



**Tümör baskılayıcı gen CHFR'nin meme kanserinde
susturulma mekanizmasının 3' UTR açısından irdelenmesi**

Proje No: 111S263

Y.Doç.Dr.A.Elif Erson Bensan

EYLÜL 2012
ANKARA

Önsöz

Hızlı destek projesinde meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak görev yapan CHFR'in 3' UTR'sinde bulunan olası SNP'ler (tek nükleotidlik polimorfizmler) ve mRNA-mikroRNA ilişkisindeki etkileri irdelenmiştir. Proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir ve ODTÜ, Biyolojik Bilimler Bölümü'nde yürütülmüştür.

İçindekiler

Özet	5
Abstract.....	5
Giriş/Genel Bilgiler.....	6
Gereç ve yöntem.....	7
Bulgular	9
Tartışma/Sonuç.....	16
Referanslar	20
Proje Özet Bilgi Formu	21

Şekil Listesi

Şekil 1: Western blotlama CHFR proteinin düzeyini gösterdi.	9
Şekil 2 : CHFR 3' UTR çoğaltma	10
Şekil 3: MCF7, MCF10A ve MDA-MB-231 hücre hatları cDNA'sı	10
Şekil 4:CHFR 3' UTR'de bulunan SNP'lerden rs3741490'a ait örnek kromotogram.	11
Şekil 5: MCF10A, CHFR 3' UTR klonlama PCR'ı.	12
Şekil 6: Örnek 3' UTR klonlama aşamaları.....	12
Şekil 7: Koloni PCR doğrulaması.....	13
Şekil 8: Optimizasyon.....	13
Şekil 9: MCF10A CHFR 3' UTR-pmiR'in MCF10A hücrelerindeki ikili lusiferaz sonucu..	14
Şekil 10: MDA-MB-231 CHFR 3' UTR-pmiR.....	15
Şekil 11: MCF7 CHFR 3' UTR-pmiR.....	15
Şekil 12: Biyoinformatik analizler.....	16

Tablo Listesi

Tablo 1: MCF7, MDA-MB-231 ve MCF10A cDNA'larında tespit edilen SNP'ler. T11	
Tablo 2: Klonlanmış UTR vektörlerine ait dizin analizi sonuçları	14

Özet

Önemli bir tümör baskılayıcı olan CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains) proteini, erken mitozda bir kalite kontrol noktasında görevlidir. CHFR proteinin ifadesi pek çok tip farklı kanser hücresinde ve tipinde promotor hipermetilasyonuna bağlı olarak azalmakta veya tamamen yok olmaktadır. Bu durumun da kanser hücrelerinde genomik dengesizliği arttırdığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda hipermetilasyona bağlı CHFR proteininin düşüşü farklı kanserlerde yaygın olarak rapor edilmiştir. Ancak, meme kanseri hücrelerinde CHFR protein düzeyi düşük olmasına rağmen, CHFR promotor metilasyonu gözlenmemektedir. Bu da meme kanserlerinde CHFR proteinin azalmasında başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. Bu Hızlı Destek projesi kapsamında, CHFR 3' UTR'sinde bulunan olası SNP'ler (tek nükleotidlik polimorfizmler) ve SNP'lerin varsa mRNA-mikroRNA ilişkisindeki etkileri irdelenmiştir. Proje sonucunda, CHFR' geninin sadece 3' UTR'sinde 27 adet SNP olduğu tespit edilmiş, bu SNP'lerden bazılarının farklı meme hücre hatlarında farklı alelleri olduğu belirlenmiştir. Ortaya konan bu varyasyonun mikroRNA bağlanmasıyla ilişkisi de biyoinformatik ve raportör gen anlatımı yollarıyla irdelenmiştir. İncelenen aneuploid kanser hücrelerindeki farklı SNP alelleri taşıyan transkriptler de olduğu ve bunların bazı kombinasyonlarının protein düzeyine az da olsa etkileri olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: CHFR, hücre döngüsü, 3' UTR

Abstract

CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains) functions as an early cell cycle checkpoint protein and a tumor suppressor. Since its discovery, CHFR has been shown to be downregulated in different cancers. Interestingly, in almost all cases of CHFR loss in neoplasms, promoter hypermethylation was shown to be responsible for the decreased or lost expression of CHFR. Breast cancer seems to be the exception of CHFR promoter hypermethylation although CHFR protein levels are shown to be low in patients and cell lines. In this project, CHFR 3' UTR SNPs (single nucleotide polymorphisms) were investigated as a possible mechanism to alter mRNA-miRNA dynamics in breast cancer cells to explain the promoter hypermethylation independent loss of CHFR. Our findings showed existence of 27 SNPs in the 3' UTR of CHFR. Different alleles of these SNPs were represented in mRNAs of 3 breast cell lines. The existence of these various alleles in CHFR mRNA was further investigated in terms of miRNA binding sites by both bioinformatic and functional means. Our results suggest that different alleles of several SNPs are expressed in cells at the same time, possibly due to aneuploidy and that certain combinations of these alleles may impact the protein levels.

Key words: CHFR, cell cycle, 3' UTR

Giriş/Genel Bilgiler

Genomik dengesizlik (instabilite) kanser fenotipinin önemli bir bulgusudur. Normal hücrelerde genomun nitel ve nicel yapısının korunmasını sağlayan hücre döngüsü içerisinde bazı kalite kontrol noktaları (checkpoints) vardır. Hücre döngüsü içerisinde G2/M aşamasındaki kontrol noktaları genellikle genomun nicel özelliklerinin korunmasını amaçlar. Örneğin metafaz veya iplikçik kontrol noktası, iplikçiklerin kromozom üzerinde kinetekora bağlanmasını kontrol ederek kromozomların hücrelere eşit dağılımını kontrol eder. Kanser hücrelerindeki genomik dengesizliği açıklayabilmek ve anlayabilmek için araştırmalar bu tip kontrol noktaları üzerine yoğunlaşmıştır.

Son zamanlarda dikkat çeken bu tip kontrol noktalarından biri CHFR (checkpoint with FHA and RING domain) proteinin yönettiği geç G2 ve erken mitoz (M) kontrol noktasıdır (SCOLNICK ve HALAZONETIS, 2000). Geç G2 ve erken M'de hücreler mitoz giriş için hazırlık yaparken, kromozomların yoğunlaşmaya başlaması gibi mitoz aşaması için gerekli adımlar da atılır. Geç G2 ve M başında eğer hücre herhangi bir stresle (mikrotübül yapının bozulması ve sentrozomların birbirinden ayrılabilmesi gibi) karşılaşır, CHFR'ye bağlı bu kontrol noktası harekete geçerek, kromozomların yoğunlaşmasını engeller ve böylelikle hücre M aşamasına geçemez. On sene kadar önce *CHFR* genini tanımlayan grup, bu kontrol noktasının farklı kanser hücrelerinde gerektiği gibi çalışmadığını da rapor etmişti (SCOLNICK ve HALAZONETIS, 2000). Daha sonraları CHFR'nin “antepfaz” olarak adlandırılan yeni bir kontrol noktasında profaz ile metapfaz arasındaki mikrotübül dinamiklerinin düzenlenmesinde rol aldığı kaydedilmiştir.

