

# MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Dizisinde Prostaglandin Endoperoksid H Sentaz 2 (PTGS2), Kalretikulin (CALR) ve Keratin-19 (KRT19) Genlerinin Transkripsiyon Aşamasında Anlatımlarının Araştırılması

## Investigation of The Transcription Stages of Prostaglandin Endoperoxid H Synthase 2 (PTGS2), Calreticulin (CALR) and Keratin-19 (KRT19) Genes in the Breast Cancer MDA-MB-231

Duygu KAYA YİĞİT<sup>1</sup> , Süreyya BOZKURT<sup>2</sup> 

1 İstinye Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

2 İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.B.D, İstanbul, Türkiye

### Öz.

**Amaç:** Bu çalışmada MDA-MB-231 meme kanser hücre hattında prostaglandin endoperoksid H sentaz 2 (PTGS2), kalretikulin (CALR) ve keratin-19 (KRT19) genlerinin transkripsiyon düzeyindeki gen anlatımlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve metod:** Kültür ortamında çoğaltılan MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmış ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. PTGS2, CALR ve KRT19 genlerine spesifik primerler ile eş zamanlı PCR yapılarak, bu genlerin ifadesi transkripsiyonel seviyede belirlenmiştir.

**Bulgular:** MDA-MB-231 hücre hattında PTGS2 gen ifadesinde 14,92 kat; CALR gen ifadesinde 1,45 kat; KRT19 geninin ifadesinde ise 6,72 kat artış olduğu saptanmıştır.

**Sonuç:** Farklı solid kanserlerde, apoptoz direnci, metastaz, anjiyogenez gibi biyolojik süreçlerde rol aldığı bilinen KRT19, CALR, PTGS2 genlerinin meme kanseri gelişiminde de rol alabileceği ve ileride yapılacak detaylı çalışmalarla prognostik öneme sahip olacağı ön görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, PTGS2 geni, CALR geni, KRT19 geni

### Abstract

**Background:** In this study, we aimed to determine the gene expressions of prostaglandin endoperoxide H synthase 2 (PTGS2), calreticulin (CALR), and keratin-19 (KRT19) genes at transcriptional level in MDA-MB-231 breast cancer cell line.

**Materials and Methods:** RNA was isolated from MDA-MB-231 breast cancer cells grown in culture medium, followed by cDNA synthesis. Real-time PCR with specific primers for PTGS2, CALR and KRT19 genes was used to determine the expression of these genes at the transcriptional level.

**Results:** In the MDA-MB-231 cell line, a 14.92-fold increase in PTGS2 gene expression, a 1.45-fold increase in CALR gene expression and a 6.72-fold increase in expression of the KRT19 gene were found.

**Conclusions:** It is predicted that the KRT19, CALR, PTGS2 genes, which are known to play a role in biological processes such as apoptosis resistance, metastasis, and angiogenesis in different solid cancers, may also play a role in the development of breast cancer and will have prognostic importance with further studies.

**Key words:** Breast cancer, PTGS2 gene, CALR gene, KRT19 gene

Sorumlu Yazar /  
Corresponding Author

Süreyya Bozkurt

İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji A.B.D  
Maltepe Mahallesi, Edirne Çırpıcı  
yolu. No:9  
Zeytinburnu/İstanbul, Türkiye

e-mail: sureyyabozkurt8@gmail.com  
Tel:0850 283 60 00

**Geliş tarihi / Received:**  
30.09.2020

**Kabul tarihi / Accepted:**  
23.11.2020

DOI: 10.35440/hutfd.802625

## Giriş

Meme kanseri oldukça yaygın olan ve farklı alt tipler içeren son derece heterojen bir hastalıktır (1). Meme kanserlerinin alt tiplerinin prognoz ve tedavileri farklı olabileceğinden dolayı, alt tiplerinin arasında ayırım yapabilmek hayati öneme sahiptir. Patolojik özellikler ve invaziv özelliklerine göre, yaygın meme kanserleri üç ana gruba ayrılabilir: invaziv olmayan, invaziv ve metastatik meme kanserleri (2-5). Üçlü negatif meme kanseri, östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'den yoksun, oldukça agresif bir meme kanseri tipidir. Üçlü negatif meme kanserinin tedavisinde seçenekler oldukça kısıtlı olduğundan, hastalığın moleküler temelini anlamak, etkili yeni ilaç gelişimi için çok önemlidir (6). MDA-MB-231 hücreleri oldukça agresif, zayıf farklılaşmış üçlü negatif meme kanseri hücre dizisidir.

