenmesi	19
4. USP32 Transfeksiyonu	21
5. Östrojen ile İndüklenme	25
6. USP32-GST Protein Üretimi	27
7. Hücre İçinde USP32 Lokalizasyonu	33
Tartışma/Sonuç	36
Referanslar	40

Tablo ve şekil listeleri

Tablo 1: SPIDEY programı ile belirlenen ekzon büyüklükleri	16
Tablo 2: <i>USP32</i> ve farklı <i>USP6</i> transkriptlerinin normal meme, testis ve over dokularındaki ifadesi. Meme dokusunda sadece <i>USP32</i> ifadesi bulunmuştur	21
Şekil 1: <i>USP32</i> amplifikasyon ve aşırı ifadesi.	14
Şekil 2: A. <i>USP32-GAPDH</i> Yarı-nicel RT-PCR.	15
Şekil 3: Vista karşılaştırmalı analizine göre <i>USP32</i> ve <i>USP6</i> arasındaki benzerlik.....	17
Şekil 4: Vista karşılaştırmalı analizi.	18
Şekil 5: (PIP, Percent Identity Plot) Benzerlik Yüzdesi Grafiği.....	18
Şekil 6: Olası <i>USP6</i> transkriptleri: 210 ORF1-2, 213 ORF 1-2	19
Şekil 7: <i>USP32</i> transkripti meme, testis ve over dokularında ifade edilmektedir..	20
Şekil 8: <i>USP32</i> ve <i>USP6</i> ifadesi.....	20
Şekil 9: Transfeksiyonların doğrulanması.....	22
Şekil 10: MTT Analizi.	23
Şekil 11: Morfolojiler.....	24
Şekil 12: Yara kapanma deneyi.....	24
Şekil 13: RNA örneklerinde DNA kontaminasyonu olmadığını gösteren PCR.....	25
Şekil 14: PCR optimizasyonu.....	26
Şekil 15: <i>USP32</i> ve estradiol.....	26
Şekil 16: ER PCR.....	27
Şekil 17: <i>USP32</i> proteinine ait domen haritası.	28
Şekil 18: GST-füzyon proteinleri.....	29
Şekil 19: Western blot.	30
Şekil 20: Western blot.	30
Şekil 21: Western blot.	31
Şekil 22: Western blot.	32
Şekil 23: Western blot.	33
Şekil 24: <i>USP32</i> lokalizasyonu.....	35

Abstract

Özet

cancer still remains as a major cause of mortality and morbidity among women. Most cancer cases are due to somatic or germline genetic alterations which lead to the development of cancer. Meme kanseri gelişmekte olan ülke kadınları arasında yaygın ve ölümcül bir hastalıktır. Bu kanser vakalarının büyük bir bölümü bilinmeyen genetik mekanizmalara dayanmaktadır. Neoplastik transformasyon normal hücrelerde meydana çıkan genetik değişiklikler ve bunlara bağlı olarak düzensizleşen mekanizmaların sonucudur. Meme kanserine yol açan bu mekanizmaların anlaşılması yönünde ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, hala altında yatan moleküler ve biyokimyasal olaylar tam anlamıyla bilinmemektedir. İfadesi değişen proteinlerin rol aldıkları yollardaki değişiklikleri anlamak da kanser teşhisinde ve/veya tedavisinde daha etkili yöntemler geliştirilmesi için önemlidir. Bu proje kapsamındaki amacımız, meme kanseri hücrelerinde amplifiye olduğu bilinen bir kromozom bölgesindeki (17q23) bir genin karakterizasyonudur. Bu gen, *USP32* evrimsel olarak korunmuş bir gen olup, protein yıkım mekanizmalarında rol aldığı düşünülmektedir. Bu genin diğer bir onkogene (*USP6*) benzerliği sebebiyle ilk olarak genomik olarak ve daha sonra *USP6*'nın farklı transkriptleri ve *USP32* karşılaştırılarak dokulardaki gen ifade yapılarını ortaya koyduk. *USP32* tek başına hücrelere aktarıldığında, hücrelerin neoplastik fenotiplerini değiştirmeyse de, transkripsiyonel olarak gen ifadesinin hormonlara bağlı olabileceğini ve hücre içinde sitoplazmada serbest dolaşan bir protein olmadığını gösterdik. 17q23 üzerinde bulunan *USP32* birlikte amplifiye olmuş ve aşırı üretimi olan diğer proteinlerle birlikte benzer yollarda görev yapıyor olabilir ve bunların kolektif etkisi neoplastik transformasyona yol açıyor olabilir. Bu proje sayesinde ilke kez *USP32* hakkında genomik ve fonksiyonel bilgiler elde edilmiş olup, bu amplikon bölgesinin fonksiyonel olarak anlaşılmasına katkı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: meme kanseri, 17q23, amplikon

Abstract

Breast cancer still remains as a major reason for mortality and morbidity among women. Most cancer cases are due to spontaneous genetic alterations which later cause deregulation of various pathways in the cell. While great progress has been made in understanding molecular mechanisms in cancer cells, questions still remain. Protein degradation, achieved mainly by ubiquitin/proteasome system, is a major regulator of complex cellular mechanisms. Deregulated protein degradation pathways are responsible for a variety of human conditions including cancer and neurodegenerative disorders. To better understand this complex cellular mechanism and to develop therapies for human diseases, we need to identify and characterize the key players in the pathway. In this project, we aimed to characterize an oncogene candidate, *USP32*, on a chromosomal region, 17q23 that is frequently amplified in breast cancer cells. Given its similarity to a known oncogene, *USP6*, we first confirmed genomic structure of the gene and then compared expression profiles of *USP6* and *USP32*. When overexpressed in cells, *USP32* was not enough to transform cells but we found that its transcription is regulated by hormones, a highly relevant finding for breast cancer. Moreover, we also showed that *USP32* is not a free protein in the cytoplasm, suggesting that it may be attached to an organelle/structure inside the cell. In short, *USP32* by itself may not be able to transform cells but work in collaboration with other 17q23 overexpressed genes and is a hormone regulated protein that takes role in protein degradation mechanisms.

Keywords: breast cancer, 17q23, amplicon

Giriş/Genel Bilgiler

Meme kanseri gelişmekte olan ülke kadınları arasında yaygın ve ölümcül bir hastalıktır. Bu kanser vakalarının büyük bir bölümü bilinmeyen genetik mekanizmalara dayanmaktadır. Neoplastik transformasyon normal hücrelerde meydana çıkan genetik değişiklikler ve bunlara bağlı olarak düzensizleşen mekanizmaların sonucudur. Meme kanserine yol açan bu mekanizmaların anlaşılması yönünde ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, hala altında yatan moleküler ve biyokimyasal olaylar tam anlamıyla bilinmemektedir.

Protein yıkımı genel olarak ubiquitin/proteazom sistemi tarafından gerçekleştirilir (Glickman & Ciechanover, 2002). Ubiquitin 76 amino asitten oluşan ve evrim sırasında ökaryotlarda korunmuş olan bir peptittir. Yıkımı gereken protein ubiquitin tarafından işaretlenip, 26S proteazomu tarafından hidrolize edilir. Proteinlerin ubiquitinlenmesi bir grup enzim tarafından gerçekleştirilir. İlk olarak ubiquitin aktive edici enzimler (E1), ubiquitinin karboksil ucunu ATP yardımıyla aktive eder ki ubiquitin daha sonra hedef proteinle kovalent bağlar oluşturabilsin. E1, ubiquitine yüksek enerjili thioester bağlarıyla bağlanırlar. Daha sonra ubiquitin, ubiquitin bağlayıcı enzimlere (E2) geçirilir. Son aşamada ise ubiquitin ligazlar (E3) ubiquitini hedef proteinin bir ya da daha fazla lizine bağlarlar. Buna alternatif olarak E3'ler, ubiquitini, daha önceden ubiquitinlenmiş hedef proteinlere bağlayarak poliubiquitin zincirleri de oluşturabilirler. Bu aşamada diğer önemli bir grup enzim ise deubiquitin proteazlardır. Bu enzimler, öncül poliubiquitin zincirlerinden ya da, hidroliz için proteazoma bağlanmış ubiquitin-protein moleküllerinden ubiquitini ayırabilirler, böylelikle hücre içerisinde serbest ubiquitin havuzu sabit olarak tutulabilir (Wilkinson, 1997, D'Andrea & Pellman, 1998). Protein yıkımında görevli olan bu kadar çok değişik proteine ve yıkım mekanizmalarının önemli görevlerine bakılacak olursa, bu sistem düzensiz ya da kontrolsüz olduğunda hücredeki pek çok olayın zarar görebileceği beklenen bir sonuçtur. Dolayısıyla, düzensiz protein yıkımına kanserin yani sıra nörolojik hastalıklarda da rastlanmaktadır (Hernández *et al.* 2004).

Protein yıkımı bozulduğunda, hücrede büyümeyi durdurucu proteinlerin zamansız yıkımına yol açabilir. Protein yıkımın düzen mekanizmalarını ve etkilerini anlayabilmek farmositik tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için esas oluşturmaktadır. Kontrolsüz gen ekspresyonu veya protein sentezi, kanserde görülen

düzensizleşen mekanizmaların altında yatan sebep olarak düşünülse de, aslında protein yıkımı da en az o kadar önemlidir. Protein yıkımının gerekli olduğu pek çok önemli hücresel olaydan bazıları şöyle sıralanabilir: Hücre döngüsü ve bölünmesi, farklılaşma ve gelişim, hücre yüzeyindeki reseptörlerin düzenlenmesi, hücrenin strese tepkisi, bağışıklık ve inflamasyon mekanizmaları ve programlı hücre ölümü (apoptoz).

Kanser hücrelerinde genetik pek çok değişiklik bahsi geçen yollarda düzensizliklere yol açabilmektedir. Bu genetik değişikliklerden bazıları, onkogenlerin aşırı üretimine veya tümör baskılayıcı proteinlerin ifade edilmemesine yol açabilir. Bu projede yoğunlaştığımız 17. kromozom üzerinde bir onkogen adayı olan USP32'dir (Ubiquitin Specific Protease 32). 17. kromozomun, özellikle göğüs kanseri hastalarında sıkça amplifiye olduğu ve bu bölgedeki genlerin aşırı ekspresyona yol açtığı bilinmektedir. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH, comparative genomic hybridization) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) deneyleri 17. kromozom üzerinde farklı bölgelerde amplifikasyon olduğunu göstermektedir (Bärlund *et al.*, 1997, Bärlund *et al.*, 2000).

Domen mimarisini açığa çıkaran protein veritabanlarında yapılan araştırmalara göre USP32'de EF-hand ve Sis-His yapıları bulunmaktadır. EF-hand yapısı, kalsiyuma bağlanan proteinlerde bulunur. Sis-His yapısı ise ubiquitin proteazlarda, deubikuitasyonun gerçekleştirilebilmesi için gerekli bir yapıdır. Bu yapının USP32'de bulunması bu proteinin deubikuitasyon görevi olduğuna işaret eder. Deubikuitin proteazlar ubiquitin-ubikuitin veya ubiquitin-protein bağlarını yıkabilen ve hücrenin serbest ubiquitin havuzunu sağlayan enzimlerdir. Bu grup enzimler kanserle ilişkilendirilmiş olmalarına rağmen, yıkım sistemindeki en az anlaşılmalı enzim grubudur (Wilkinson, 2000, Fischer, 2003). Deubikuitin proteazların yakından incelenmesi ve rollerinin anlaşılması kanser mekanizmalarını anlayabilmek ve uygun farmasotik tedavi imkanları geliştirmek için önemlidir. Özellikle de proteaz inhibitörlerinin kanser hastalarına sağladığı yararlar, yıkım mekanizmalarının hücredeki rolünü anlamının önemini vurgulamaktadır. Yıkım mekanizmalarında rol alan önemli proteinlerin tanımlanıp karakterize edilmesi, mevcut tedavi yaklaşımlarının daha özel olarak kanserli hücrelere uygulanmasını sağlayabilir. Bu doğrultuda çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Örneğin: USP2a androjenler

tarafından düzenlenen, apoptozda rol alan ve prostat kanserinde aşırı ifade edilen bir onkogen olarak tanımlanmıştır (Graner *et al.*, 2004).

Projenin Amacı: Bu araştırma projesi, teorik olarak ubikuitin proteaz olduğu düşünülen USP32'nin yapısal ve fonksiyonel olarak karakterizasyonu ve bu proteinin meme kanserinin gelişimi ile ilgisini araştırmak için düzenlenmiştir.

Gereç ve Yöntemler

Biyoinformatik Analizler/Kullanılan Araçlar

1. Vista karşılaştırma analizleri
<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>
2. PIP (Percent Identity Plot), Yüzde benzerlik grafiği
<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>
3. NCBI Blast Tools
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
4. Spidey (mRNA-genomik sekans karşılaştırması, ekzon tahmini)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>

Transfeksiyon Deneyleri

Yaklaşık 300,000–400,000 hücre sayılarak 6 kuyulu plakalara ekildi. Hücreler plaka yüzeyinin yaklaşık olarak %80'ini kapladığında aşağıdaki oranlarda Opti MEM ve Fugene HD ile transfekte edildi.

Fugene HD: DNA (μg); 6:1, 6:2, 6:3

Kalıcı transfeksiyon ise G418 (450 $\mu\text{g/ml}$) seleksiyonu yapıldı. Transfeksiyon uygulanmayan hücrelerin 1–2 hafta içerisinde ölmesinden sonra, seleksiyonda canlı kalan hücreler genişletilip DNA ve RNA izole edildi, sıvı azotta saklanmak üzere donduruldu.