CHFR geninin ilk tarif edilmesinden bugüne kadar geçen sürede farklı araştırmacılar farklı kanser türlerinde bu kontrol noktasının düzgün çalışmadığını ve CHFR proteininin kanser hücrelerinde normale göre yeterince ifade edilmediğini gösterdiler (CHIN ve YEONG, 2010). Bu bulgular, CHFR'nin tümör baskılayıcı özellikte olduğuna dair ip uçları vermiştir. Bunun üzerine üretilen CHFR knock-out fare modelinde metastatik kanser oluşumu ve embriyonik hücrelerde dahi genomik dengesizlik oluştuğu gözlemlendi (YU et al., 2005). CHFR proteinin azalması veya tamamen ortadan kalkması durumu hemen hemen bütün primer tümörlerde (akciğer, kolon, özofagus, meme, beyin, kemik ve kan kanserlerinde) ve kanser hücre hatlarında yaygın bir olay olarak gösterildi (CORN et al., 2003; ERSON ve PETTY, 2004; MARIATOS et al., 2003; MIZUNO et al., 2002; PRIVETTE et al., 2007; SATOH et al., 2003; SHIBATA et al., 2002; TOYOTA et al., 2003). Farklı kanserlerde yaygın olarak ifadesi azaldığından dikkat çekici bir gen haline gelen CHFR için bu kez de ifadenin neden azaldığı incelenmeye başlandı. Bu yaygın gözlemin sebebinin de CHFR promotor bölgesindeki aşırı metilasyon olduğu primer tümörlerde ve hücre hatlarında gösterildi. CHFR'nin tümör baskılayıcı özellikte görevleri ve yaygın promotor hipermetilasyonu göstermesi, farklı tümörler için bioişaret olarak kullanımını gündeme getirmiştir. **Ancak, tümör baskılayıcı *CHFR* geninin genel olarak bütün tümörlerde hipermetilasyonu yaygın iken, meme kanserinde bu durum yoktur.** Meme kanserinin yaklaşık %40' ında CHFR protein ifadesi azalmış veya tamamen yok olmuştur ancak bizim ve diğerlerinin

yaptığı çalışmalarda meme kanseri hücrelerinde *CHFR* promotor bölgesinin hipermetilasyonun hiç de yaygın olmadığı (% 0.9) gözlemlenmiş ve rapor edilmiştir (ERSON ve PETTY, 2004; PRIVETTE et al., 2007; TOKUNAGA et al., 2006).

Bu projenin amacı da meme kanserine has olduğu anlaşılan bu durumun sebeplerini anlayabilmek ve literatürdeki bu konudaki boşluğu doldurabilmek için *CHFR* mRNA'sının mikroRNA'lar tarafından kontrol edilip edilmediğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem

Hücre kültürü ve PCR

Kullanılan meme kanseri hücre hatları, ATCC standartlarına uygun olarak büyütülmüştür. Hücrelerden fenol kloroform yöntemi ile DNA, Trizol (Sigma) ile RNA izolasyonu yapıldı. cDNA sentezinden sonra (Fermentas), Taq polimeraz (Fermentas) ile üreticinin önerileri doğrultusunda PCR yapıldı. Elde edilen ürünler %1-2'lik agaroz jellerde elektroforeze tabi tutuldu. Klonlama ve dizin analizleri için jel purifikasyon kitleri kullanıldı (Fermentas). Elde edilen nükleik asitler Nanodrop ile ölçüldü.

Western blotlama

Hücreler liziz çözeltisi ile patlatıldı (150 mM NaCl , 50 mM Tris, 1% Triton X-100, 0,5% Sodium deoxcholate, 0,1% SDS), BCA protein assay (Pierce) ile miktar tayini yapıldı. 50 µg protein, 6X SDS yükleme boyasıyla karıştırıldı ve örnekler 5 dakika kaynatıldı. Boş yürütülen ve temizlenen jelle yüklendi. Örnekler ayrıştırma jeline (%8) girene kadar 120 voltta, daha sonra da 150 voltta yurutuldu. 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 çözeltisine 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 solusyona %5 süt tozu eklendi. ECL deteksiyonu, X-ray makinesi kullanılarak yapıldı. Anti-CHFR tavşan antikoru 1:1000 (Cell signaling) ve 1:2000 keçide üretilmiş anti-tavşan HRP ikincil antikoru (Santa Cruz) kullanıldı. Jellerdeki protein miktarının eşitliğini test etmek için de Ponceau boyası (Sigma) kullanılarak, membranlar boyandı. ImageJ programı (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) kantifikasyon amaçlı kullanıldı.

Dual lusiferaz ölçümü

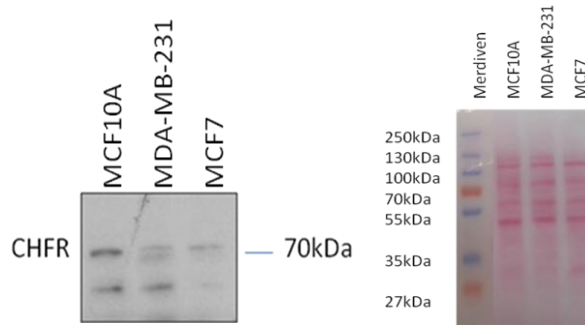
İlk olarak, dual lusiferaz ölçümünde kullanılacak iki farklı vektör (pmiR- phRL-TK) için transfeskiyon optimizasyonları yapıldı. 12×10^5 hücre 24 kuyulu plakalara ekildi. Ekimden 24 saat sonra Turbofect transfection reagent (Fermentas) kullanarak transfeskiyon gerçekleştirildi. 1000 ng, 500 ng, 250 ng and 100 ng total DNA ve 50:1 and 250:1 firefly: renilla vektör oranları kullanıldı. Vektör oranları optimizasyonu sonrasında, CHFR 3'-UTR bölgeleri pmiR vektörlerine klonlandı. Bütün klonlanan bölgeler dizin analizi ile doğrulandıktan sonra Renilla lusiferaz vektörü ile (phRL-TK) birlikte bahsi geçen hücrelere aktarıldı. Transfeskiyondan 24 saat sonra hücreler liziz tampon çözeltisi ile patlatıldı. İkili lusiferaz ölçümleri proje kapsamında edilen Modulus Microplate Multimode Reader (Turner Biosystems, USA) ile yapıldı. Dataların istatistiksel analizi ANOVA ve Tukey's testleri ile yapıldı ($p < 0.001$).