Kalretikulin, endoplazmik retikulumun lümeninde yer alan majör bir  $Ca^{2+}$  bağlayıcı proteindir (7). Kalretikulin kalsiyum homeostazındaki görevinin yanı sıra, hücre çoğalması, adezyon, gen ekspresyonunun modifikasyonu ve immün yanıtta da rol oynamaktadır (8-10). Sitokeratin 19 (*KRT19*) ise yapısal sertlikten sorumlu olan bir sitoplazmik ara filament proteinidir. Sitokeratin 19'un da dahil olduğu Keratin ailesi proteinleri yapısal bütünlüğü korumanın yanı sıra, hücre sinyalizasyonunda, stres yanıtında ve apoptozda önemli rol oynar (11). Çalışmamızda ifade düzeyini araştırdığımız bir diğer gen *Siklooksijenaz* veya *COX2* olarak da bilinen prostaglandin-endoperoksit H sentaz (*PTGS2*) geni idi. Bu gen ürünü olan *PTGS2* proteini prostaglandin biyosentezinde anahtar bir enzimdir ve hasarlı hücre zarlarının bir ürünü olan arazişik asidin prostaglandinlere dönüşümünde sınırlayıcı role sahiptir (12). *PTGS2*'nin birçok solid tümör tipinde ifade edildiği ve metaztaz ile ilintili olduğu rapor edilmiştir (13).

Yapılan bu çalışmada MDA-MB-231 üçlü-negatif meme kanser hücrelerinde, prostaglandin endoperoksit H sentaz 2 (*PTGS2*), kalretikulin (*CALR*) ve keratin-19 (*KRT19*) genlerinin transkripsiyon aşamasındaki ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bu genlerin oldukça agresif olan bu meme kanser alt tipinde, birer biyobelirteç olarak kullanıma potansiyelleri araştırılmıştır.

## Materyal ve Metod

Çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)' dan temin edilmiştir.

### Hücre Kültürü Uygulaması:

MDA-MB-231 hücre hattı %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş, 4,5 glukoz, L-glutamin ve sodyum piruvat içeren hazır Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ortamında kültüre edildi. Bütün hücre grupları %5  $CO_2$  ve 37 °C'de hücre kültür etüvünde steril şartlarda kültüre edildi. İnkübasyon sonrası hücreler toplandı ve analiz

için hücre peletleri elde edildi.

### RNA İzolasyonu;

Hücrelerden total RNA elde etmek için, Omega Biotek marka, R6834 katalog numaralı RNA izolasyon kit ürünü kullanılmış ve elde edilen RNA 'lar -80 °C'de saklanmıştır.

### cDNA Sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

cDNA sentezi için Qiagen marka QuantiTect Reverse Transcription kiti kullanılmıştır. Gen ifadelerinin analizi için qPCR'da kullanılmak üzere tasarlanmış olan her bir gene ait primerler Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Genlere ait primer dizileri

Gen	Primer dizisi
<i>PTGS2</i>	Forward: ATCATTACCAGGCAAATTGC Reverse: GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG
<i>KRT19</i>	Forward: CGGACAAATTCCTGGTGCC Reverse: ATCCAGCACCTGCGCAGGCC
<i>CALR</i>	Forward: AAGTTCTACGGTGACGAGGAG Reverse: GTCGATGTTCTGCTCATGTTTC
<i>GAPDH</i>	Forward: TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT Reverse: AACCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA

Amplifikasyon, Corbett Research Real-Time PCR Thermal Cycle cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı her bir reaksiyon tüpüne 10 µL 2X SYBR Green (HibriGen marka, mg-sybr-01-400 katalog numaralı ürün), forward ve reverse primerlerin her birinden 1,5 µL, 4 µL cDNA örneği, 4 µL nükleazdan arındırılmış su eklenerek hazırlandı. Reaksiyonun bileşenleri Tablo 2'de, reaksiyonun aşamaları ise Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2. qPCR reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Miktar	Sonuç konsantrasyonu
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	10 µL	1 X
Forward primer	1,5 µL	0,3 µM
Reverse primer	1,5 µL	0,3 µM
cDNA	4 µL	<500 ng
Su	4 µL	
Toplam	21 µL	

Tablo 3. qPCR Döngü Aşamaları

qPCR Döngü Aşamaları		
Denatürasyon		94 °C 4 dakika
Çoğalma	1. Denatürasyon	95 °C 30 saniye
	2. Bağlanma	58 °C 30 saniye
	3. Uzama	72 °C 30 saniye, Floresan okuma
Sonlanma		72 °C 10 dakika
X 36 DÖNGÜ		

## Bulgular

Gerçek zamanlı PCR analizinde, referans olarak kullanılan *GAPDH* geni ile *PTGS2*, *CALR* ve *KRT19* genlerinin Ct ve Tm değerleri Tablo 4' de belirtilmiştir. Tablo 4'de housekeeping gen *GAPDH* olmak üzere, MDA-MB 231 hücre hatında *PTGS2*, *KRT19* ve *CALR* genlerinin ifade seviyeleri

görülmektedir. Gerçek zamanlı PCR analizi sonuçlarına göre her üç genin ifade seviyesinde de artış gözlemlenmiştir. Analiz, üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş olup, esas alınacak değer için üçünün ortalaması alınmıştır.

Tablo 4. Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	MDA-MB-231	Delta Ct $\Delta$ Ct (MDA-MB-231)	Ekspresyon Değişimi 2 <sup>Δ-ΔCt</sup>
	Ortalama Ct değeri		
GAPDH (house-keeping gen)	29,31		
KRT19	22,28	7,95	6,72
CALR	30,23	13,1	1,45
PTGS2	23,16	7,07	14,92

Çalışmanın sonuçlarında 3 kez tekrarlı gerçek zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile MDA-MB-231 hücre hattında PTGS<sub>2</sub> gen ifadesinde 14,92 kat; CALR gen ifadesinde 1,45 kat; KRT<sub>19</sub> geninin ifadesinde ise 6,72 kat artış olduğu saptanmıştır.

### Tartışma

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin başında gelen bir sağlık sorunudur (14). Üçlü negatif meme kanseri hücre dizisi olan MDA-MB-231'de prostaglandin endoperoksid H sentaz 2 (PTGS<sub>2</sub>), kalretikulin (CALR) ve keratin-19 (KRT<sub>19</sub>) genlerinin, transkripsiyon düzeyindeki gen anlatımlarının belirlendiği bu çalışmada çalışılan her 3 gende transkripsiyonel düzeyde artış tespit edilmiştir.

Çalışılan genlerden biri olan CALR geni, Kalretikulin proteinini kodlar. Bu protein sentezlenen proteinlerin katlanmasında ve kalsiyum dengesinde anahtar rol oynayan bir proteindir (15). Meme kanseri de dahil olmak üzere akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, glioblastoma, gastrointestinal kanserler gibi çeşitli kanser türlerinde CALR ifade düzeylerinde değişiklikler görülmüştür (16). Çalışmamızda CALR gen ifadesinin, MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanser hücre dizisinde 1,45 kat arttığı tespit edilmiştir. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Lwin ve arkadaşları da MDA-MB-231 hücre hattında CALR ifade düzeyini anlamlı bir şekilde yüksek bulmuşlardır (17). Ayrıca meme kanserinde malign lezyonların invazivliği ile CALR ifade düzeyi arasında doğru- korelasyon olduğu gösterilmiştir (18).