Hücre Proliferasyonu Ölçümleri

Üç günde bir ölçüm yapabilmek için ve her bir örneğe ait 3 ölçüm yapılabilmesi için yaklaşık 10.000 hücre 96-kuyucuklu tabakalara ekildi. MTT (Roche) solüsyonu eklendi (4 saat). Bu süre içerisinde canlı hücrelerin MTT'yi formazan tuzuna çevirmesi beklenir. Kolorimetrik ölçüm yapılabilmesi için formazan boyası eklendi ve ELISA tabaka okuyucusunda 570 nm'de ölçümler yapıldı. Her bir örnek için 3 kuyu ölçüldü ve standart sapma hesaplandı.

Fokus Oluşumu

6-kuyulu tabaklara ekilen 20000 hücre yüzeyi kapladıktan sonra da beslenmeye devam edildi. Fokus oluşumu incelendi.

Yara Kapanması (wound healing)

Yüzeyi tamamen kaplayan hücrelerin ortasına 5 ml'lik plastik pipetle çizgi oluşturuldu. 24 saatte bir yaranın kapanması gözlemlendi.

Östrojen ile İndükleme Deneyleri

Hücreler (MDA-MB-66 ve MDA-MB-231) belli bir sayıya ulaştıklarında beyaz besi yerine geçirildiler, kullanılan serum kömür (charcoal) ile 4⁰C'de bir gece inkübe edilip, sterile edildikten sonra beyaz besi yerine eklendi. Böylelikle besi yerinden veya serumdan gelebilecek yapay östrojen etkilerinin önüne geçilmiş oldu. Daha sonra 3 ve 12 saat boyunca E2 (10 nM, 17B-estrodiole; Sigma kat no: E-2257, 1 ml etanol ve 49 ml besi yerinde çözüldü) veya etanol ile muamele gören hücrelerden RNA izole edildi. RNA örneklerinde DNA kontaminasyonu DNaz ile temizlendi, PCR ile doğrulandıktan sonra her bir örnekten 1ug RNA kullanarak cDNA sentezlendi.

PCR Analizleri ve Koşulları

A. USP32-GAPDH RT-PCR

1X PCR Tampon Çözelti, 200µM dNTP, 0,5 µM USP32 primerleri, 0,03 µM GAPDH primerleri, 2,5 U *Taq* DNA polimeraz (Applichem). Toplam hacim: 30 µl

PCR koşulları: 94⁰C 2 dakika; 94⁰C/30 s, 58⁰C/30 s, 72⁰C/30 s (26 kez), son 72⁰C/ 10 dakika.

B. pS2 RT-PCR

1X PCR Tampon Çözelti, 200µM dNTP, 0,5 µM PS2 primerleri, 2,5 U *Taq* DNA polimeraz (Applichem). Toplam hacim: 30 µl. PCR koşulları: 94⁰C 2 dakika; 94⁰C/30 s, 58⁰C/30 s, 72⁰C/30 s (40 kez), son 72⁰C/ 10 dakika.

C. ERα RT-PCR

1X PCR Tampon Çözelti, 200µM dNTP, 0,5 µM PS2 primerleri, 2,5 U *Taq* DNA polimeraz (Applichem). Toplam hacim: 30 µl. PCR koşulları: 94⁰C 2 dakika; 94⁰C/30 s, 58⁰C/30 s, 72⁰C/30 s (35 kez), son 72⁰C/ 10 dakika.

PCR sonuçları densitometrik olarak da ölçülmüştür.

GST-Füzyon protein ifadesi

E.coli BL21 hücreleri protein üretmeye elverişli olduğundan tercih edildi. 37°C'de büyümüş bir gecelik kültürden 30 ul ile ertesi gün (12 ml) 2X YTA (Tryptone: 16g/L, Yeast Extract: 10g/L, NaCl: 5g /L) ortam yeri inoküle edildi. Bu kültürler, 3 ile 5 saat arasında 37°C'de yüksek hızda ajite edilerek büyütüldü. 3. saatin sonunda kültürden örnek alınarak O.D. değeri ölçüldü. İdeal değer (O.D. 600) 0,6–0,8'e ulaşıldığında ise farklı IPTG (0,1-1mM) konsantrasyonları ile GST-füzyon proteinlerin ifadesi indüklendi. 13.000 rpm'de 1,5 dakika çevrilerek çöktürülen hücreler, 4°C'de soğutulmuş 1X PBS (phosphate buffered saline) ile çözüldü.

Hücre patlatma

10mg/ml Lizozim (H₂O) stok hazırlandı. Final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde tüplere eklendi. Tüpler vortekslenildikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildiler. Daha sonra tüpler sırasıyla sıvı azot ve 37°C'de sabitlenmiş su banyosuna daldırılarak hücrelerin patlaması sağlandı. Bu işlem 10 kez tekrarlandı. Örnekler, mikro santrifüjde maksimum hızda 10 dakika çevrildiler, suda çözülmeyen kısımlar ayrıştırıldı (pelet). Örnekler -80°C'de saklandılar. GST proteinlerinin izolasyonu için ise MicroSpin GST purification Module (Amersham 27-4570-03) kullanıldı.

Western Blot

SDS-PAGE için kullanılan jel karışımları:

5% Stacking Gel:	
H ₂ O	: 5,5 ml
30% acrylamide	: 1,3 ml
1,0M Tris (pH:6,8):	1,0 ml
10% SDS	: 80 µl
10% APS	: 80 µl
TEMED	: 8 µl

8% Resolving Gel:	
H ₂ O	: 9,3 ml
30% acrylamide	: 5,3 ml
1,0M Tris (pH:6,8):	5 ml
10% SDS	: 200 µl
10% APS	: 200 µl
TEMED	: 12 µl

Bulgular

Kullanılan solüsyonlar

Blok solüsyonu

- 50 ml PBS (phosphate buffered saline)
- 150 µl tween (final konsantrasyonu %0,1)
- 5 g süt tozu (final konsantrasyonu % 10 w/v)

Primer Antikor (1:2000) ve sekonder antikor (1:7000–9000)

- 50 ml PBS
- 150 µl tween (final konsantrasyonu %0,1)
- 5 g süt tozu (final konsantrasyonu % 10 w/v)
- 25 µl primer antikor veya 7,2 µl sekonder antikor

Yıkama solüsyonu

150 ml 1% tween + 350 ml TBS

İzole edile proteinler (15–30 ul), 6X SDS yükleme boyasıyla karıştırıldı ve örnekler 5 dakika kaynatıldı. Boş yürütülen ve temizlenen jele yüklendi. Örnekler ayırıştırma jeline girene kadar 120 voltta, daha sonra da 150 voltta yürütüldü. 7x7,5 cm ebadında membran ve whatman filtre kağıtları hazırlandı. Membran ve jel 2–5 saniye için methanol içeren bir kaba ardından da 2–5 saniye için suya, en son da transfer çözeltilisine daldırıldı. Düşük hızda sallanmaya bırakıldı (30–45 dakika). Transfer için 3 filtre kağıdı, membran, jel ve 3 filtre kağıdı kullanıldı. Yarı kuru transfer aparatıyla 20 voltta 45–60 dakikada transfer yapıldı. TBS/Tween bazlı solüsyona %5 süt tozu eklenerek spesifik olmayan bağlanmalar engellendi. ECL deteksiyonu, X-ray makinesi (kurum hissesinden bölüme kazandırılmıştır) kullanılarak yapıldı.

Sekil 1: ESRP2

ESRP2 transkripti

(22 ek02s), E-Northern blot

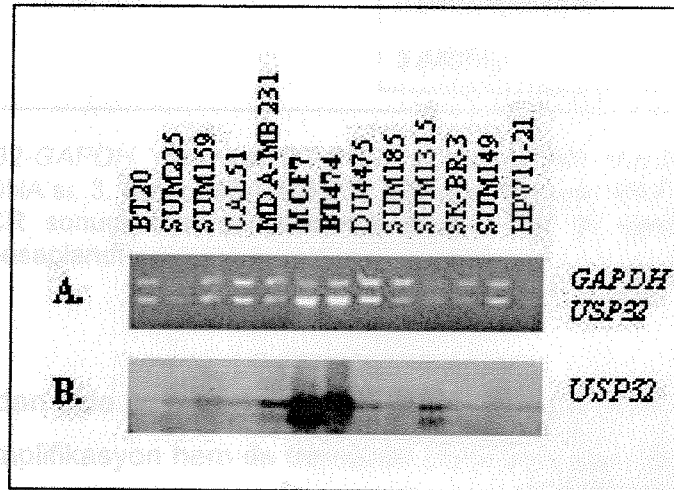
göstermektedir.

Bulgular

1. USP32 aşırı üretimi

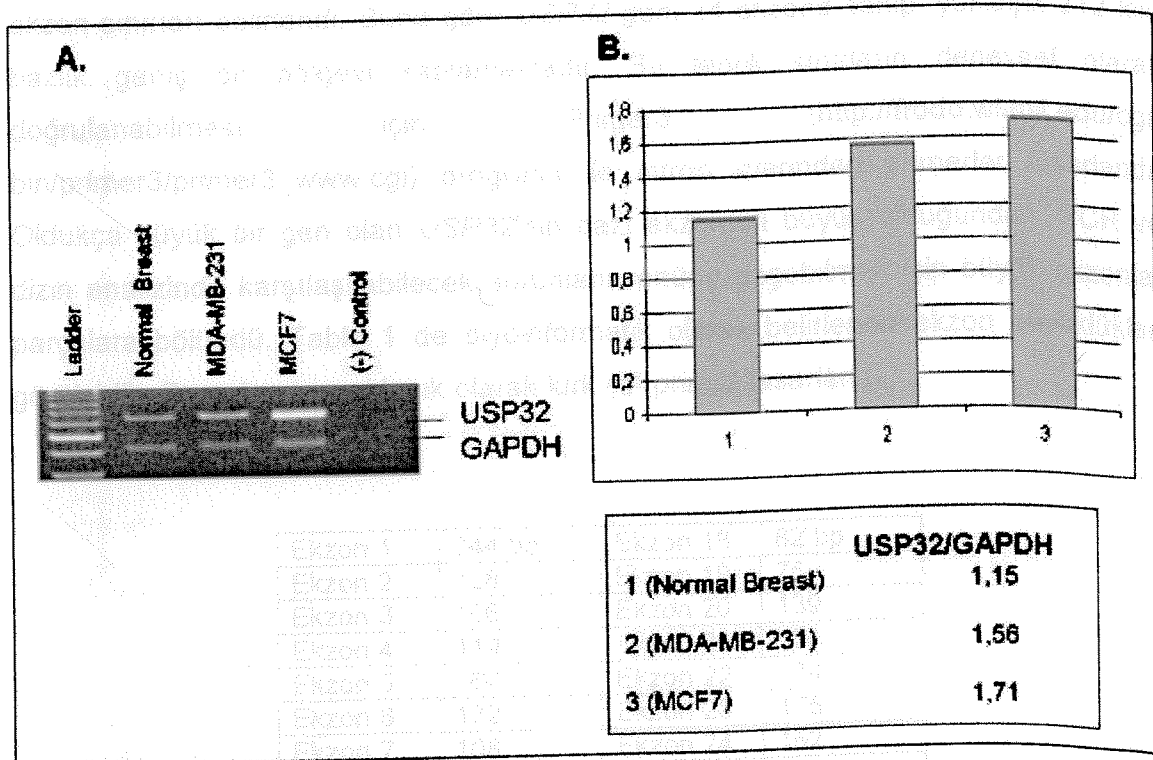
Meme kanseri gelişmekte olan toplumlarda ciddi bir sağlık sorunu teşkil etmektedir. Kalıtsal meme kanserinin yanı sıra ailesel sebeplere dayanmayan, spontan kanser türlerinin anlaşılabilmesi için ifade düzeyleri bozulan genlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi gerekir. Bu projede amacımız, meme kanserlerinde sıklıkla görülen 17q23 kromozom bandı amplifikasyon bölgesindeki bir onkogen adayının incelenmesiydi.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH, comparative genomic hybridization) ve florasan *in situ* hibridizasyon (FISH) deneyleri 17. kromozom üzerinde farklı bölgelerde amplifikasyon olduğunu göstermektedir (Bärlund *et al.*, 1997, Bärlund *et al.*, 2000). Bu bölgeler arasında, 17q23 bantı bizim ve diğer araştırmacıların üzerinde çalıştığı, pek çok tanımlanmamış gen içeren bir bölgedir (Erson *et al.*, 2001, Sinclair *et al.*, 2003). USP32 bu bölgede bulunan MCF7 ve BT474 kanser hücrelerinde amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu olduğunu bulduğumuz, yeni tanımlanmış bir gendir (Şekil 1). Şekil 1A, 11 meme kanseri hücre hattında ve immortalize HPV11-21 hücre hattında GAPDH ile çoğaltılan USP32 genine ait bantın MCF7 ve BT474 hücrelerinde amplifiye olduğu görülmektedir. Şekil 1B'de ise aynı hücre hatlarından izole edilen RNA ile yapılan Northern blot sonuçları, MCF7 ve BT474 hücre hatlarında USP32 transkriptinin aşırı üretimini göstermektedir.



Şekil 1: USP32 amplifikasyon ve aşırı ifadesi. A. Yarı-nicel PCR sonuçlarına göre MCF7 ve BT474 hücrelerinde USP32 geninde GAPDH'e oranla genomik amplifikasyon görülmektedir (22 sıklüs). B. Northern blot tekniği ile MCF7 ve BT474 hücrelerinde USP32 aşırı üretimi görülmektedir

Bu sonuçlar ayrıca yarı-nicel RT-PCR ile de doğrulanmıştır (Şekil 2). Bu kez normal meme dokusundan izole edilen RNA'dan (Ambion) da cDNA sentezi yapıldı ve normal meme dokusundaki *USP32* transkriptinin miktarıyla MCF7 hücreindeki miktar karşılaştırıldı. *USP32/GAPDH* oranı normal meme dokusu için 1,15 iken MCF7 için 1,71 olarak hesaplandı.