Bulgular

Çalışmanın amacı; meme kanserinde promotor metilasyonu bulunmayan CHFR'ın protein düzeyindeki düşüşünün sebebini irdellemek için 3' UTR SNP ve mikroRNA etkisinin incelenmesidir.

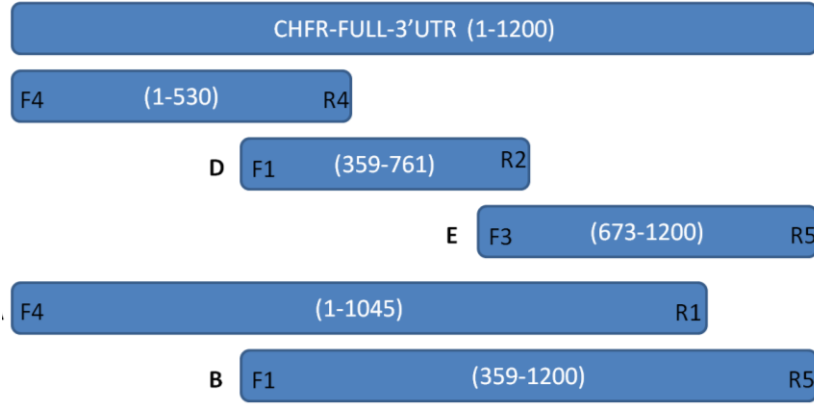
Literatür ve bizim verilerimize göre normal CHFR protein ve mRNA'sı bulunan MCF10A hücreleri, tümörjenik de olmadıkları için kontrol amaçlı kullanıldılar. *CHFR* mRNA'sı olmasına rağmen CHFR protein düzeyi düşük olan MDA-MB-231 ve MCF7 hücreleri de hipotezi test etmek amacıyla seçilmişlerdir.

İlk olarak, Western blotlama tekniği ile CHFR protein düzeyleri kontrol edildi. MCF10A hücreleri beklenildiği gibi normal meme dokusunu temsil ettiklerinden, CHFR protein düzeyleri normal kabul edildiğinde, MDA-MB-231 ve özellikle MCF7 hücrelerinde CHFR protein düzeyi düşük bulundu (Şekil 1).

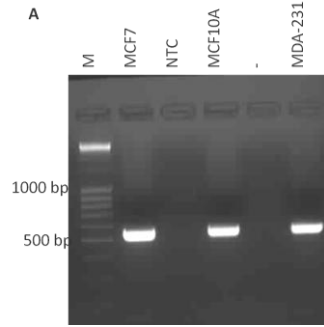


Şekil 1: Western blotlama CHFR proteinin düzeyini gösterdi. MCF10A, MDA-MB-231 ve MCF7 total hücre lizati kullanılarak yapılan Western blotda, CHFR için beklenen 73 kDa büyüklüğünde bir bant gözlemlendi. CHFR bantının altındaki özgün olmayan bantın kimliği bilinmemektedir. Protein eşit yüklemenin testi için de membran Ponceau ile boyanarak, kuyular arasında protein düzeylerinin eşit olduğu gösterildi.

Projenin hipotezini test edebilmek amacıyla ilk olarak bu 3 hücre hattında CHFR 3' UTR bölgesinde SNP olup olmadığının irdelenmesi için 3' UTR'ı parçalara bölmek suretiyle dizin analizi ile incelendi. Amaç, varsa bu hücreler arasındaki SNP farklılıklarını ortaya koymaktı. Bahsi geçen hücrelerden DNA ve RNA izole edildi. RNA'lar DNaz ile muamale gördükten sonra, cDNA sentezi gerçekleştirildi. *CHFR* 3' UTR kısmı PCR ile 5 parça halinde (Şekil 2) çoğaltılmak üzere primer çiftleri tasarlandı. PCR optimizasyonlarının ardından, üç hücre hattından çoğaltılan ürünler dizin analizine gönderildi. Elimize geçen sonuçlara göre 3 hücre hattında CHFR 3' UTR'de çok sayıda farklı polimorfizmler bulundu. Şekil 3'de bir bölgeye ait yapılan PCR deneylerine dair örnek jel resmi gösterilmektedir.



Şekil 2 : CHFR 3' UTR çoğaltma amaçlı tasarlanan ve sentezlenen PCR primerleri ve 3' UTR. CHFR 3' UTR 1200 baz uzunluğundadır.



Şekil 3: MCF7, MCF10A ve MDA-MB-231 hücre hatları cDNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR. Şekil 1'de pozisyonları gösterilen F4 and R4 primerleri 550 bazlık bir bölgeyi çoğalttılar. (M, DNA merdiveni, NTC; DNA bulunmayan negatif kontrol reaksiyonudur).

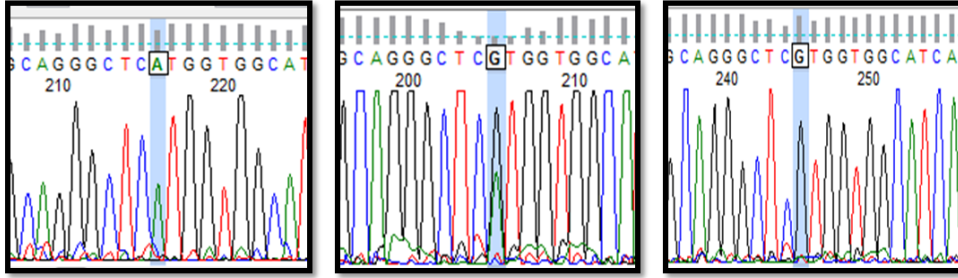
İlk etapta 3' UTR (DNA) dizin analizine başlanmış ancak elde edilen yüksek heterozigotluk yüzünden, cDNA'dan çoğaltılan 3' UTR bölgelerinin dizinlemesine geçilmiştir. Bunun sebebi, bahsi geçen kanser hücrelerinde yüksek oranda gözlemlenen aneuploidi ve/veya alelik ifade olarak düşünülmüştür. Bu durumda, ifade edilen aleldeki SNP'lerin önemli ve fonksiyonel olabileceği düşünülerek hücre hatlarından çoğaltılan cDNA örnekleri dizin analizine gönderilmiştir. Elde edilen dizin analizlerinin sonuçlarına ait örnek kromotogramlar Şekil 4'de ve tespit edilen SNP'lerin listesi Tablo 1'de verilmektedir.