Araştırdığımız bir diğer gen KRT<sub>19</sub> idi. Ara tip ipliksi protein olarak Keratin 19, hem normal hücrelerde hem de kötü huylu tümör hücrelerinde ifade edilmektedir. KRT'lerin, sinyal yollarını düzenleyen proteinler, apoptozda ve hücre döngüsü inhibisyonunda rol alan proteinler, invazyon ve metastaza aracılık eden proteinler ile etkileşimde olduğu bilinmektedir (19,20). Bu çalışmada MDA-MB-231 üçlü negatif meme hücre dizisinde KRT<sub>19</sub> gen ifadesinin 6,72 kat

arttığı tespit edildi. Kabir ve arkadaşları 2014 yılında 2.400 hastanın gen ifade profillerini kullanarak, Keratin 19'u (KRT<sub>19</sub>) meme kanserinde oldukça düzensiz bir gen olarak tanımlamıştır. KRT<sub>19</sub> ifadesinin hasta ırkından bağımsız, ancak hastalık derecesi ve ER, PR veya HER2 ekspresyonu ile korele olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmanın sonucunda KRT<sub>19</sub> ifadesinin prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesini göstermişlerdir (21).

Çalışmamızda transkripsiyonel seviyede ifade düzeyini araştırdığımız bir diğer gen ise COX2 olarak da bilinen Prostaglandin-endoperoksid Sentaz 2 (PTGS) idi. Prostaglandin H sentetaz (PGHS) olarak da bilinen siklooksijenaz enzim sistemi, siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) olmak üzere iki farklı izoenzimden oluşmaktadır. Siklooksijenaz-2 enzim sistemi ile meme kanserojenezi arasında önemli bir ilişki vardır. Yaptığımız çalışmada PTGS<sub>2</sub> ifadesi düzeyinde 14,92 kat artış olduğunu tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında meme kanserinde yüksek PTGS<sub>2</sub> ifadesinin kötü prognozla ilişkilendirildiği görülmektedir (22,23). Ari Ristimaki ve arkadaşları 1576 kişiyi dahil ettikleri meme kanseri çalışmasında artan PTGS<sub>2</sub> ifadesinin, kötü prognoz için belirteç olarak kullanılabilmesini ve düşük sağ kalım oranı ile anlamlı şekilde korele olduğunu ortaya koymuşlardır (24). Bazı çalışmalar da yüksek PTGS<sub>2</sub> ifadesi ile metastaz arasındaki ilişkiye işaret etmektedir (25). 2003 yılında Shim jeong ve arkadaşları, çalıştıkları meme kanseri örneklerinin %72'sinde PTGS<sub>2</sub> pozitifliği göstermişlerdir. Ayrıca çalıştıkları hastalardaki PTGS<sub>2</sub> geninin aşırı ifadesinin, tümör büyüklüğü ve ileri evre ile anlamlı olarak ilintili bulmuşlardır. PTGS<sub>2</sub>'nin meme kanseri gelişimine katkıda bulunabileceğini ve meme kanserinde prognostik bir gösterge olarak kullanılabilmesini belirtmişlerdir (26). Ghahremanfard ve arkadaşları ise 2013 yılında yaptığı çalışmada PTGS<sub>2</sub>'nin aşırı ifadesinin, lenf nodu tutulumunun derecesi ile pozitif ilişkili olduğunu, ancak HER2, ER ve PR reseptörlerinin ekspresyonu ile ilişkili olmadığını gözlemlenmişlerdir (27).

MDA-MB-231 üçlü-negatif meme kanseri hücrelerinde, PTGS<sub>2</sub>, CALR ve KRT<sub>19</sub> genlerinin transkripsiyonel seviyede ifadelerinin araştırıldığı bu çalışmada her 3 genin ifadesinde de artış olduğu bulunmuştur. PTGS<sub>2</sub> gen ifadesinde 14,92 kat; CALR gen ifadesinde 1,45 kat; KRT<sub>19</sub> geninin ifadesinde ise 6,72 kat artış belirlenmiştir. Her üç genin de farklı kanserlerde, apoptoz direnci, metastaz, anjiyogenez gibi biyolojik süreçlerde rol aldığını gösteren çalışmalar göz önüne alındığında, bu üç genin meme kanseri gelişiminde rol alabileceği ve ileride daha fazla sayıda denek ile yapılacak detaylı çalışmalardan elde edilecek veriler ile prognostik öneme sahip olacağı ön görülmektedir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma etik onam alınması gereken çalışmalar kapsamı dışında olan hücre kültürü çalışmasıdır.

## Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 7-30
2. Benson JR, Jatol I. The global breast cancer burden. *Future Oncol* 2012;8(6):697-702
3. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, Tyrer J, Brook MN, Bolla MK, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(5):djv036
4. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(S3):43-46.
5. Youlden DR, Cramb SM, Yip CH, Baade PD. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biol Med*. 2014;11(2):101-15
6. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3155-63.
7. Perrone, L, Tell G, Lauro RD. Calreticulin enhances the transcriptional activity of thyroid transcription factor-1 by binding to its homeodomain. *J Biol Chem*.1999; 274(8): 4640-45.
8. Waser M, Mesaali N, Spencer C, Michalak M. Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *J Cell Biol*. 1997;138(3):547-57.
9. Rooke K, Briquet-Laugier V, Xia YR, Lusic AJ, Doolittle MH. Mapping of the gene for calreticulin (Calr) to mouse chromosome 8. *Mamm Genome*. 1997;8(11):870-71.
10. Smith MJ, Koch GL. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J*. 1989;8(12):3581-86.
11. Coulombe, PA., Omary, MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*.2002; 14 (1):110-22
12. Daneau G, Boidot R, Martinive P, Feron, O Clin. Cancer Res Identification of cyclooxygenase-2 as a major actor of the transcriptomic adaptation of endothelial and tumor cells to cyclic hypoxia: effect on angiogenesis and metastases. *Clin Cancer Res*.2010; 16(2):410-9
13. Ogino S, Kirkner GJ, Nosho K, Irahara N, Kure S, Shima K, et al. Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8221-27.
14. Murray, CJL., Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*.1997; 349: 1269-76
15. Michalak M, Corbett EF, Mesaali N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J*. 1999; 344:281-92
16. Harada K, Takenawa T, Ferdous T, Kuramitsu Y, Ueyama Y. Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4857-62.
17. Lwin ZM, Guo C, Salim A, Yip GW, Chew FT, Nan J, et al. Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol*. 2010; 23(12):1559-66.
18. Zamanian M, Qader Hamadneh LA, Veerakumarasivam A, Abdul Rahman S, Shohaimi S, Rosli R. Calreticulin mediates an invasive breast cancer phenotype through the transcriptional dysregulation of p53 and MAPK pathways. *Cancer Cell Int*. 2016;16:56.
19. Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol*. 2004;6(8):699-706.
20. Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT, Seftor RE. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1996;15(4):507-25.
21. Kabir NN, Rönstrand L, Kazi JU. "Keratin 19 expression correlates with poor prognosis in breast cancer". *Mol Biol Rep*. 2014;41(12):7729-35.
22. Solanki R, Agrawal N, Ansari M, Jain S, Jindal A. COX-2 Expression in Breast Carcinoma with Correlation to Clinicopathological Parameters. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(7):1971-75.
23. Sakoda LC, Gao YT, Chen BE, Chen J, Rosenberg PS, Rashid A, et al. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene polymorphisms and risk of biliary tract cancer and gallstones: a population-based study in Shanghai, China. *Carcinogenesis*. 2006; 27(6):1251-56
24. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62(3):632-35.
25. Liu X, Feng C, Liu J, Liu J, Li C, Xu C, Niu et al. The importance of EGFR as a biomarker in molecular apocrine breast cancer. *Hum Pathol*. 2018 ;77:1-10.
26. Shim JY, An HJ, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. *Mod Pathol*. 2003;16(12):1199-204.
27. Ghahremanfar F, Toussy JA, Kazeminezhad B, Ramezani F. Role of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in breast cancer differentiation and its relationship with hormone receptors status.2013; 8 (4): 235-240.