Şekil 2: A. *USP32-GAPDH* Yarı-nicel RT-PCR. 1. Kuyu: DNA merdiveni, 2.Kuyu: Normal meme dokusu cDNA'sı, 3. Kuyu: MDA-MB-231 cDNA'sı, 4. Kuyu: MCF7 cDNA'sı, 5. Kuyu: (-) kontrol. B. PCR sonuçlarının densitometrik analizi. Her bir örnek için *USP32* bantı, *GAPDH*'e oranı hesaplandı

Bu kısımdan elde edilen sonuçlara göre MCF7 ve BT474 hücrelerinde *USP32* geni için hem amplifikasyon hem de transkript düzeyinde aşırı ifade (overexpression) olduğu tespit edilmiştir. *USP32*'nin meme kanseri hücre hatlarında fazla üretilmesi, Parssinen et al (Pärssinen et al., 2007) tarafından dört primer tümörde de doğrulanmıştır.

2. Genomik karakterizasyonu/mutasyon taraması

Aşırı ifade edilen bu geni daha iyi karakterize edebilmek için öncelikle genomik düzeyde karakterize edilmesi gerektiğinden, intron-ekzon sınırlarının belirlenebilmesi için, NCBI veritabanları kullanılarak, USP32'ye ait cDNA ve genomik sekansları belirlendi. SPIDEY (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>) programı kullanılarak intron ekzon sınırları belirlendi. Buna göre USP32 geni 34 ekzona sahip, yaklaşık 212 kilo bazlık geniş bir bölgeyi kaplamaktadır. Bu teorik sınırların deneysel olarak doğrulanabilmesi için Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) programı ile intron içlerinden primerler tasarlandı. Oldukça büyük bir gen olan USP32'nin bazı ekzonları büyük olduğundan, PCR ve dizin analizinde karşılaşılabilecek sorunların önüne geçebilmek için büyük ekzonlar parçalara bölündü. Tablo 1 de biyoinformatik olarak belirlenen ekzon büyüklükleri görülebilir. Bu sebeple, yaklaşık olarak kırk çift primer tasarlandı.

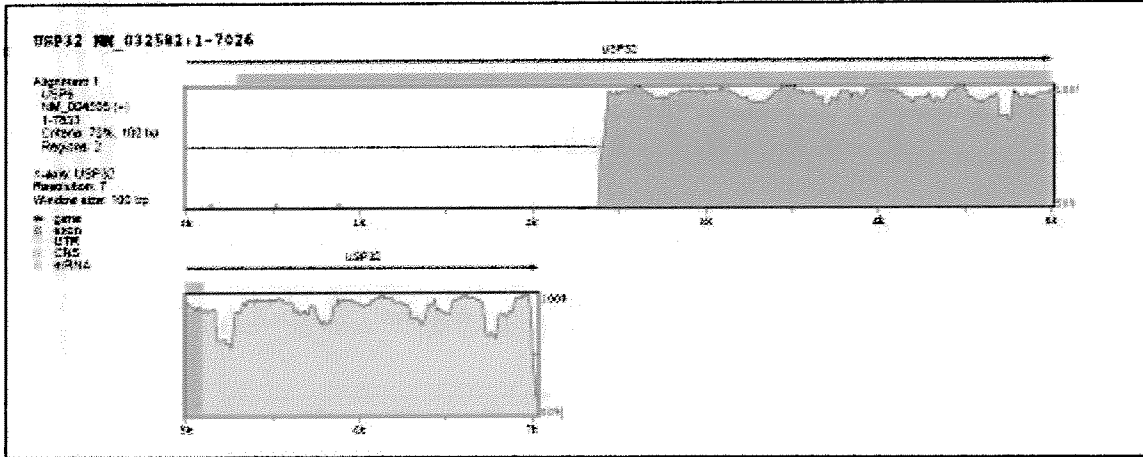
Ekzon 1	344 bp	Ekzon 18	82 bp
Ekzon 2	128	Ekzon 19	75
Ekzon 3	106	Ekzon 20	139
Ekzon 4	119	Ekzon 21	106
Ekzon 5	160	Ekzon 22	174
Ekzon 6	132	Ekzon 23	175
Ekzon 7	108	Ekzon 24	152
Ekzon 8	116	Ekzon 25	112
Ekzon 9	63	Ekzon 26	212
Ekzon 10	84	Ekzon 27	185
Ekzon 11	62	Ekzon 28	87
Ekzon 12	103	Ekzon 29	121
Ekzon 13	193	Ekzon 30	192
Ekzon 14	176	Ekzon 31	289
Ekzon 15	141	Ekzon 32	425
Ekzon 16	118	Ekzon 33	93
Ekzon 17	155	Ekzon 34	2099

Tablo 1: SPIDEY programı ile belirlenen ekzon büyüklükleri

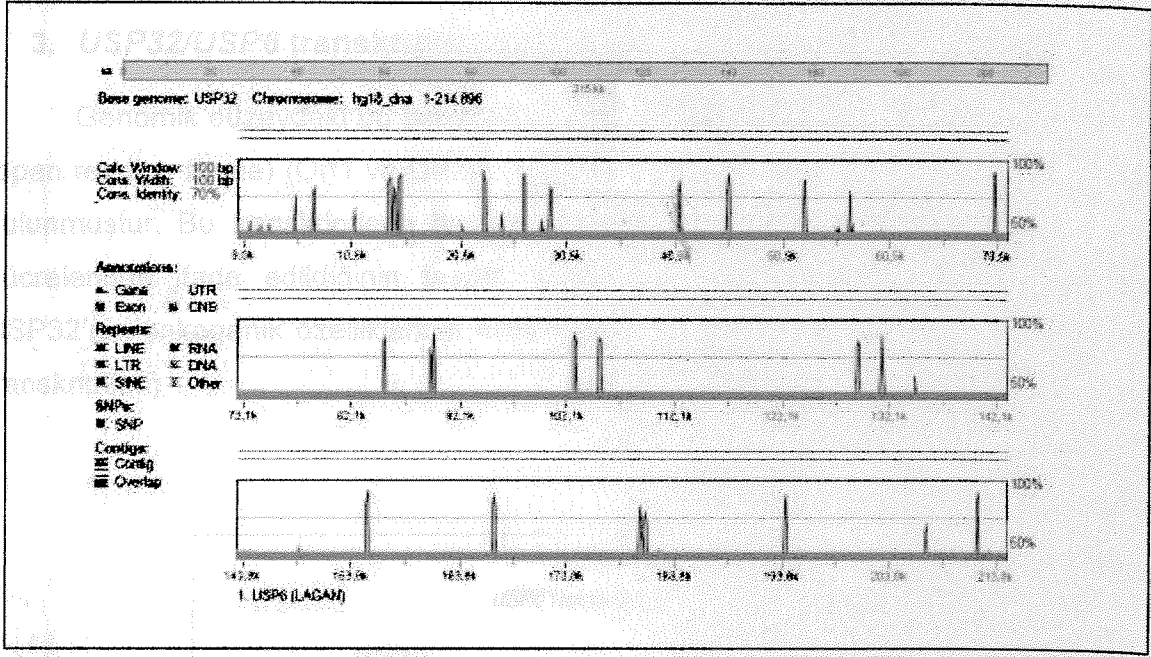
Normal DNA örnekleri kullanılarak, PCR koşulları optimize edildi. PCR reaksiyonlarının optimizasyonu sonrasında, sekans analizine yeterli konsantrasyon elde edebilmek için çoklu örneklerle (MCF7) tekrarlanıp, agaroz jel elektroforezi ile primer dimerlerden ayrıştırıldı ve bantlar jelden kesilerek saflaştırıldı. Intron ve ekzon sınırları veritabanlarında tahmin edilen sonuçlarla karşılaştırılarak doğrulandı. Bu esnada MCF7'de aşırı üretime sebep olabilecek bir mutasyona rastlanmadı.

2.1. Biyoinformatik Analizler:

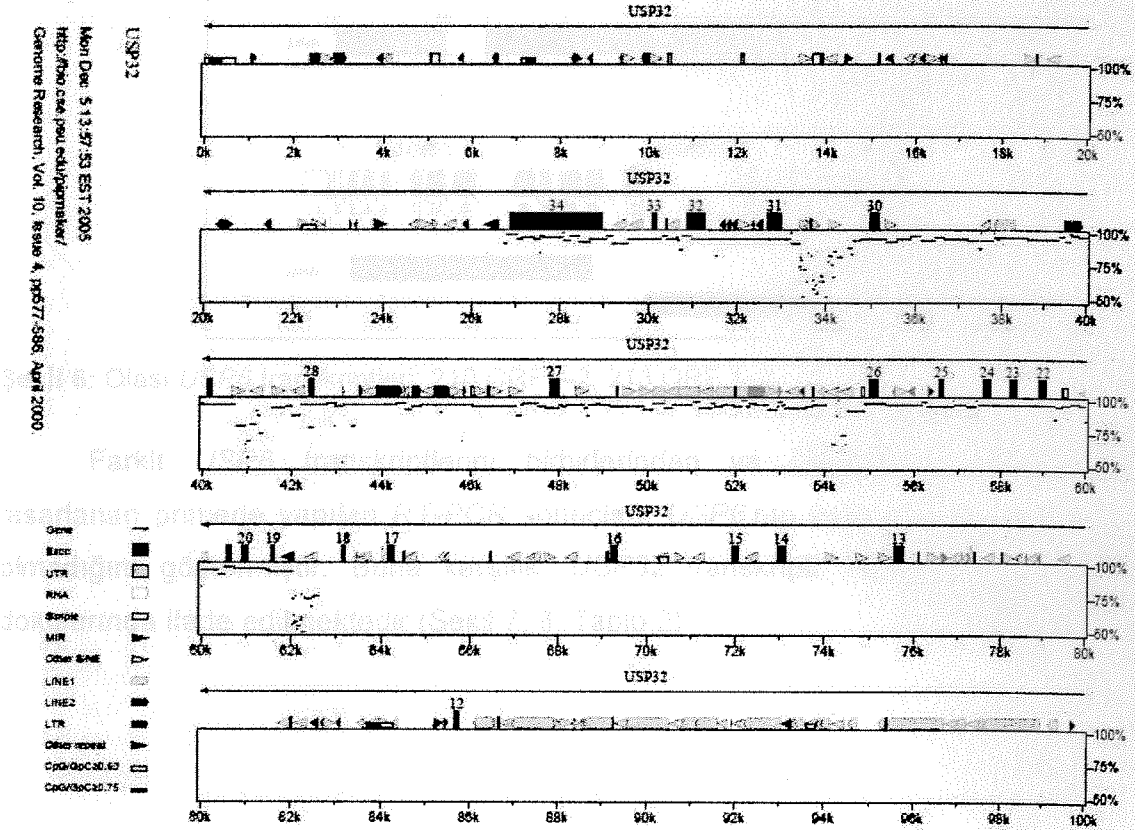
Intron-ekzon sınırlarının deneysel olarak doğrulanması önemlidir çünkü *USP32* ve *USP6* birbirine oldukça benzeyen genlerdir. Genomik olarak iki genin benzerlikleri, PIP (Percent Identity Plot) programı kullanılarak gösterdik (Şekil 3-5). Bu açıdan özellikle ekzon 19-34 arasındaki bölgenin sekansının doğrulanması önemlidir. Bunun yanı sıra *USP32*'nin genomik ve cDNA dizilerinin biyoinformatik analizleri sırasında ortaya çıkan *USP6*'ya ait olduğu düşünülen bazı transkriptler bulduk (Clone 210 ORF1, ORF2 ve Clone 213 ORF1, ORF2). Bu transkriptler alternatif kesilme sonucu ortaya çıkmış olabilirler. Özellikle de ubiquitin proteaz özelliği olan transkriptlerin fonksiyonel önemleri olabilir.



Şekil 3: Vista karşılaştırmalı analizine göre *USP32* ve *USP6* arasındaki benzerlik



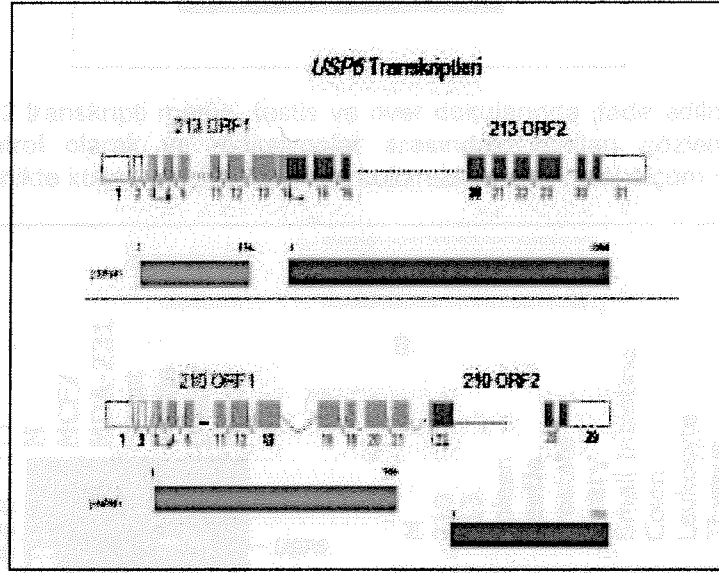
Şekil 4: Vista karşılaştırmalı analizine göre USP32 ve USP6 arasındaki ekzon benzerlikleri



Şekil 5: (PIP, Percent Identity Plot) Benzerlik Yüzdesi Grafiği. İki gen arasındaki %90–95 düzeyinde benzerlik (yatay çizgiler) USP32 ekzon 19 ile ekzon 34 arasında görülebilir.