SNP: rs3741490 (A/G)

MDA-MB-231 (A)

MCF7 (A& G)

MCF10A (G)



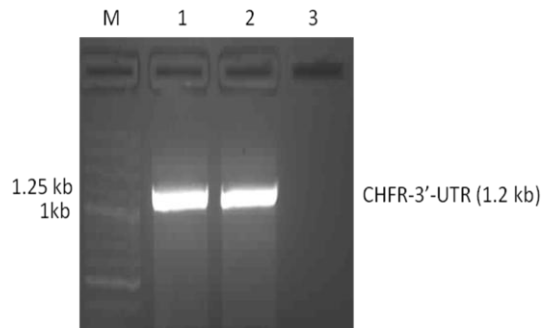
Şekil 4:CHFR 3' UTR'de bulunan SNP'lerden rs3741490'a ait örnek kromotogram.

SNP ID	Position	Allele	Heterozygosity	MCF7 cDNA	MDA-231- cDNA	MCF10A cDNA
rs1046130	3' UTR	C/T	0.012	C	C	C
rs11542904	3' UTR	C/T	N.D.	G	G	G
rs1046106	3' UTR	C/T	N.D.	C	C	C
rs73489148	3' UTR	C/G	0.500	C	C	C
rs8021	3' UTR	A/G	0.462	A/G	G	A
rs111338463	3' UTR	C/T	0.500	A	A	A
rs117246365	3' UTR	C/T	0.064	G	G	G
rs75167846	3' UTR	C/G	0.132	G	G	G
rs111786421	3' UTR	C/T	0.500	G	G	G
rs111799372	3' UTR	A/G	N.D.	C	C	C
rs15638	3' UTR	C/T	0.278	A	A	G
rs116857164	3' UTR	C/G	0.080	G	G	G
rs60054929	3' UTR	C/T	0.500	G	G	G
rs71942697	3' UTR	(>6bp)	N.D.	G	G	G
rs115799873	3' UTR	A/G	0.081	C	C	C
rs34409499	3' UTR	-C	N.D.	C	C	C
rs36039891	3' UTR	T/-	N.D.	A	A	A
rs112870346	3' UTR	C/T	0.500	A	A	A
rs4758909	3' UTR	A/G	0.072	C	C	C
rs3741489	3' UTR	C/T	0.372	A	A	G
rs76371933	3' UTR	A/C	0.044	T	T	T
rs75237791	3' UTR	A/G	0.061	C	C	C
rs3741490	3' UTR	C/T	0.383	A/G	A	G
rs111820152	3' UTR	A/G	0.500	C	C	C
rs66829221	3' UTR	-AA	N.D.	TT	TT	---
rs72528836	3' UTR	-AA	N.D.	TT	TT	---
rs1045979	3' UTR	C/T	N.D.	G	G	G
rs113800546	3' UTR	C/T	N.D.	A	A	A

Tablo 1: MCF7, MDA-MB-231 ve MCF10A cDNA'larında tespit edilen SNP'ler. Tabloda SNP kimlik numaraları, popülasyonda bulunan allellerin heterozigotluk frekansı ve dizin analizinde hücrelerde bulunan SNP'ler gösterilmektedir.

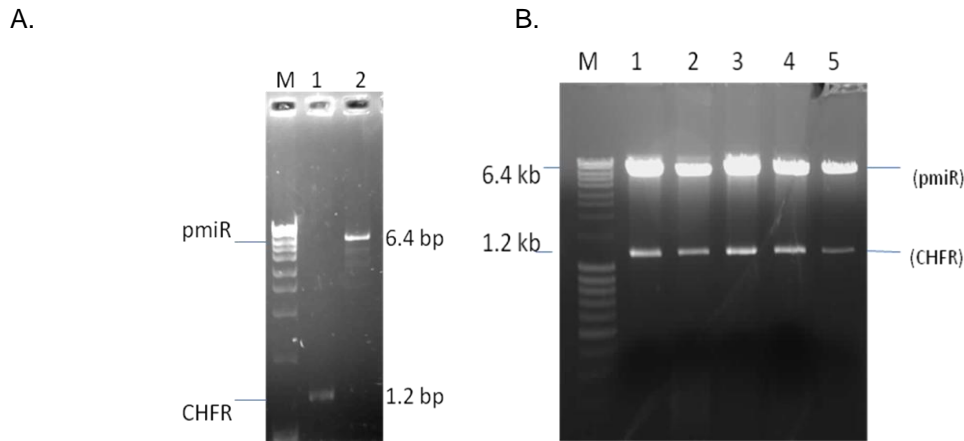
Projenin ikinci bölümünde, bulunan SNP'lerin CHFR 3' UTR'sine miR bağlanmasını etkileyip etkilemediği, lusiferaz raportör sistemi ile test edildi. Hücre hatlarından tek tek klonlanan tam uzunluktaki 3' UTR bölgeleri tekrar dizin analizine gönderildi. Bunun sebebi de heterozigot olan bir SNP lokusundan hangi alelin klonlandığının takip edilmesi gerektiğidir.

Şekil 5'de MCF10A cDNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen tam uzunluktaki 3' UTR PCR'ları gösterilmektedir. Enzim kesim siteleri eklenmiş primerle ve hata oranı düşük polimerazla gerçekleştirilen PCR sonucunda primerler optimize edilmiş, tüm 3' UTR bölgesi elde edilmiştir.



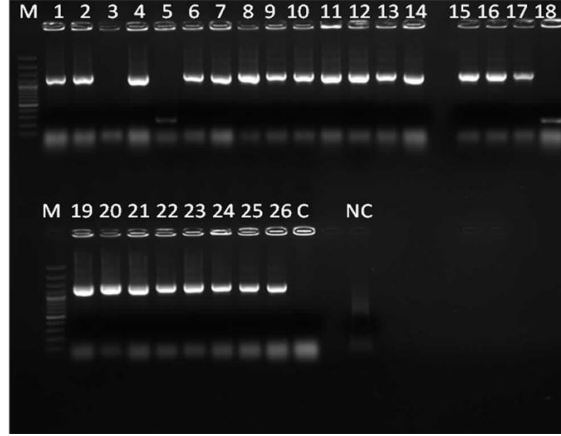
Şekil 5: MCF10A, CHFR 3' UTR klonlama PCR'ı. Hata oranı düşük polimeraz kullanılmıştır. M: DNA merdiveni, 1,2: MCF10A, 3: DNA (-) kontrol

Elde edilen 3' UTR ürünü, enzim kesiminden sonra (Şekil 6A), lusiferaz raportör vektörüne (pmiR) klonlandı ve enzim kesimi ve dizin analizi ile de doğrulandı (Şekil 6B).



Şekil 6: Örnek 3' UTR klonlama aşamaları. A. Boş pmiR ve CHFR 3' UTR PCR ürünleri klonlama amaçlı kesim enzimleri ile kesildi ve kesilmiş PCR ürünü pmiR'e klonlandı. B. Transformasyon sonrasında büyüyen kolonilerden elde edilen DNA, klonlama enzimleri ile kesildiğinde, 3' UTR'nin pmiR'e girdiği doğrulandı.