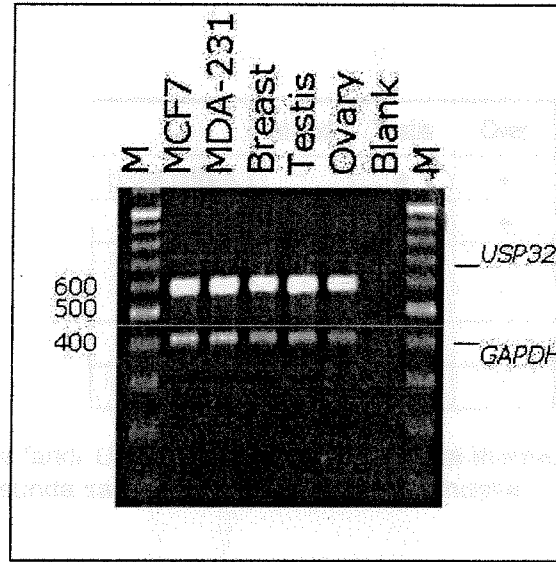
3. *USP32/USP6* transkriptlerinin meme dokusunda incelenmesi

Genomik düzeydeki bu benzerliğin yanı sıra literatürde *USP6*'ya ait farklı ORF (open reading frame) (Orf1 ve Orf2) ve alternatif transkriptler (210 ve 213) olduğu da bulunmuştur. Bu transkriptlerin hangilerinin meme dokusunda veya meme kanseri hücrelerinde ifade edildiğinin tespiti, sağlıklı bir şekilde bu transkriptlerin veya *USP32*'nin onkogenik özelliklerinin araştırılması için gereklidir. (Şekil 6, olası *USP6* transkriptleri)

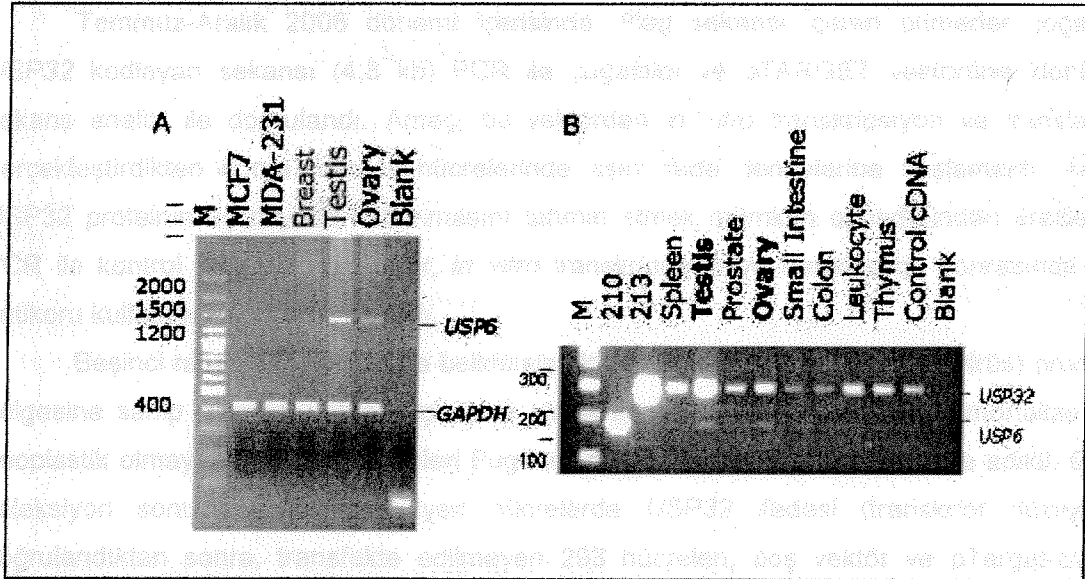


Şekil 6: Olası *USP6* transkriptleri: 210 ORF1-2, 213 ORF 1-2

Farklı *USP6* transkriptlerini birbirlerinden ve *USP32*'den ayırmak için tasarlanan primerle yapılan RT-PCR sonuçları, *USP6*'nın meme dokusunda ifadesi olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, *USP32* transkripti meme, testis ve over dokularında ifade edilmektedir (Şekil 7, 8, Tablo 2)



Şekil 7: USP32 transkripti meme, testis ve over dokularında ifade edilmektedir. GAPDH ise PCR için kontrol olarak ve reaksiyonlar arasındaki farkları gözlemlemek için USP32 primerleri ile birlikte kullanılmıştır. 35 siklus kullanıldığından nicel ölçüm yapılmamıştır.



Şekil 8: USP32 ve USP6 ifadesi. A. USP6 transkripti sadece testis ve over dokularında ifade edilmektedir. Meme kanseri hücre hatlarında ifadesine rastlanmamıştır USP6 ve GAPDH primerleri aynı reaksiyonda çoğaltılmıştır. B. USP6 transkripti sadece testis ve over dokularında ifade edilmektedir. USP6 ve USP32 primerleri aynı reaksiyonda çoğaltılmıştır. 210 ve 213, bu transkriptleri içeren (+) kontrol vektörleridir.

	Meme	Testis	Over
USP6 mRNA	-	+	+
USP32	+	+	+
213 - FULL LENGTH	-	-	-
213 ORFI	-	+	-
213 ORFII	-	-	-

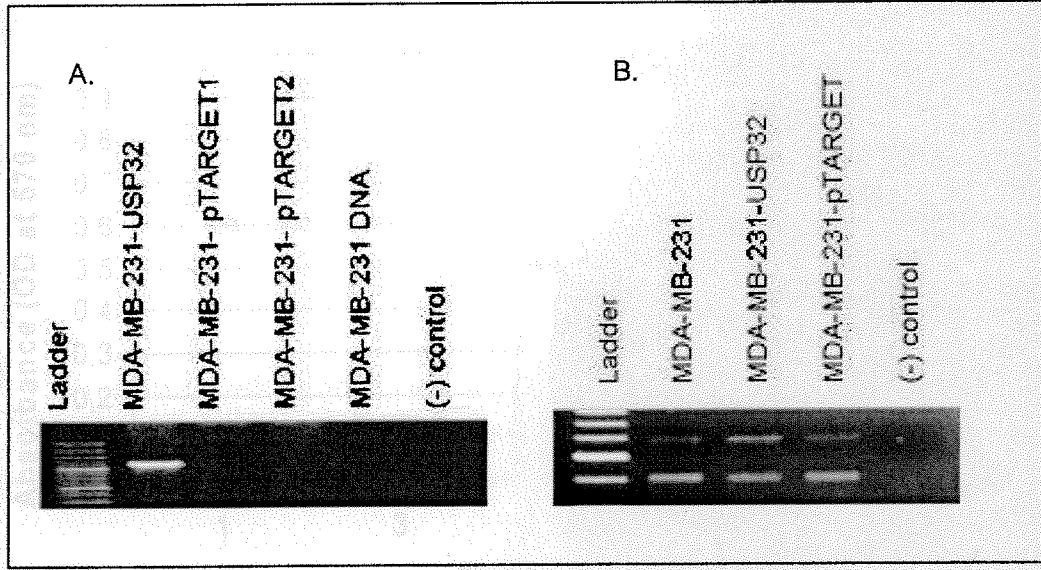
Tablo 2: USP32 ve farklı USP6 transkriptlerinin normal meme, testis ve over dokularındaki ifadesi. Meme dokusunda sadece USP32 ifadesi bulunmuştur

4. USP32 Transfeksiyonu

Temmuz-Aralık 2006 dönemi içerisinde, Flag sekansı içeren primerler çoğaltılan USP32 kodlayan sekansı (4,8 kb) PCR ile çoğaltıldı ve pTARGET vektörüne klonlandı, sekans analizi ile doğrulandı. Amaç, bu vektörden *in vitro* transkripsiyon ve translasyon gerçekleştirdikten sonra memeli hücrelerinde aşırı ifade deneylerine başlamaktır. Ancak, USP32 proteinin üç boyutlu katlanmasını tahmin etmek mümkün olmadığından üretilen ve PCR ile kontrol edilen konstraktlar, *in vitro* transkripsiyon ve translasyon sonrasında Flag antikoru kullanılarak doğrulanamadı.

Beşinci rapor döneminde de belirtilmiş olduğu gibi CMV (cyto megalovirüs) promotör bölgesine sahip pTarget vektörü içerisinde klonlanmış USP32 (4,8 kb) ile immortalize olup neoplastik olmayan HEK293 hücreleri Eugene HG (Roche) ile kalıcı transfekte edildi. Pozitif seleksiyon sonucu (G418) büyüyen hücrelerde USP32 ifadesi (transkript düzeyinde) doğrulandıktan sonra, transfekte edilmeyen 293 hücreleri, boş vektör ve pTarget-USP32 aktarılmış hücreler sayılarak 10.000 tanesi ekildi ve 2 gün aralıklarıyla büyüme hızlarının karşılaştırılması için sayıldılar. 3 günlük sayım sonucunda USP32 aşırı ifadesinin önemli bir büyüme hızı farklılığına yol açmadığı sonucunu görmüştük. Bu sonuç üzerine yani USP32'nin tek başına neoplastik transformasyon için yeterli olmayabileceği ancak zaten neoplastik bir hücrede aşırı üretildiğinde hızlandırıcı etkisi olabileceği düşüncesi ile pTarget-USP32 plasmidi bu kez MDA-MB-231 hücrelerine aktarıldı. MDA-MB-231 hücreleri için uygun olan G418 konsantrasyonu da belirlenmişti. Yaklaşık 1 ay süren seleksiyon sonucunda hayatta kalan hücreler, G418 konsantrasyonu yarıya düşürülerek poliklonal olarak büyütüldü.

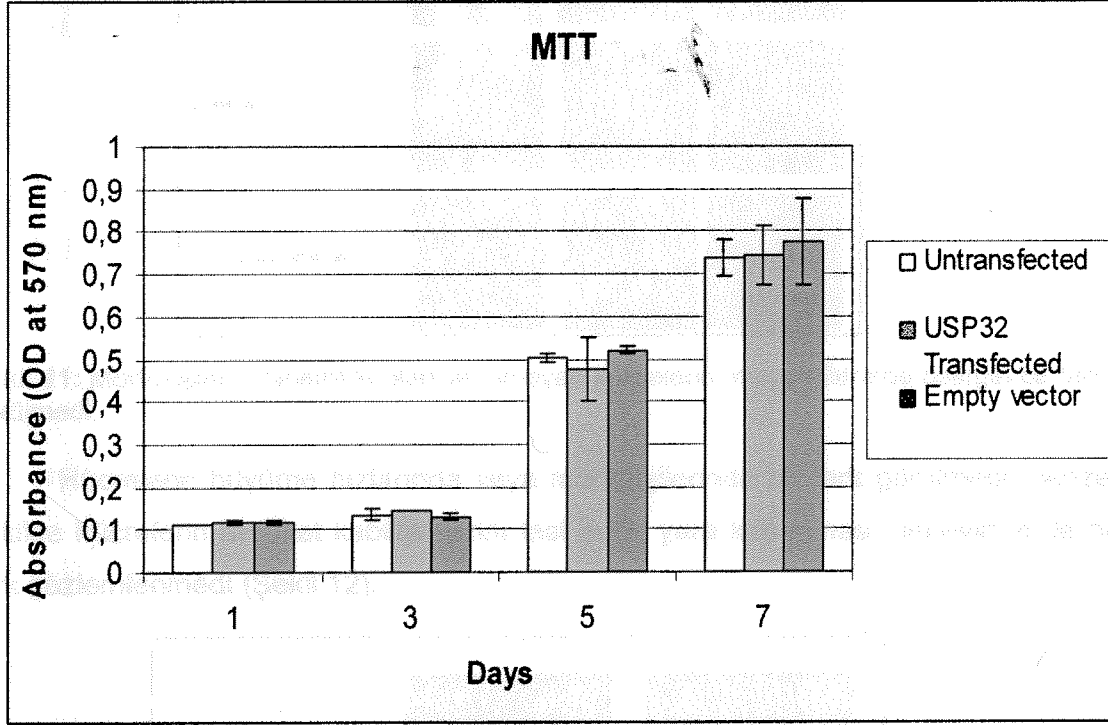
Transfekte edilip, G418 seleksiyonundan sonra hayatta kalan hücrelerden izole edilen RNA'larda öncelikle DNA kontaminasyonu olmadığından emin olmak için PCR yapıldı (Şekil 9-A). Daha sonra cDNA sentezlendi ve RT-PCR yapıldı (Şekil 9-B).



Şekil 9: Transfeksiyonların doğrulanması. **A.** Transfekte edilen hücrelerden izole edilen DNA örneklerinde, *USP32*-pTarget plazmidinin varlığı doğrulandı. 1.kuyu: DNA merdiveni, 2.kuyu: *USP32*-pTarget ile transfekte edilen poliklonal hücreler, 3. kuyu: boş vektör ile transfekte edilen hücreler (1.poliklonal), 4.kuyu: boş vektör ile transfekte edilen hücreler (2.poliklonal), 5. kuyu: transfekte edilmeyen hücrelerden izole edilen DNA, 6. kuyu: negatif kontrol (DNA yok). **B.** *USP32* transfeksiyon doğrulanması (RT-PCR). 1.kuyu: DNA merdiveni, 2.kuyu: transfekte edilmeyen hücreler, 3.kuyu: pTarget-*USP32* plasmidi transfekte edilen hücreler, 4. kuyu: boş pTarget transfekte edilen hücreler, 5.kuyu: (-) kontrol- cDNA yok.

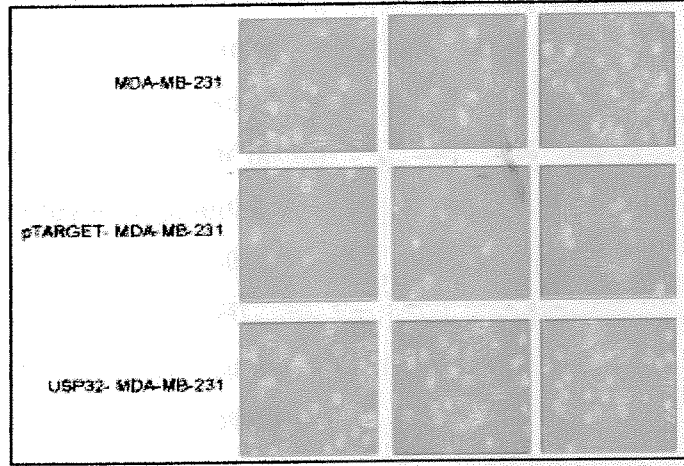
Şekil 9-B' de görüldüğü üzere pTarget-*USP32* plasmidi ile transfekte edilen hücrelerin cDNA'sında diğerlerine göre *USP32* PCR bantı daha fazladır. Ancak bu aşırı üretim de MCF7 hücrelerinde görüldüğü kadar da çok değildir. Transfeksiyon doğrulandıktan sonra bu hücrelerle, kontrol hücreler arasında herhangi farklı bir neoplastik büyüme olup olmadığını anlamak için hücrelerin proliferasyon hızlarına baktık. Hücre proliferasyonunu ölçebilmek için MTT kullanıldı. MTT testi yaşayan hücrelerin tetrazolium tuzu MTT'yi redüklemesiyle ölçülür. Reaksiyon sonucu suda çözünmeyen formazan tuzu kolorimetrik olarak ölçülür.

Bu analizler sonucunda da her 3 hücre grubu arasında bir fark görülmedi (Şekil 10).



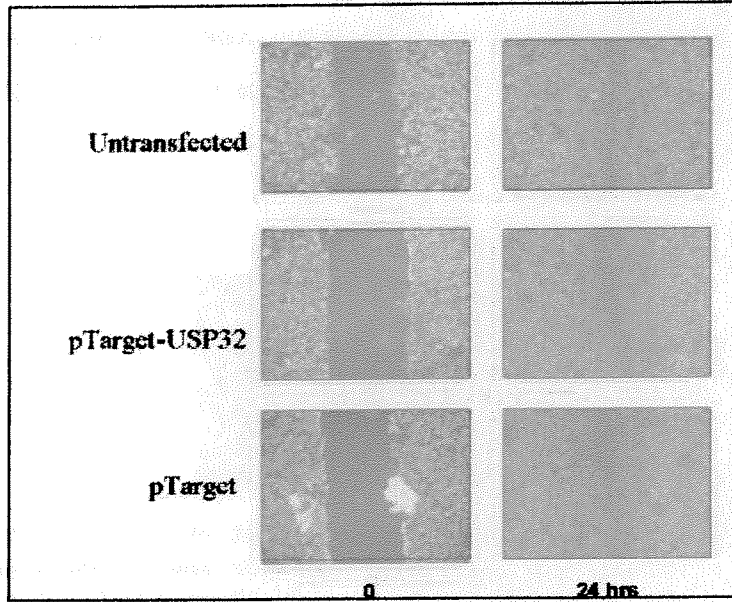
Şekil 10: MTT Analizi. USP32 veya boş vektör transfekte edilen ve edilmeyen hücrelerin büyüme hızları arasında fark görülmedi.

Daha önceki rapor dönemlerinde de HEK293 (immortal, neoplastik değil) hücrelerinde de *USP32* aşırı üretildiğinde hücre proliferasyonunda bir fark görülmediğini bildirmiştik. Benzer şekilde bu MDA-MB-231 hücrelerin fokus oluşturmalarında veya morfolojilerinde bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 11).



Şekil 11: Morfolojiler. Transfekte olan ve olmayan hücrelerin morfolojilerinde belirgin bir fark görülmedi.

Hücrelerin büyüme hızlarında veya morfolojilerinde bir fark görülmedi, benzer şekilde hücrelerin hareket kabiliyetlerini test eden yara kapanması deneyinde de bir fark gözlemlenmedi (Şekil 12).

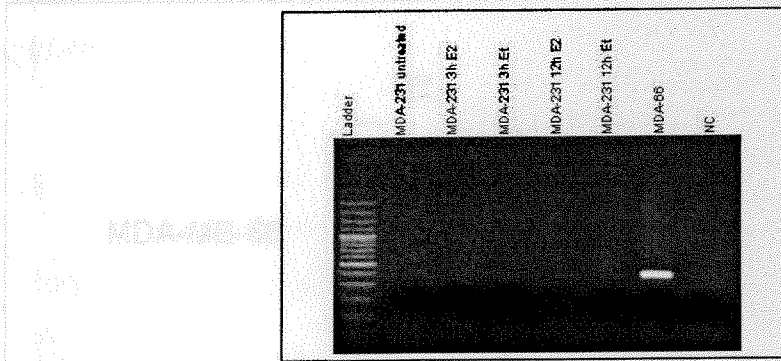


Şekil 12: Yara kapanma deneyi. Yara kapanma deneyinde 24 saat sonunda transfekte edilen veya edilmeyen hücreler arasında bir fark görülmedi.

Bu çalışmalara paralel olarak başlattığımız *USP32* susturma deneyleri de devam etmektedir. Tasarlanan oligoların hücrelere (MCF7) transfeksiyonu sonucunda seçilen pozitif kolonilerde *USP32* transkriptinin varlığı RT-PCR ile incelenmektedir. Şu ana kadar bir oligonun *USP32*'yi susturduğu görülmüştür ancak sonrasındaki deneylerin güvenilirliği açısından en az bir tane daha oligonun *USP32*'yi susturabilmesi gerekir. Bu yüzden yeni siRNA tasarlamak gerekmektedir. Kalıcı transfeksiyon sonucunda *USP32* transkriptinin tamamen kaybolduğu hücrelerde (en az iki farklı oligo tarafından susturulmuş 2 hücre grubu) MTT, morfoloji, hareketlilik analizlerini yapmak mümkün olacaktır.

5. Östrojen ile İndüklenme

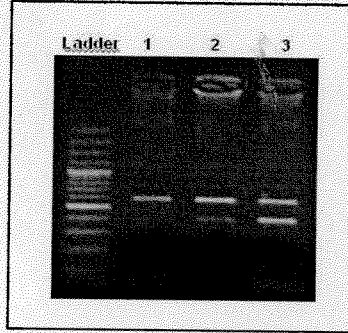
İzole edilen RNA'larda genellikle DNA kontaminasyonu gözlemlenebildiği için ve bu daha sonraki yarı-nicel PCR sonuçlarını negatif etkileyeceğinden rutin olarak RNA örneklerini DNaz ile muamele ettik. Daha sonra etanol çöktürme yöntemiyle temizlenen RNA'larda gerçekten DNA kalmadığını göstermek için RNA'lar PCR' da şablon olarak kullanıldı. DNaz muamelesinden önce görülen bantlar, temizlendiğinde (Şekil 13) RNA'lardan cDNA sentezine geçildi.



Şekil 13: RNA örneklerinde DNA kontaminasyonu olmadığını gösteren PCR. Estradiol ile muamele edilen hücrelerden izole edilen RNA örneklerinde DNA kontaminasyonu yoktur. MDA-66 cDNA'sı kontrol olarak kullanılmıştır. GAPDH cDNA ve DNA ile aynı büyüklükte bir ürün oluşturmaktadır.

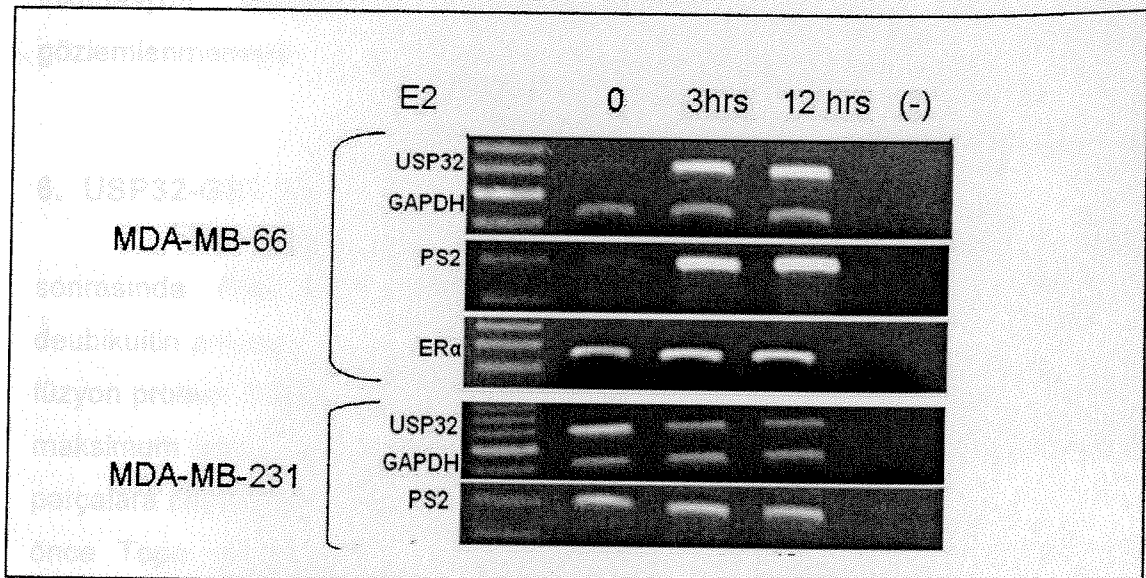
USP32 gen ifadesinde östrojene bağlı bir artış olup olmadığını anlamak için yarı-nicel PCR (dubleks) kullandık. Bu amaçla da içsel kontrol olarak GAPDH primerleri kullanıldı. PCR amplifikasyonu sonucu oluşacak bantların yoğunluğunun birbirine yakın olması için farklı GAPDH primer konsantrasyonları kullanıldı. Optimal

GAPDH primer konsantrasyon ve PCR siklüs sayıları belirlendi (Şekil 14). Bu koşullarda PCR lineer amplifikasyon siklüsü kullanıldı.

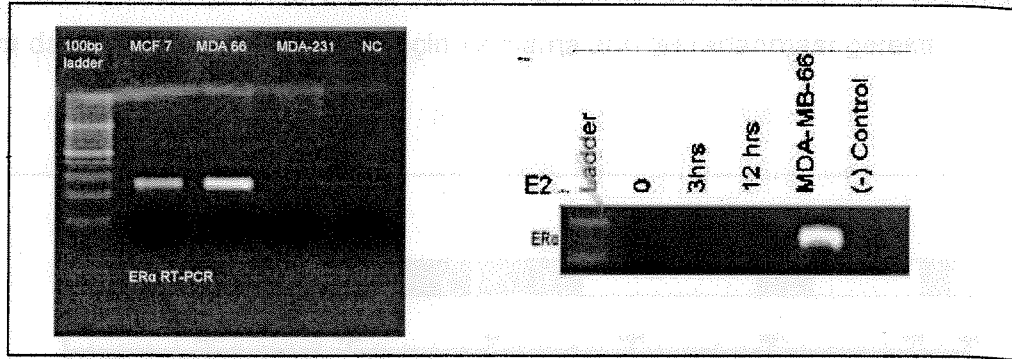


Şekil 14: PCR optimizasyonu. Farklı GAPDH primer (Stok: 0,5 uM) hacimleri ile birlikte USP32 primerlerinin çoğaltılması. (Ladder: DNA merdiveni) 1.Kuyu: 1 ul GAPDH primerleri, 2.Kuyu: 1,5 ul GAPDH primerleri, 3.Kuyu: 2,0 ul GAPDH primerler.

Sentezlenen cDNA örnekleriyle *USP32-GAPDH*, *PS2* (estradiol tarafından indüklendiği bilinen bir gen (Alotaibi *et al.*, 2006)) ve ER (estrogen receptor) PCR'ları tamamlandı (Şekil 15). Bu amaçla MDA-MB-66 (ER +) ve MDA-MB-231 (ER -) hücreleri 3 ve 12 saat boyunca 10 nM estradiol ile muamele edilmiş ve RNA izole edilmişti. MDA-MB-66 hücreleri, MDA-MB-231 hücrelerinin kalıcı ER transfekte edilmiş halidir (Şekil 16).



Şekil 15: USP32 ve estradiol. Estradiola maruz kalan MDA-MB-66 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki USP32 transkriptinin yarı nicel PCR ile incelenmesi. 1. Kuyu: DNA Merdiveni, 2. Kuyu: Estradiola maruz kalmayan hücre, 3. Kuyu: 3 saatlik estradiol uygulaması, 4. Kuyu: 12 saatlik estradiol uygulaması, 5. Kuyu: negatif kontrol. MDA-MB-66'ya ait panelde USP32-GAPDH RT-PCR, östrojen tarafından indüklendiği bilinen PS2 RT-PCR görülmektedir. Ayrıca alttaki panelde MDA-MB-66 hücrelerinin ER (+) olduğunu gösterilmiştir.