Ligasyon ve transformasyon sonrasında, elde edilen koloniler kullanılarak koloni PCR ile klonlamanın teyidi yapıldı (Şekil 7). MCF7 hücrelerine ait bu aşamalar örnek olarak verilmiştir.

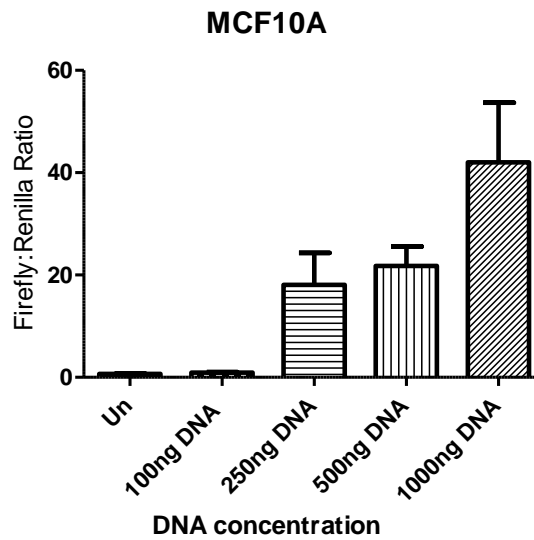


Şekil 7: Koloni PCR doğrulaması. İncelenen 26 koloniye ait PCR sonucuna göre Koloni 1 ve koloni 11, dizin analize gönderildi.

M: Merdiven, C: klonlama negatif kontrolü, NC: negatif kontrol.

Doğru uzunlukta PCR ürünü veren pozitif koloniler, doğrulama amaçlı dizin analizine gönderildi.

Bu esnada projenin diğer aşamasına geçildi. Lusiferaz deneylerine başlamadan önce optimum firefly ve renilla lusiferaz ifade ve transfeksiyonu irdelendi. İki vektörün kullanılma gerekçesi değişmesi muhtemel firefly lusiferazın transfeksiyon aşamasındaki varyasyonlardan etkilenmemesi için renilla lusiferaz ifadesi ile normalize edilmesi gereğidir. Normal meme dokusuna yakınlığından ötürü MCF10A hücreleri transfeksiyon için seçildi. Optimizasyon çalışmaları için, bu hücrelere farklı DNA oranlarında firefly ve renilla vektörleri aktarıldı.



Şekil 8: Optimizasyon. 12×10^5 hücre 24 kuyulu plakalara ekildi. Ekimden 24 saat sonra Turbofect transfection reagent (Fermentas) kullanarak transfeksiyon gerçekleştirildi. 1000 ng, 500 ng, 250 ng and 100 ng total DNA ve 50:1 and 250:1 firefly: renilla vektör oranları kullanıldı. (UN: transfekte edilmemiş, untransfected).

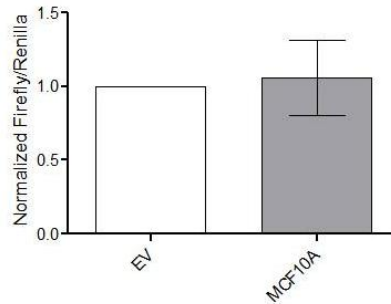
Elde edilen sonuca göre lusiferaz değerlerinin sature olmasını engellemek amacıyla 500 ng total DNA koşulunun uygunluğuna karar verildi.

Klonlanan 3' UTR bölgelerinde farklı olan SNP'ler Tablo 2'de verilmektedir. Burada dikkat çeken farklı MCF7 kolonilerinde farklı SNP'lerin bulunmasıdır. Bu da anopluidi ve olası bir alelik ifade sonucu olabilir. Bu durum aynı hücre içerisinde farklı mikroRNA bağlanma siteleri bulunan CHFR mRNA'larının farklı mikroRNA'lar tarafından kontrol edilebilecekleri olasılığını mümkün kılmaktadır.

SNP	MCF10A	MDA-MB-231	MCF7 koloni 1	MCF7 koloni 11
Rs8021	T	G	G	T
Rs3741490	G	A	A	G
Rs66829221	--	TT	TT	--
Rs3741489	G	A	A	A

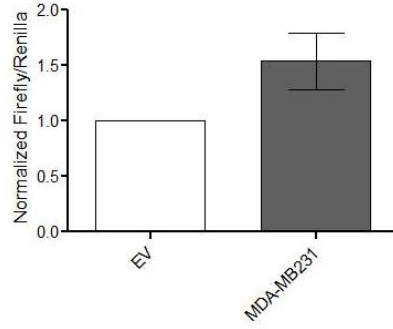
Tablo 2: Klonlanmış UTR vektörlerine ait (Rs8021- Rs3741489) SNP bölgesinin dizin analizi sonuçları

Elde edilen bu yapılar (3' UTR-pmiR), boş pmiR (EV-empty vector) ve pRL-TK, MCF10A hücrelerine geçici transfeksiyon yöntemi ile atıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra alınan ölçümlerde Firefly/Renilla normalizasyonu yapıldıktan sonra elde edilen değerler, boş vektör pmiR'e göre değerlendirildi (Şekil 9,10, 11). İlk olarak MCF10A hücrelerine, MCF10A CHFR 3' UTR-pmiR vektörü aktarıldı. Bu deney pozitif kontrol olarak tasarlanmıştır. Bu hücrelerde normal CHFR protein düzeyi bulunduğundan, MCF10A'ya ait CHFR 3' UTR SNP profilinin ve muhtemel mikroRNA havuzunun lusiferaz üzerinde etkili olmayacağı beklenmiş ve tahminler doğrultusunda bir sonuç ortaya çıkmıştır (Şekil 9).



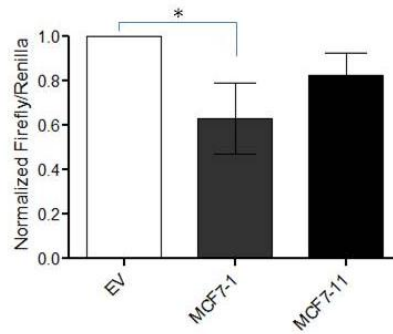
Şekil 9: MCF10A CHFR 3' UTR-pmiR'in MCF10A hücrelerindeki ikili lusiferaz sonucu. EV: boş pmiR transfeksiyonu ortalaması normalizasyon amacıyla sabitlemiştir.

Daha sonra MDA-MB-231 hücrelerine ait cDNA kullanılarak hazırlanmış olan MDA-MB-231 CHFR 3' UTR-pmiR vektörü ve boş pmiR (EV) MCF10A hücrelerine aktarılmıştır. Bu deneyin sonucunda (Şekil 10), MCF10A hücrelerinde MDA-MB-231 CHFR 3' UTR profili ile lusiferaz düzeyinde az da olsa bir artış belirlenmiştir. Bu artışın sebebi iki hücre hattında farklı bir mikroRNA havuzu bulunmasından kaynaklanabilir. Kanser hücrelerinde farklı mikroRNA ifade ediliyor olması beklenen bir durumdur.