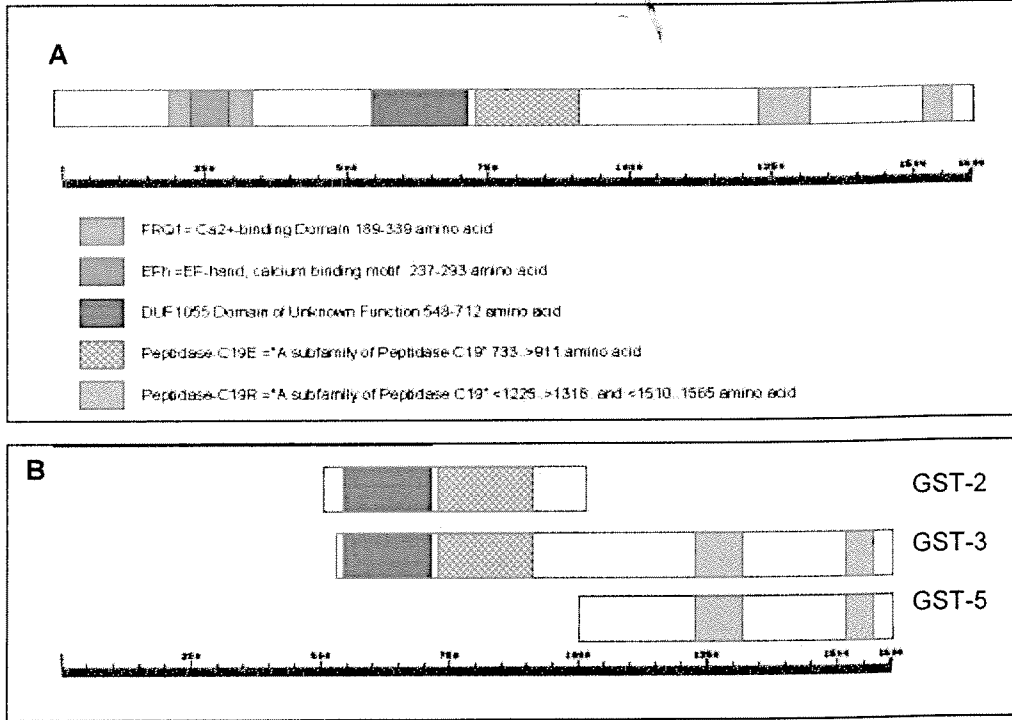
Şekil 16: ER PCR. **A.** MCF7, MDA-66 ve MDA-MB-231 hücrelerinde östrojen reseptör ifadesi durumu. **B.** 1. Kuyu: DNA Merdiven, 2. Kuyu: Estradiola maruz kalmayan MDA-MB-66 cDNA'sı, 3. Kuyu: 3 saatlik estradiol uygulaması, 4. Kuyu: 12 saatlik estradiol uygulaması, 5.Kuyu: MDA-MB-66 cDNA (+ kontrol), 6. Kuyu: cDNA'sız negatif kontrol.

Bu sonuçlara göre MDA-MB-66 hücreleri östrojen reseptörü pozitif olduğu doğrulanmıştır. *USP32* transkripsiyonu ise 3 saatlik estradiol inkübasyonu sonrasında artmaktadır. Bu artışın estradiola bağlı olduğu, östrojenle transkripsiyonunun arttığı bilinen *PS2* geni de gösterilmiştir. Buna ek olarak, MDA-MB-231 hücrelerinde östrojen reseptörü bulunmadığından estradiolle inkübasyon sonrasında *PS2* veya *USP32* transkripsiyonunda artış gözlemlenmemiştir.

6. USP32-GST Protein Üretimi

Flag içeren *USP32* konstraktlar, *in vitro* transkripsiyon ve translasyon sonrasında Flag antikoru kullanılarak doğrulanamamıştı. Bu özellikle de deubikuitin proteaz görevinin test edileceği aşamalarda sorun olacağından, GST-füzyon proteini üretme yoluna gittik. Ancak 4,8 kb'lik *USP32*'nin, GST vektörünün maksimum içine alabileceği 2-3 kb'nin çok üstünde olmasından dolayı kod dizini parçalara bölmek durumunda kaldık. Klonlamayı kolaylaştırmak için PCR ürünleri önce Topo vektörüne klonlandı, ardından uygun enzimlerle kesilerek, GST vektörüne aktarıldı. Her bir parça PCR ile çoğaltılıp, vektöre klonlandığından, klonlama sonrasında sekans analizi ile kontrol edilmesi projeye mali bir yük de getirdi. Özellikle 2-4,8 kb arasında olan PCR ürünlerinde, enzimin hata yapmadığı klonları bulmak zaman aldı. Her bir vektörün en az 6 farklı primerle

sekanslanması gerekti. Daha önceki raporlarda da belirtildiği gibi çoğunlukla bir ya da iki mutasyon bulunduğu için klonlamaların tekrarlanması gerekti.



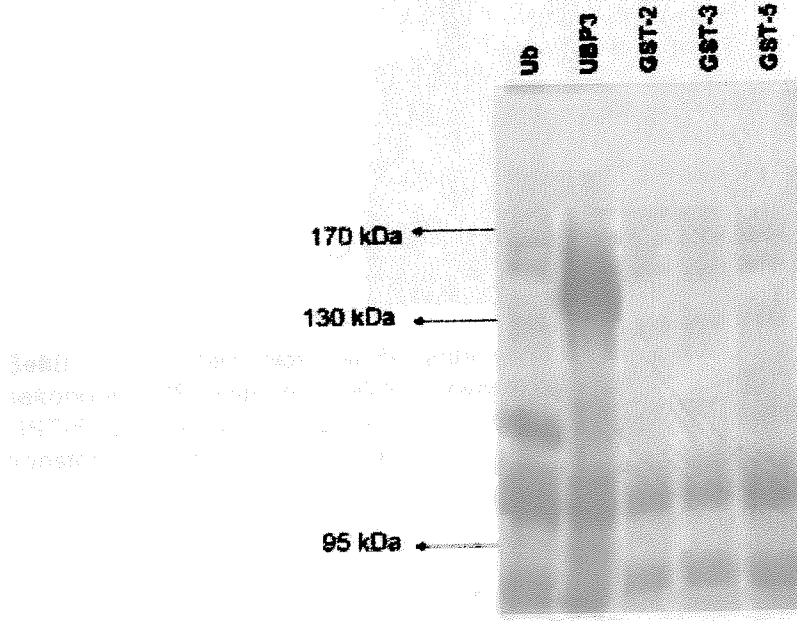
Şekil 17: A. USP32 proteinine ait domen haritası. B. GST ile füzyon olarak üretilen yapılar

IPTG ile GST protein ifadesi indüklendikten sonra protein izolasyonu yapıldı. SDS-PAGE analizi sonrasında ilk olarak jelleri coomassie blue ile boyayarak proteinlerin yürümesini kontrol ettik (Şekil). Total protein izolatları arasında GST proteinleri görmek çok mümkün olmadığı için, Western blot uygulamasına geçildi.

Deubikuitinasyon deneyi için gerekli olan pACYC184-Ub-met- β -gal ve pGEX-UBP3 plasmidlerini Yale Üniversitesinden Dr. M. Hochstrasser gönderdi. USP32 ile birlikte bakteri hücrelerine atılacak olan pACYC184-Ub- β -gal plazmidinden ifade edilen füzyon proteinin (Ub- β -gal) deubikuitinasyon sonrasında Ub kısmının atılması beklenmektedir. Ancak sistemin çalıştığından emin olmak için deubikuitinasyon aktivitesi doğrulanmış (pozitif kontrol) pGEX-UBP3'de kullanıldı.

Bu amaçla kullandığımız bakteri hücreleri BL21'dir. Bu hücreler protein ifadesi için optimize edilmiş hücrelerdir. Bu hücrelerin iki plazmidi birden içlerine alabilmeleri

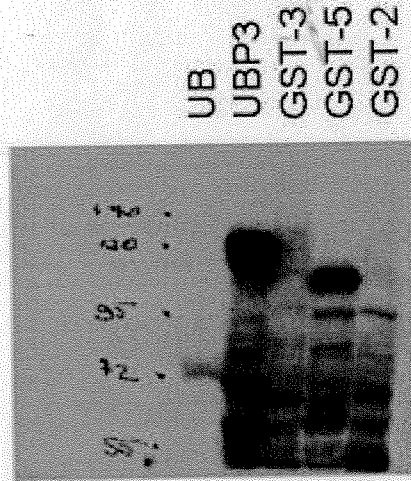
için kompetan hale getirildi. Plazmidlerde bulunan iki farklı antibiyotik için stok solüsyonlar hazırlandı (Chloromphenicol ve Amphotericin). Antibiyotiklerin her birisinin stok solüsyonu 20µg/ml, seleksiyon konsantrasyonu da 0,2 µg/ml olarak belirlendi. BL21 içerisinde pGEX4T-USP32 (3 farklı yapı) vektörü ile beraber pACYC184-Ub-β-gal vektörü atıldı. Öncelikle ikili transformasyon pozitif çıktığında GST füzyon proteininin üretildiğini doğrulamak için, SDS-PAGE jelleri "Coomassie blue" ile boyadık (Şekil 18).



Şekil 18: GST-füzyon proteinleri. %8'lik jelde yürütülen izolatlar, coomassie blue ile boyandı.

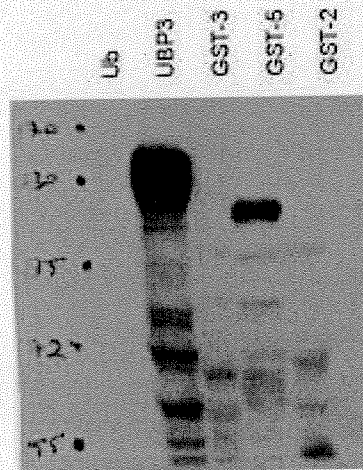
Ancak beklenen büyüklükte (pozitif kontrol dışında) belirgin bantlar bulunmadığından Western blot ile GST antikorunu ve HRP (horse radish peroksidaz) bağlı sekonder antikor kullanımına geçmek durumunda kaldık. İlk olarak antikorların konsantrasyonlarının optimize edilmesi gerekti. İlk kullanılan primer GST antikorunu 1:2000, sekonder HRP antikorunu 1:9000 şartları sonucunda arka planda çok fazla bant bulunduğundan, sekonder antikorun konsantrasyonu düşürüldü (Şekil 19).

Yapılan deneyler, bu izolatların yapısında GST-3, GST-5 ve GST-2 proteinlerinin bulunduğunu göstermiştir. Bu izolatların yapısında GST-3, GST-5 ve GST-2 proteinlerinin bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 19: Western blot. %8'lik jelde yürütülen izolatlar için primer GST antikoruna 1:2000, sekonder HRP antikoruna 1:9000 kullanıldı. Beklenen protein büyüklükleri, GST-3: 151 kDa, GST-5: 97,4 kDa, GST-2: 94,7 kDa, GST-UBP3: 131 kDa. UB sadece UB-β-gal plazmidini transforme edilmiş *E.coli* proteinleri

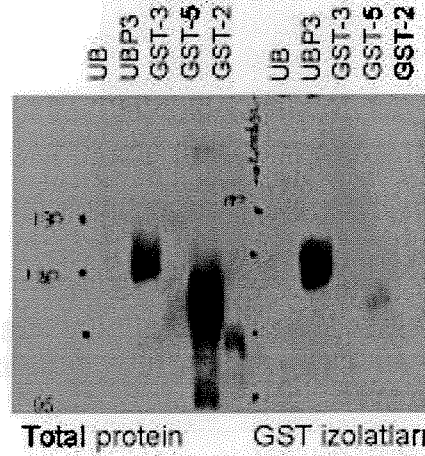
Şekil 20: Western blot. %8'lik jelde yürütülen izolatlar için primer GST antikoruna 1:2000, sekonder HRP antikoruna 1:10.000 kullanıldı. Beklenen protein büyüklükleri, GST-3: 151 kDa, GST-5: 97,4 kDa, GST-2: 94,7 kDa, GST-UBP3: 131 kDa. UB sadece UB-β-gal plazmidini transforme edilmiş *E.coli* proteinleri



Şekil 20: Western blot. %8'lik jelde yürütülen izolatlar için primer GST antikoruna 1:2000, sekonder HRP antikoruna 1:10.000 kullanıldı. Beklenen protein büyüklükleri, GST-3: 151 kDa, GST-5: 97,4 kDa, GST-2: 94,7 kDa, GST-UBP3: 131 kDa. UB sadece UB-β-gal plazmidini transforme edilmiş *E.coli* proteinleri

kDa'ya karşılık gelmektedir. Bu kez membranın dışında bir bölgede

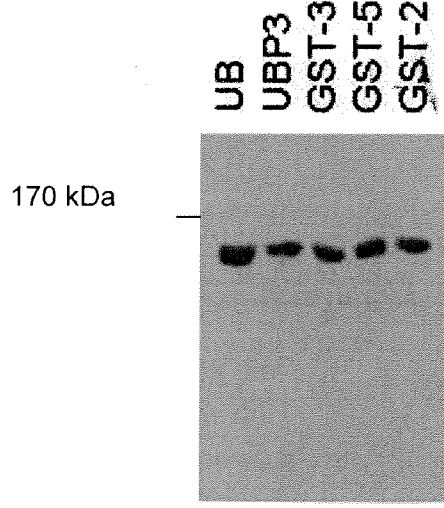
Total izolatlarla yapılan Western sonucuna göre pozitif kontrol ve 5. yapı (GST-USP32) de ifade edilmekte. Ancak 2. ve 3. yapılardan beklenen büyüklükte bir bant göremediğimiz için bu kez total izolat yerine GST saflaştırılmış izolatlar kullandık (Şekil 21).



Şekil 21: Western blot. %10'luk jelde yürütülen izolatlar için primer GST antikorunu 1:2000, sekonder HRP antikorunu 1:10.000 kullanıldı. Beklenen protein büyüklükleri, GST-3: 151 kDa, GST-5: 97,4 kDa, GST-2: 94,7 kDa, GST-UBFP3: 131 kDa. UB sadece UB-β-gal plazmidini transforme edilmiş *E.coli* proteinleri

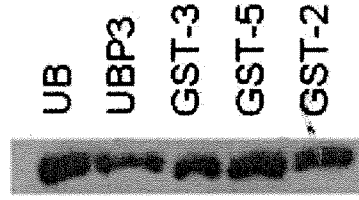
Yapılardan bazılarının tespit edilememesinin bazı nedenleri olabilir. IPTG ile indüklenme sürelerinin ve konsantrasyonunun değiştirilmesi proteinlerin üretilmesini etkileyebilir. Proteinlerin katlanması veya başka membran yapılarına bağlanması, izolasyon açısından sorun yaratabilir. Bu optimizasyonlar hala devam ederken, 5. yapı üretildiğinden ve içinde Sis ve His domenlerini içerdiğinden, bir sonraki aşamaya geçtik. Bu aşamada, hücre içinde beraber üretilen GST füzyon proteinleri ve UB-β-gal proteinleri (125 kDa) incelendi. Ubikuitin proteaz özelliği gösteren proteinlerin var olması Ub-β-Gal proteinindeki Ub kopmasına ve daha küçük bir β-gal proteini (117 kDa) oluşmasına yol açar.

Bu kez membran, primer β-gal antikorunu (1:2000) ve sekonder antikor (1:7000) ile hibridize edildi (Şekil 22).



Şekil 22: Western blot. %8'lik SDS jelde yürütülen proteinler, primer B-gal antikor (1:2000) ve sekonder antikor (1:7000) ile hibridize edildi. (UB- β -gal: 125 kDa, β -gal:117 kDa)

UBP3 bilinen bir ubikuitin proteazdır ve GST antikor ile bakteri hücrelerinde ifade edildiğini gösterdik. Ancak %8'lik jelde sadece Ub- β -gal plazmidini ifade eden bakteri hücreleri ile karşılaştırıldığında β -gal proteinin büyüklüğünde bir fark göremedik. Yakalanması gereken fark sadece 8 kDa olduğu için proteinleri daha yüksek konsantrasyonlu jelde yürütmek veya %8'lik jeli daha uzun süre yürütmek bir sonraki aşamalar oldu. Ancak proteinlerin büyüklüğü de fazla olduğundan yüksek konsantrasyonlu jelde bu kez proteinler açılmadı. %8'lik jelde uzun süreler boyunca yürütülerek bantların biraz daha açılması sağlanmaya çalışıldı ancak yine negatif ve pozitif kontroller arasında fark göremedik (Şekil 23).



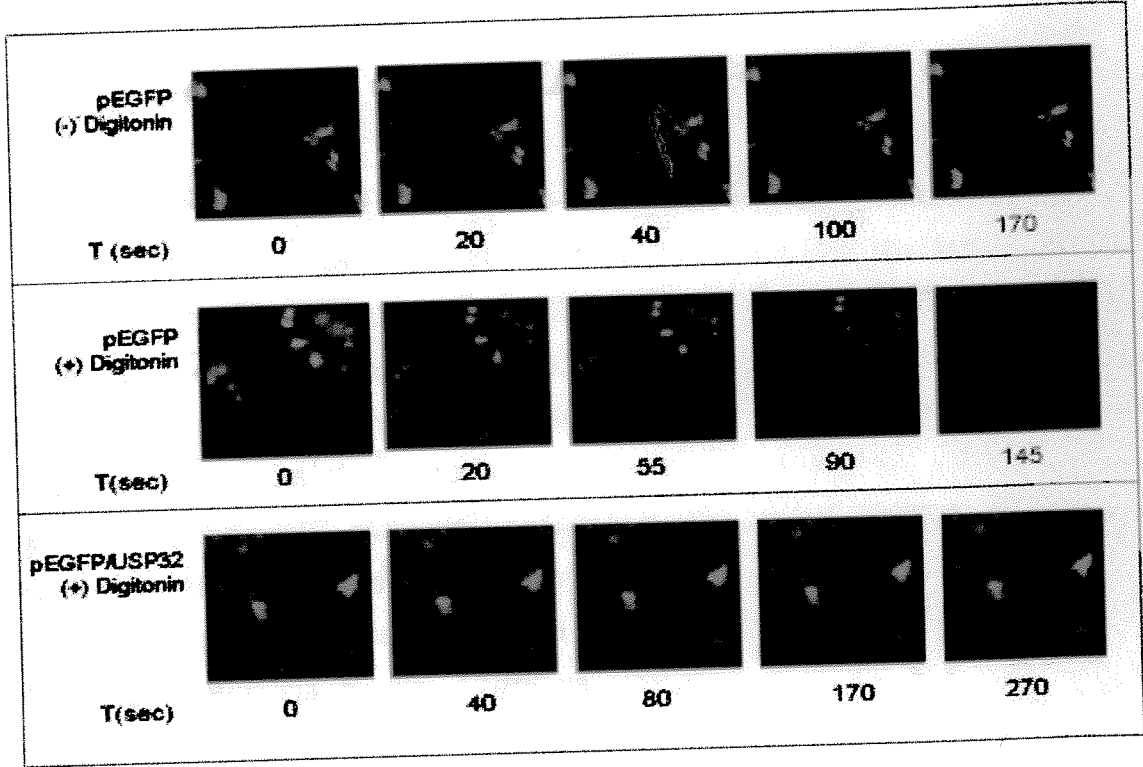
Şekil 23: Western blot. %8'lik SDS-PAGE. Jel yaklaşık 6 saat yürütüldükten sonra transfer edildi ve anti-β-gal antikor ve sekonder antikor ile hibridize edildi.

125kDa ve 117 kDa arasındaki 8 kDa'lık farkı ancak gradyan (%15-%4) jelle görebileceğimizi düşünüyoruz. Ancak gradyan jel dökebilmek için gerekli aparatımız olmadığından, Bio-Rad firmasından hazır jel siparişinde bulduk. Bu jeller henüz elimize ulaşmadığından bu deneyi tamamlamamız mümkün olmadı ancak tüm izolatlar elimizde hazır olduğundan (farklı IPTG konsantrasyonları ile indüklenen ve farklı sürelerde inkübe edilen) jeller elimize ulaştıktan sonra kısa süre içinde tamamlanacağını düşünüyoruz.

7. Hücre İçinde USP32 Lokalizasyonu

Veritabanlarında düzenli olarak yaptığımız incelemeler sonucunda, protein lokalizasyon tahminlerine göre USP32'nin hücre içinde bir membrana bağlı olabileceği sonucunu aldık. Proteinin hücre içerisindeki yerinin tayini, proteinin görevi hakkında bir fikir verebileceği için, zaten elimizde klonlanmış olan *USP32* transkriptini, pEGFP proteinine füzyon olacak şekilde klonlandı. Ancak füzyon proteinin üçlü dizininin bozulmaması için özel primerler tasarlandı. PCR ile amplifiye edilen *USP32* (4.8 kb), EGFP (enhanced green fluorescent protein) ile füzyon oluşturacak şekilde vektöre klonlandı ve sekans analizi ile doğrulandı. Florasan koruma analizi ("Fluorescence protease protection (FPP) assay", (Lorenz *et al.*, 2006), GFP ile füzyon olarak üretilen proteinlerin hücre içindeki yerlerini anlamak için geliştirilen bir sistemdir. Bu sisteme göre, GFP ifadesi olduğu bilinen hücreler,

digitonine (deterjan) maruz bırakıldıklarında, hücre zarında meydana gelen deliklerden dolayı proteinler hücre dışına çıkabilmektedir ve gözlemlenen florasana sinyal azalır. Ancak hücre içindeki protein herhangi bir yapıya bağlı ise (membran ya da organel), hücre zarının delinmesi, proteinin dışarı çıkmasını sağlayamaz. Biz de *USP32*'nin hücre içerisinde tamamen sitoplazmik mi yoksa başka bir yapıya bağlı olup anlamak için geçici transfeksiyon ile pEGFP-*USP32*, sadece pEGFP plazmidlerini HeLa hücrelerine aktardık. Yirmi dört saat sonra hücrelerin florasana proteinleri ürettiklerini de doğruladık (Şekil 24). Belli aralıklarda konfokal florasana mikroskop ile görüntü alındığından 170 sn boyunca florasana solması olmadığını da doğruladık. Ardından boş vektör transfekte edilen hücrelere digitonin eklendiğinde, zamanla sinyalin solduğu gözlemlendi (145 sn tamamen kayboldu). Aynı şekilde pEGFP-*USP32* transfekte edilen hücrelere digitonin eklendiğinde sinyalin kaybolmadığı görüldü (270 sn hala sinyal mevcut). Bu da biyoinformatik yolla ortaya çıkan gözlemin doğru olabileceğine işaret etmektedir. Bu sonuca göre *USP32* sitoplazma içerisinde serbest bir protein değildir. Bu da daha sonraki çalışmalarda yol gösterici bir bilgi olacaktır.



Şekil 24: USP32 lokalizasyonu. Florasan koruma analizi. pEGFP ifade eden hücrelerde 170 saniye boyunca alınan görüntülerde solma yoktur. Digitonin eklendiğinde ise, protein hücre zarının delinmesiyle dışarı çıktığından sinyal zamanla azalmaktadır (pEGFP). Digitoninle hücre zarı delinmesine rağmen EGFP-USP32 proteini hücre içinde kalmıştır.

Tartışma/Sonuç

Kariyer projesi kapsamındaki amacımız yeni kurulmakta olan laboratuvarımızda bir amplikon bölgesinde bulunan onkogen adayının genomik ve fonksiyonel olarak anlaşılmasına katkı sağlamaktır. *USP32* evrimsel olarak korunmuş bir gen olarak farklı dokularda ifade edilmektedir. Evrimsel süreçte ise *USP6* geninin oluşumuna katkı sağlamıştır. *USP6*, 17p13 üzerinde bulunmasına rağmen *USP32* ile 19-34 ekzonlar arasında %97 oranında benzerlik göstermektedir. *USP6*'nın sadece testis dokusunda ifade edildiğine dair bir çalışma bulunmasına rağmen (Paulding *et al.*, 2003), bizim sonuçlarımıza göre *USP6* hem testis hem de over dokusunda ifade edilmektedir. Bununla birlikte, *USP6* ve *USP32*, Sis ve His domenlerin olduğu bölgede benzerlik gösterdiği için bu iki proteinin fonksiyonları örtüşebilir. Bu yüzden *USP6*'ya ait alternatif transkriptlerin meme dokusunda ifade edilip edilmediği önemlidir. Özellikle de susturma deneylerinde meme hücresinde *USP6*'nın olmadığını bilmek önemlidir. Aksi takdirde tasarlanan siRNA hem *USP32*'yi hem *USP6*'yı susturabilir ki bu da sonraki fonksiyonel deneylerin yorumlanmasını imkansız hale getirir. Fonksiyonel çalışmalara geçmeden önce *USP6*'nın ve *USP6*'ya ait diğer transkriptlerin meme dokusunda ifade edilmediğini gösterdik. Bu esnada *USP32*'nin biyoinformatik olarak belirlenmiş intron-ekzon sınırları doğrulandı. Her bir 34 ekzon için intronik primerler tasarlandı ve MCF7 hücre hattı genomik DNA'sı kullanarak PCR ile amplifiye edildi. Dizin analizi sonucunda bütün sınırlar doğrulanmış oldu. Ayrıca da MCF7 hücrelerinde aşırı üretimi açıklayabilecek bir mutasyona rastlanmadı. Zaten *USP32*, 17q23 amplikonu üzerinde bulunduğundan genomik amplifikasyonun, gen aşırı ifadesine yol açtığını da gösterdik.

Fonksiyonel çalışmalara geçtiğimizde bazı sıkıntılarla karşılaştık. *USP32* cDNA'sı (7 kb) ve kod dizini (4.8 kb) oldukça büyük olduğundan klonlama aşamalarında olmasa bile proteinin üretimi ve işaretlenmesinde problemler oldu. *USP32* için üretilen (University of Michigan, Petty lab) poliklonal antikor çalışmadı, bizim laboratuvarımızda üretilen Flag antikor, proteini (Flag-*USP32*) tanıyamadı. Büyük bir protein olduğu için, proteinin üç boyutlu katlanmasının karmaşık bir yapı

oluşturduğunu düşünüyoruz. Bu sebeplerle transkript düzeyinde çalışmak durumunda kaldık. pTarget içine klonlanmış *USP32*, önce normal immortalize HEK293 hücrelerine daha sonra MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine (transfeksiyon öncesi *USP32* aşırı ifadesi yok) aktarıldı. Kalıcı transfeksiyon için hücreler antibiyotik seçiminden geçtiler, poliklonal koloniler seçildi. Önce DNA düzeyinde sonra transkript düzeyinde plazmidin entegrasyonu ve *USP32* ifadesi incelendi. Doğrulanmış hücreler için daha sonra uygulanan neoplastik büyüme testlerinde, boş vektör ve transfekte edilmeyen hücreler karşılaştırıldığında, proliferasyon, hareket ve fokus oluşturma şekillerinde belirgin bir fark görülemedi. Bir amplikonun parçası olarak aşırı ifade edilen *USP32*, amplikon üzerindeki diğer genler gibi tek başına fazla üretildiğinde neoplastik transformasyonu tek başına gerçekleştiremiyor olabilir. Fakat meme kanseri açısından ilginç olabilecek bir bulgu, *USP32*'nin östrojene bağlı olarak transkripsiyonun artmasıdır. 3 ve 12 saatlik estradiol inkübasyonu sonrasında izole edilen RNA'yla yapılan RT-PCR sonuçları belirgin bir şekilde *USP32* transkripsiyonunun arttığını göstermiştir. Bu analizi, östrojen reseptörü transfekte edilmiş MDA-MB-231 (MDA-66) hücrelerinde yaptık. Östrojen inkübasyonu sonucunda arttığı bilinen PS2 genindeki artış da estradiolun aktivitesini test etmek için kullanılan pozitif kontroldür. ER(-) olan MDA-MB-231 hücrelerinde ise beklendiği gibi estradiol inkübasyonu sonrasında PS2 veya *USP32* ifadelerinde bir artış görülmedi.