Şekil 10: MDA-MB-231 CHFR 3' UTR-pmiR'in MCF10A hücrelerindeki ikili lusiferaz sonucu. EV: boş pmiR transfeksiyonu ortalaması normalizasyon amacıyla sabitlenmiştir.

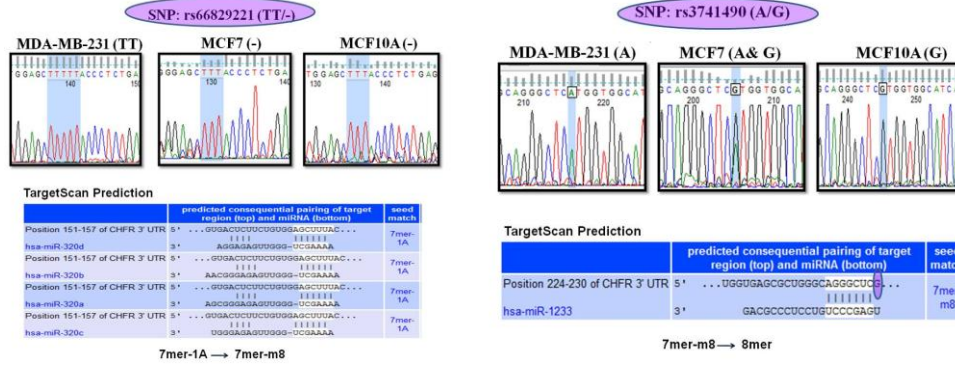
Son olarak, en düşük CHFR protein düzeyine sahip MCF7 hücrelerine ait MCF7-CHFR 3' UTR-pmiR vektörü ve boş vektör (EV) MCF10A hücrelerine aktarılmıştır. MCF7 CHFR 3' UTR bölgesinde DNA dizin analizi sonucumuza göre heterozigot bazı aleller bulunduğu ve hangi alelin cDNA havuzunda bulunduğu bilinmediğinden, 2 farklı 3' UTR-pmiR vektörü dizin analizine tabi tutulmuş ve farklı alellerin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu SNP'lerin önemli olabileceği düşüncesi ile iki koloni de (7. ve 11. koloniler olarak adlandırılmışlardır) MCF10A hücrelerine geçici transfeksiyon yöntemi ile aktarıldı. Normalize edilmiş lusiferaz sonucuna göre bu farklı alellerin farklı düzeyde lusiferaz üretimine sebep oldukları ve SNP'lerin fonksiyonel olabileceği tespit edilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11: MCF7 CHFR 3' UTR-pmiR'in MCF10A hücrelerindeki ikili lusiferaz sonucu. EV: boş pmiR transfeksiyonu ortalaması normalizasyon amacıyla sabitlenmiştir. MCF7-1: Koloni 1, MCF7-11: Koloni 11 (değişik SNP'ler içermektedir).

Sonuç olarak, Rs8021 SNP (Alel A), Rs8021 (Alel A), Rs66829221 (Alel TT) ve Rs3741489 (Alel A)'nın protein düzeyinde minimal bir etkisi olabileceği tespit edilmiştir. Aynı SNP'lerin farklı alellerini taşıyan diğer bir raportör gen plazmidi ile yapılan transfeksiyon sonucunda (MCF7-11), daha yüksek lusiferaz ifadesi elde edilmiştir (Şekil 11 ve MCF7-11).

SNP'lerin mikroRNA bağlanma bölgelerinde bir etkisi olabileceği öngörüsünü destekleyecek bazı biyoinformatik çalışmalar (miRBase, TargetScan) da yapılmıştır (Şekil 12,13). Tablo 2'de sunulmuş olan 2 SNP için olası miR bağlanma bölgeleri gösterilmektedir.



Şekil 12: Biyoinformatik analizler. SNP ve mikroRNA bağlanma bölgelerinin örtüşüğünü göstermektedir.

Şekil 12'de gösterildiği gibi SNP'lerin farklı alellerinin bulunması, olası mikroRNA bağlanma bölgelerini etkileyebilmektedir. Ancak bu etkinin, bağlanmayı engelleyecek düzeyde olması beklenmemektedir. Zira çekirdek dizinin mRNA ile bağlanması zaten %100 eşlenik olmayı gerektirmemektedir.

Ancak burada önemli bir nokta, MCF7 hücrelerinde bu iki farklı SNP profillerini içeren transkriptlerin birlikte bulunmasıdır. Dolayısıyla, transfeksiyon yapılmamış MDA-231 ve MCF7 hücrelerindeki CHFR protein düzeyi üzerine bu alellerin etki oranlarını tartmak zordur. Aynı şekilde MDA-231 hücrelerinde Rs8021- Rs3741489 bölgesindeki SNP alelleri MCF7 ile aynı olmasına rağmen lusiferaz değerleri iki hücre cDNA'sı için farklıdır. Bunun sebebi olarak da heterozigot anlatımı bulunan başka SNP'lerin olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca MDA-231 hücrelerinde azalmış CHFR ifadesinin nedeni sadece CHFR 3'UTR bölgesine bağlı olmayabileceği gibi, protein düzeyindeki azalmanın sebeplerinin tamamen farklı olması da muhtemeldir. Muhtemel mekanizmalar RNA'ya bağlanan proteinler veya protein stabilitesini azaltan mekanizmalar olabilir. Diğer bir konu da, henüz tüm mikroRNA genlerinin dizinleri bilinmediğinden, biyoinformatik yollarla belirlenememiş mikroRNA-mRNA bağlanma bölgeleri ve bu bölgelere denk düşen SNP alellerinin olabileceği ve frekansı düşük olduğu için dizin analizinde heterozigot bant vermediği halde, hücrelerde mevcut olan SNP alellerinin bulunabileceği göz ardı edilmemelidir.

Kısacası, projenin en önemli çıktısı, CHFR 3' UTR bölgesinde çok sayıda SNP bulunduğunun gösterilmesi, bu SNP'lerden bir kısmının farklı aleller içermesi, ve bu farklı alellerin de aynı hücre içerisinde cDNA popülasyonunda bulunmasıdır. Meme kanseri hücrelerinde sıklıkla gözlemlenen kromozom sayı anomalileri sonucu farklı SNP aleli içeren transkriptlerin hücre içinde bulunduğunu

göstermiştir. Ayrıca SNP'lerin belli kombinasyonlarının protein düzeyinde ufak oynamalara da yol açabileceği tespit edilmiştir.