Sürekli olarak devam eden biyoinformatik analizlerimiz sonucunda *USP32*'nin hücre içinde bir membrana bağlı olabileceği sonucuna ulaştık. Bu sonuç protein hakkında bize bilgi vereceğinden, elimizde var olan klonlanmış dizini GFP füzyonu oluşturacak şekilde pEGFP içerisine klonladık. Sadece bir lokalizasyon deneyi yapmak yerine, *USP32*'nin hücre içinde serbest mi yoksa bir yapıya bağlı mı olduğunu anlamak için hücreleri digitonin ile muamele ettik. Sadece GFP serbest bir protein olduğundan bir süre sonra sinyal kaybolurken, *USP32* sinyali kaybolmadı. Bu da *USP32*'nin gerçekten başka bir yapıya bağlı olabileceğini gösterdi. Bu sonucun başka hücre hatlarında da gösterilmesi, hangi yapıya bağlı olduğunun anlaşılması şimdiki hedefimizdir.

Yukarıda bahsettiğimiz USP32'nin büyüklüğü problemi, bizi deubikuitinasyon deneylerinde de zorladı. In vivo deubikuitinasyon sistemine geçtik. Bu sebeple GST füzyon proteinleri üretildi, dizin analizi ile doğrulandı. Bu esnada laboratuarda protein izolasyonu, Western blot teknikleri optimize edildi. Deubikuitinasyon deneyinin pozitif kontrolü ve pACYC184-Ub-met- β -gal, pGEX-UBP3 plasmidlerini Yale Üniversitesinden Dr. M. Hochstrasser gönderdi. Plazmidler, *E.coli* hücrelerine aktarıldı ve proteinlerin üretildiği doğrulandı. Ubikuitinin kesildiğini doğrulamak için gerekli çözünürlük literatürde yapıldığı gibi %8'lik jelde görüntülenemedi. Bu aşamada optimize etmemiz gereken konular, izolatlardaki tuz ve pH kontrolü, jellerin konsantrasyonu, membrana transfer, antikor dilusyonları (gösterilmeyen data) vs oldu. Tüm bu koşullar optimize edildiğinde, istenilen çözünürlüğe ancak gradyen jel ile ulaşabileceğimizi düşünerek hazır jel siparişi verdik (gradyen jel dökme aparatımız olmadığı için) ancak henüz elimize ulaşmadığı için bu deneyin sonucunu yetiştiremedik. Jeller elimize ulaştığında, kısa sürede tamamlanacağını düşünüyoruz. Ancak pozitif kontrolde yine beklenen bantı görememe durumunda, başka bir ubikuitin proteaz pozitif kontrol olarak kullanılacaktır. Proje süresince karşılaştığımız bir sorun da hücre kültüründe kontaminasyon oldu. 2007 yazında bölümümüzde ortak kullanımda olan hücre kültürü odasında ortaya çıkan kontaminasyon sonucu çalışmalarımız durma noktasına gelmişti. Bilinen hiç bir organizmaya benzemeyen (mantar, mikoplazma, bakteri) ancak hücrelerin büyümesini engelleyen bu kontaminasyon aylar süren çabaya rağmen temizlenememişti. Ancak odanın bir firma tarafından dezenfekte edilmesiyle sorun çözülmüş ve deneylerimize devam edebilmiştik.

Tez kapsamında bir yüksek lisans öğrencisi tezini tamamladı ve doktorasına başladı. Ayrıca iki doktora öğrencisi de tezlerinin bir kısmında USP32 ile ilgili bu projede çalışmaktadırlar. Çalışma sonuçlarımız bu haliyle ilginç olmasına rağmen, USP32'yi daha iyi anlayabilmek için tamamlamak istediğimiz yeni bazı deneyler vardır. Bu sebeple, makale hazırlıkları, USP32'nin hücre içindeki lokalizasyonun daha net anlaşılması (Golgi, proteazom, ER), ubikuitin proteaz özelliği gösterecek

gradyen jelin yürütülmesi, potansiyel tümör baskılayıcı mikroRNA'ların USP32 ile ilişkisi konuları tamamlandığında bitirilecektir.

Özet olarak, projenin başlamasından bu güne kadar boş bir oda olarak başladığımız laboratuvarımız bu proje sayesinde işler duruma gelmiş, bir yüksek lisans tezi tamamlanmış, uluslararası toplantılarda sözlü sunumlar yapılmıştır. Şu anda ise projenin genişlemesi sayesinde 3 doktora öğrencisinin kısmi tezleri haline gelmiştir. Şu anki dataların ise, proje kapsamında olmayan ancak merak ettiğimiz soruları cevaplayacak diğer deneylerin tamamlanmasıyla bir yayın haline dönüşeceğini düşünüyoruz.

Referanslar

- Alotaibi, H., Yaman, E., Demirpençe, E. and Tazebay, U. (2006). *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1487-1496.
- Bärlund, M., Monni, O., Kononen, J., Cornelison, R., Torhorst, J. and Sauter, G. (2000). *Cancer Res* 60, 5340-5344.
- Bärlund, M., Tirkkonen, M., Forozan, F., Tanner, M., Kallioniemi, O. and Kallioniemi, A. (1997). *Genes Chromosomes Cancer* 20, 372-376.
- D'Andrea, A. and Pellman, D. (1998). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 337-352.
- Erson, A., Niell, B., DeMers, S., Rouillard, J., Hanash, S. and Petty, E. (2001). *Neoplasia* 3, 521-526.
- Fischer, J. (2003). *Int Rev Cytol* 229, 43-72.
- Glickman, M. and Ciechanover, A. (2002). *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Graner, E., Tang, D., Rossi, S., Baron, A., Migita, T., Weinstein, L., Lechpammer, M., Huesken, D., Zimmermann, J., Signoretti, S. and Loda, M. (2004). *Cancer Cell* 5, 253-261.
- Hernández, F., Díaz-Hernández, M., Avila, J. and Lucas, J. (2004). *Trends Neurosci* 27, 66-69.
- Lorenz, H., Hailey, D., Wunder, C. and Lippincott-Schwartz, J. (2006). *Nat Protoc* 1, 276-279.
- Paulding, C., Ruvolo, M. and Haber, D. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2507-2511.
- Pärssinen, J., Kuukasjärvi, T., Karhu, R. and Kallioniemi, A. (2007). *Br J Cancer* 96, 1258-1264.
- Sinclair, C., Rowley, M., Naderi, A. and Couch, F. (2003). *Breast Cancer Res Treat* 78, 313-322.
- Wilkinson, K. (1997). *FASEB J* 11, 1245-1256.
- Wilkinson, K. (2000). *Semin Cell Dev Biol* 11, 141-148.

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 104S241
Proje Başlığı: USP32 Geninin Yapısal, Fonksiyonel Karakterizasyonu ve Göğüs Kanserindeki Rolü
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Y.Doç. Dr. A. Elif Erson, Proje yürütücüsü <ul style="list-style-type: none">• Shiva Akhavan Tabasi, MSc derecesini aldı, doktora başladı (proje bursiyeri)• Ayşegül Sapmaz, doktora öğrencisi (projeden destek almadı)• Begüm Tuncer Akman, doktora öğrencisi (projeden destek almadı-USP32 susturma çalışmalarında görev aldı)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyoloji Bölümü
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Nisan 2005-Haziran 2008
Öz (en çok 70 kelime) Proje kapsamında, meme kanserinde amplifiye olan 17q23 üzerindeki bir gen karakterize edildi. USP32 protein yıkım mekanizmalarında rol almaktadır. Bu genin diğer bir onkogene (USP6) benzerliği sebebiyle genomik olarak ve USP6'nın transkriptleri karşılaştırılarak dokulardaki gen ifadesini inceledik. USP32 tek başına neoplastik fenotipi değiştirmediyse de, ifadesinin hormonlara bağlı olduğunu ve sitoplazmada serbest bir protein olmadığını gösterdik. USP32 hakkında genomik ve fonksiyonel bilgiler elde edilmiş olup, bu amplikonun anlaşılmasına katkı sağlanmıştır.
Anahtar Kelimeler: meme kanseri, 17q23
Projeden Yapılan Yayınlar: <ol style="list-style-type: none">1. Sapmaz A, Akhavan S, Tuncer B, Erson AE. Characterization of USP32 as an oncogene candidate in breast cancers. Hazırlanan makale*.2. Akman B, Erson AE, Potential Roles of Non-coding RNAs in Regulation of an Oncogene Candidate, European Science Foundation, Non-Coding RNAs: Computational Challenges and Applications, Antalya, Turkey, April 28-30, 2008. <u>Sözlü Sunum.</u>3. Akman B, Erson AE, Structural Analysis of a 50 kb Region on 17q23, EMBO YOUNG SCIENTISTS FORUM, Istanbul, Turkey, Feb 20-22, 2008.

4. Sapmaz A, Yuce R, Erson AE, Identification of the function and regulation mechanism of USP32, EMBO YOUNG SCIENTISTS FORUM, Istanbul, Turkey, Feb 20-22, 2008.
5. Akhavan S. "İki ubikuitine özgü proteazın (USP6 ve USP32) gen ifade farklılıklarının araştırılması". Yüksek Lisans Tezi, ODTU Biyoloji Bölümü, 2007**
6. Akhavan S, Ekim B, Erson AE, Characterization of two ubiquitin specific proteases in cancer, International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, Turkey '07, April 30-2 May, 2007. Sözlü Sunum.
7. A.E. Erson, Protein Ubiquitination and Degradation: Implications for Breast Tumorigenesis. Gene Regulation and Cancer Symposium, Bilkent University 3-5 May 2006, Ankara, Turkey. Sözlü Sunum
8. A.E. Erson, E.M. Petty. Overexpressed Ubiquitin Specific Proteases: Implications in the pathogenesis of breast cancer. American Association for Cancer Research 97th Annual Meeting, Washington DC, USA, April 1-5 2006

*Hazırlık aşamasında makale, (USP32 susturma ve deubikuitinasyon deneylerinin tamamlanmasından sonra tamamlanacaktır).

****Tamamlanan Yüksek Lisans Tez Başlığı:**

İki ubikuitine özgü proteazın (USP6 ve USP32) gen ifade farklılıklarının araştırılması

Tez Özeti: Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın olan kanser türüdür ve her sekiz kadından birinde bu hastalığın görülme olasılığı vardır. Tümör oluşumunda genellikle tümör baskılayıcı genlerin kaybı ve/veya proto-onkogenlerin fazla ifade edilmesi rol oynar. *USP32* (ubikuitine özel proteaz 32) geni 17q23 kromozomal bandında bulunur ve bu bölgenin meme kanserinde çoğaldığı gösterilmiştir. Gen çoğalması da meme kanseri hücrelerinde yaygın olarak görülen bir durumdur. Bu durumda proto-onkogenlerin fazla ifade edilip tümör oluşumuna yol açtığı düşünülür. 17q23 bölgesindeki çeşitli onkogen adayları da bu bölgenin karakterizasyonunun önemli olduğuna işaret eder. *USP32* geninin, 17q23 amplikonunda bulunur, 212 kb'lik yer kaplar ve bir ubikuitine özgü proteaz kodladığı düşünülmektedir. *USP32*'nin de içinde yer aldığı USP protein ailesi üyelerinin protein yıkımında çeşitli görevleri vardır (hedef proteinlerin deubikuitinlenmesi-ubikuitinden arındırılması- ve proteazomda gerçekleşecek olası yıkımın engellenmesi gibi). Böylelikle, USP'lerin fazla ifadesi hücredeki önemli regülasyon rolleri olan proteinlerin düzeyini değiştirebilir. Çeşitli kanıtlar, meme kanseri hücrelerinde *USP32* geninin fazla ifade edildiğine işaret etmektedir. Bu da *USP32* geninin meme kanseri oluşumundaki olası rolünü akla getirir. Öte yandan, başka bir ubikuitine özgü proteaz olan ve bir onkogen olduğu bilinen *USP6*, *USP32*'de de bulunan korunmuş histidin ve sistein bölgelerini içeren bir deubikuitinleyici enzimdir. Bunun yanında *USP6*'nin 3.197 ve 7.831 nükleotidler arasındaki dizi ile *USP32*'nin 2.390 ve 7.024'üncü nükleotidleri arasında %97lik bir benzerlik gözlenir. Bu çalışmada, meme dokusunda *USP6* ve *USP32* genleri arasındaki ifade şekillerini (alternatif yazılım ürünlerini de içerecek şekilde) karşılaştırmayı amaçladık. İki protein, yüksek oranda benzerlik içerdiğinden, ortak görevlerde yer alabileceklerini de göz önüne alarak karşılaştırmayı yaptık. Bununla birlikte, *USP32* genini, ileride lokalizasyon ve fazla ifade çalışmalarında kullanmak üzere TOPO-TA vektörüne klonladık. *USP32* geninin ve proteininin ayrıntılı karakterizasyonu meme kanseri oluşumunda protein yıkım mekanizmasının rolünün aydınlatılması açısından yararlı olacaktır.