Tartışma/Sonuç

Önemli bir tümör baskılayıcı olan CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains) proteini, erken mitozda bir kalite kontrol noktasında görevlidir. CHFR proteinin ifadesi pek çok tip farklı kanser hücresinde ve tipinde promotör hipermetilasyonuna bağlı olarak azalmakta veya tamamen yok olmaktadır. Ancak, meme kanseri hücrelerinde CHFR protein düzeyi düşük olmasına rağmen, CHFR promotör metilasyonu gözlenmemektedir. Bu da meme kanserlerinde CHFR proteinin azalmasında başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. Bu Hızlı Destek projesi kapsamında, CHFR 3' UTR'sinde bulunan olası SNP'ler (tek nükleotidlik polimorfizmler) ve SNP'lerin varsa mRNA-mikroRNA ilişkisindeki etkileri irdelenmiştir. Çalışmada model sistem olarak 3 hücre hattı kullanılmıştır. Bunlardan MCF10A; normal meme dokusunu temsil etmektedir. MDA-MB-231, düşük CHFR protein düzeyine sahiptir. MCF7'de ise en düşük CHFR protein düzeyi gözlemlenmiştir. Meme kanseri hücrelerinde CHFR protein düzeylerindeki azalmanın sebebini anlamaya yönelik kullanılan yaklaşım, transkripsiyon sonrası 3' UTR'de SNP'lerin olası varlığı ve bunlarla ilintili mikroRNA kontrolü irdelenmiştir. Yapılan dizin analizleri bu 3 hücre hattında CHFR 3' UTR'de çok sayıda SNP olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, cDNA dizin analizlerinde de heterozigot aleller olduğu görülmüştür. Bu SNP'lerin CHFR ifade düzeyi üzerinde etkili olabileceği yapılan lusiferaz deneyleri ile gösterilmiştir. CHFR 3' UTR bölgesi bu kez, lusiferaz geninin 3' UTR'sine klonlanarak, dizin analizi ile doğrulanmıştır. Normal CHFR ifadesine yakın olduğu için transfeksiyonlarda MCF10A hücreleri kullanılmıştır. Kısaca, MCF10A CHFR 3' UTR-pmiR yapısı, MCF10A hücrelerine aktarıldığında beklenildiği gibi pmiR'le (boş vektör) benzer düzeyde lusiferaz üretimi gerçekleşmiştir. MCF10A hücrelerinde normal düzeyde CHFR bulunmaktadır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise azalmış bir CHFR düzeyi tespit edilmiştir ancak MCF7 ile karşılaştırıldığında, MCF10A'ya daha yakın, ara bir değerdedir. Lusiferaz deneyinde MDA-MB-231'e ait CHFR 3' UTR vektörü ile yapılan deneyde lusiferaz düzeyinde bir miktar artış gözlemlenmiştir. Deney tekrarlanmış olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu da MDA-MB-231 hücrelerindeki CHFR ifadesinin MCF10A'dan farklı bir mikroRNA popülasyonu tarafından kontrol ediliyor olması ile açıklanabilir. Projenin önemli bir çıktısı MCF7 hücrelerinden klonlanmış CHFR 3' UTR vektörü ile yapılan çalışmadır. MCF7 hücrelerinde düşük düzeyde CHFR bulunmaktadır. Yapılan dizin analizlerinde bazı SNP lokasyonlarında heterozigotluk olduğu tespit edilmiştir. Klonlama aşamasında ise farklı SNP alelleri içeren vektörler kullanılmıştır. Bu vektörlerden sonuçlanan lusiferaz ifadesi MCF10A'ya ve birbirlerine göre farklıdır. Sonuç olarak, var olan SNP'lerin az da olsa bir etkisi olduğu görülmektedir. SNP'lerin bilinen veya bilinmeyen mikroRNA bağlanma siteleri üzerinde etkili olabileceği, çekirdek sekansın içinde veya dışında kalabileceği de düşünüldüğünde, SNP'lerin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bundan sonra yapılması gerekenler, tek tek SNP'lerin etkilerinin incelenmesi, bilinen bir mikroRNA bağlanma sitesini etkiliyorsa, bunun deneysel olarak doğrulanmasıdır. Ayrıca, bu çalışma kapsamında incelenen 3 hücre hattında ortaya çıkmış alel heterojenliğinin daha çok sayıda hücre hattı ve mümkün olursa hasta örneğinde incelenerek istatistiksel olarak anlamlandırılması gereklidir. Sadece UTR bölgesinde bu kadar yoğunlaşmış SNP varlığı irdelemeye değerlidir.

Özet olarak, bu proje sonunda elde edilen veriler, CHFR 3' UTR bölgesinde 27 adet SNP bulunduğunu göstermiştir. Bu SNP'lerden bir kısmının farklı aleller içermesi, bu farklı alellerin de aynı hücre içerisinde cDNA popülasyonunda bulunması da ilginç bir gözlemdir. Kanseri hücrelerindeki kromozom kopya sayılarındaki anormallikler gen anlatımına da yansımaktadır. cDNA dizin analizlerinde MCF7, MDA-231 ve MCF10A hücrelerinde bazı alellerde heterozigot gen anlatımı görülmüştür. Bunların hücre içerisindeki frekanslarının belirlenerek, protein düzeyine olan kümülatif etkilerini irdelemek gelecekte yapılması gerekli bir adımdır. Ancak bu proje sonucunda elde edilen preliminere göre, SNP'lerin belli kombinasyonlarının protein düzeyinde oynamalara da yol açabileceği görülmektedir. SNP'lerin sayıca fazla olması, hedefli mutagenesis çalışmalarını ve fonksiyonel analizleri de gerekli kılmaktadır. Devam edecek olan çalışmalarımızda hangi SNP alellerinin hangi mikroRNA bağlanma sitesini değiştirdiği incelemeye alınacak, bu SNP alellerinin frekansları çoklu örneklerde incelenecektir.

Referanslar

- CHIN, C. F., & Yeong, F. M. Safeguarding entry into mitosis: the antephasis checkpoint. *Mol Cell Biol*, 30(1), 22-32 (2010).
- CORN, P. G., Summers, M. K., Fogt, F., Virmani, A. K., Gazdar, A. F., Halazonetis, T. D., & El-Deiry, W. S. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of the mitotic stress checkpoint gene *Chfr* in colorectal and non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, 24(1), 47-51 (2003).
- ERSON, A. E., & Petty, E. M.. CHFR-associated early G2/M checkpoint defects in breast cancer cells. *Mol Carcinog*, 39(1), 26-33. (2004)
- GAO, Y., Lou, G., Zhang, G. M., Sun, X. W., Ma, Y. Y., Yang, Y. M., & Liu, G. CHFR promoter hypermethylation and reduced CHFR mRNA expression in ovarian cancer. *Int J Biol Markers*, 24(2), 83-89. (2009).
- HIRAKI, M., Kitajima, Y., Koga, Y., Tanaka, T., Nakamura, J., Hashiguchi, K., Noshiro, H., & Miyazaki, K. Aberrant Gene Methylation Is a Biomarker for the Detection of Cancer Cells in Peritoneal Wash Samples from Advanced Gastric Cancer Patients. *Ann Surg Oncol*. (2011).
- HU, S. L., Kong, X. Y., Cheng, Z. D., Sun, Y. B., Shen, G., Xu, W. P., Wu, L., Xu, X. C., Jiang, X. D., & Huang, D. B.. Promoter methylation of p16, Runx3, DAPK and CHFR genes is frequent in gastric carcinoma. *Tumori*, 96(5), 726-733. (2010)
- LEONG, K. J., Wei, W., Tannahill, L. A., Caldwell, G. M., Jones, C. E., Morton, D. G., Matthews, G. M., & Bach, S. P. Methylation profiling of rectal cancer identifies novel markers of early-stage disease. *Br J Surg*, 98(5), 724-734. (2011).
- LIANG, D., Meyer, L., Chang, D. W., Lin, J., Pu, X., Ye, Y., Gu, J., Wu, X., & Lu, K. Genetic variants in MicroRNA biosynthesis pathways and binding sites modify ovarian cancer risk, survival, and treatment response. *Cancer Res*, 70(23), 9765-9776 (2010)..
- MARIATOS, G., Bothos, J., Zacharatos, P., Summers, M. K., Scolnick, D. M., Kittas, C., Halazonetis, T. D., & Gorgoulis, V. G.. Inactivating mutations targeting the *chfr* mitotic checkpoint gene in human lung cancer. *Cancer Res*, 63(21), 7185-7189 (2003).
- MIZUNO, K., Osada, H., Konishi, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Fujii, Y., & Takahashi, T. Aberrant hypermethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers. *Oncogene*, 21(15), 2328-2333 (2002).
- MURAKI, Y., Banno, K., Yanokura, M., Kobayashi, Y., Kawaguchi, M., Nomura, H., Hirasawa, A., Susumu, N., & Aoki, D. Epigenetic DNA hypermethylation: clinical applications in endometrial cancer (Review). *Oncol Rep*, 22(5), 967-972 (2009)..
- PRIVETTE, L. M., González, M. E., Ding, L., Kleer, C. G., & Petty, E. M. Altered expression of the early mitotic checkpoint protein, CHFR, in breast cancers: implications for tumor suppression. *Cancer Res*, 67(13), 6064-6074. (2007).
- PRIVETTE, L. M., & Petty, E. M. CHFR: A Novel Mitotic Checkpoint Protein and Regulator of Tumorigenesis. *Transl Oncol*, 1(2), 57-64 (2008)..
- SAKAI, M., Hibi, K., Kanazumi, N., Nomoto, S., Inoue, S., Takeda, S., & Nakao, A. Aberrant methylation of the CHFR gene in advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 52(66), 1854-1857. (2005).
- SATOH, A., Toyota, M., Itoh, F., Sasaki, Y., Suzuki, H., Ogi, K., Kikuchi, T., Mita, H., Yamashita, T., Kojima, T., Kusano, M., Fujita, M., Hosokawa, M., Endo, T., Tokino, T., & Imai, K. Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer. *Cancer Res*, 63(24), 8606-8613 (2003)..
- SCOLNICK, D. M., & Halazonetis, T. D. *Chfr* defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*, 406(6794), 430-435 (2000)..
- SHIBATA, Y., Haruki, N., Kuwabara, Y., Ishiguro, H., Shinoda, N., Sato, A., Kimura, M., Koyama, H., Toyama, T., Nishiwaki, T., Kudo, J., Terashita, Y., Konishi, S., Sugiura, H., & Fujii, Y. *Chfr* expression is downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal cancer. *Carcinogenesis*, 23 (10), 1695-1699 (2002).
- SUN C, Southarda C, Olopade OI, Di Rienzo A, Differential allelic expression of c.1568C > A at UGT2B15 is due to variation in a novel cis-regulatory element in the 3'UTR. *Gene*. 481 (1), 24-28 (2011)
- TAKAHASHI, T., Shivapurkar, N., Riquelme, E., Shigematsu, H., Reddy, J., Suzuki, M., Miyajima, K., Zhou, X., Bekele, B. N., Gazdar, A. F., & Wistuba, I. I. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in gallbladder carcinoma and chronic cholecystitis. *Clin Cancer Res*, 10(18 Pt 1), 6126-6133 (2004)..
- TOKUNAGA, E., Oki, E., Nishida, K., Koga, T., Yoshida, R., Ikeda, K., Kojima, A., Egashira, A., Morita, M., Kakeji, Y., & Maehara, Y. Aberrant hypermethylation of the promoter region of the CHFR gene is rare in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 97(2), 199-203 (2006)..
- TOYOTA, M., Sasaki, Y., Satoh, A., Ogi, K., Kikuchi, T., Suzuki, H., Mita, H., Tanaka, N., Itoh, F., Issa, J. P., Jair, K. W., Schuebel, K. E., Imai, K., & Tokino, T. Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7818-7823 (2003)..
- YALNIZ, Z., Demokan, S., Suoglu, Y., Ulsan, M., & Dalay, N. Simultaneous methylation profiling of tumor suppressor genes in head and neck cancer. *DNA Cell Biol*, 30(1), 17-24 (2011)..
- YU, X., Minter-Dykhouse, K., Malureanu, L., Zhao, W. M., Zhang, D., Merkle, C. J., Ward, I. M., Saya, H., Fang, G., van Deursen, J., & Chen, J. *Chfr* is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nat Genet*, 37(4), 401-406 (2005).

Proje Özet Bilgi Formu

TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 111S263
Proje Başlığı: Tümör baskılayıcı gen CHFR'nin meme kanserinde susturulma mekanizmasının 3' UTR açısından irdelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Y.Doç.Dr.A.Elif Erson Bensan
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Biyoloji Bölümü, ODTÜ Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/09/2011-01/09/2012
Öz (en çok 70 kelime) Önemli bir tümör baskılayıcı olan CHFR kanser hücrelerinde promotor hipermetilasyonuna bağlı olarak azalmakta veya tamamen yok olmaktadır. Meme kanserinde CHFR protein düzeyi düşük olmasına rağmen, CHFR promotor metilasyonu gözlenmemektedir. Bu Hızlı Destek projesi kapsamında, CHFR 3' UTR'sinde bulunan SNP'ler (tek nükleotidlik polimorfizmler) ve varsa mRNA-mikroRNA ilişkisindeki etkileri irdelenmiş, 3' UTR bölgesinde pek çok SNP belirlenmiştir. Bu SNP'lerin farklı alellerinin hücrede aynı anda bulunduğu ve belli kombinasyonlarının protein düzeyini belirlemede rolleri olabileceği gösterilmiştir.
Anahtar Kelimeler: CHFR, UTR
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Projeden henüz yayın yapılmamıştır.