



Yumurtalık Kanseri Hücre Soylarında CIP2A Onkogeni Mutasyonlarının Taranması

Screening of CIP2A Oncogene Mutations in Ovarian Cancer Cell Lines

Duygu YAŞAR ŞİRİN¹, Türker BİLGİN²

¹Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

²Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

Yazışma Adresi

Correspondence Address

Türker BİLGİN

Namık Kemal Üniversitesi
Sağlık Yüksekokulu,
Beslenme ve Diyetetik Bölümü,
Tekirdağ, Türkiye
E-posta: tbilgen@nku.edu.tr

Geliş tarihi \ Received : 14.02.2018
Kabul tarihi \ Accepted : 21.03.2018
Elektronik yayın tarihi : 26.04.2018
Online published

Yaşar Şirin D, Bilgin T. Yumurtalık kanseri hücre soylarında CIP2A onkogeni mutasyonlarının taranması. Akd Tıp D 2019;1:55-59.

Türker BİLGİN
ORCID ID: 0000-0002-3015-0929
Duygu YAŞAR ŞİRİN
ORCID ID: 0000-0002-1224-442X

ÖZ

Amaç: Kansere ilişkili genetik değişimlerin belirlenmesi erken tanı, hastalığın takibi ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. CIP2A, birçok insan kanserleri ile ilişkilendirilmiş yeni tanımlanmış bir onkoproteindir. Birçok kanserde CIP2A gen ekspresyonunun artışı gösterilmiştir ancak bu güne kadar AGS, HeLa, HT1080 kanser hücre soylarında CIP2A promotor bölge mutasyonlarının araştırıldığı ve tarafımızdan yapılmış olan bir çalışma dışında herhangi bir kanser tipinde CIP2A geninin kodlayan dizilerindeki mutasyonlarını araştıran bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmamızda CIP2A gen ekspresyonunun kanserdeki artışına ilişkin moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunmak amacı ile bu genin onkogenik etkisinin oluşmasında rolü olması muhtemel regülatör bölge ve gen içi mutasyonlar araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: CIP2A geninin kodlayan dizileri, ekzon-intron bağlantı bölgeleri ve promotor bölgesi DNA dizi analizi yöntemiyle SK-OV-3, Ov-CAR3 ve Caov-3 insan yumurtalık kanseri hücre soylarında taranmıştır.

Bulgular: Ov-CAR3 hücre soyunda ekson 3, intron 6 ve intron 8'de, Caov-3 hücre soyunda ise sadece intron 6 ve intron 8'de genomik değişimler saptanmıştır.

Sonuç: Bulgularımız, yumurtalık kanseri için CIP2A ekspresyonundaki artışta CIP2A'daki genomik değişimlerin etkisini dışlamaktadır. CIP2A onkoproteinini yüksek düzeylerde ekspresyon eden hücrelerde bu duruma neden olabilecek diğer mekanizmaların da araştırıldığı fonksiyonel çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Sözcükler: CIP2A geni, DNA dizi analizi, SK-OV-3, Ov-CAR3, Caov-3

ABSTRACT

Objective: Determination of genetic changes associated with cancer is important for early diagnosis, follow-up of the disease and development of targeted therapeutic approaches. CIP2A is a newly identified oncoprotein associated with many human cancers. In many cancers, an increase in the CIP2A gene expression has been shown, but until now there has been no study investigating CIP2A promoter region mutations except our previous study about the mutations in the coding sequence of the CIP2A gene in AGS, HeLa, HT1080 cancer cell lines. The aim of this study was to contribute to the elucidation of the molecular mechanisms of CIP2A over expression in cancer and investigate the possible regulatory regions and intra-genic mutations that may play a role in the oncogenic effect of this gene.

Material and Methods: The sequences encoding the CIP2A gene, exon-intron linkage regions, and the promoter region were screened in the SK-OV-3, Ov-CAR3, and Caov-3 human ovarian cancer cell lines by DNA sequence analysis.

Results: Genomic changes were detected at exon 3, intron 6 and intron 8 in the Ov-CAR3 cell line and at intron 6 and intron 8 in the Caov-3 cell line.

Conclusion: Our findings exclude the effect of genomic alterations in CIP2A in the increase in CIP2A expression for ovarian cancer. For cells expressing CIP2A oncoprotein at high levels, there is a need for functional studies to examine the underlying mechanisms.

Key Words: CIP2A gene, DNA sequence analysis, SK-OV-3, Ov-CAR3, Caov-3

DOI: 10.17954/amj.2018.1016

GİRİŞ

CIP2A birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiş yeni tanımlanmış bir onkoproteindir. CIP2A ilk olarak hepatosellüler karsinomda ekspresyonundaki artış nedeniyle kanserle ilişkilendirilmiş ve molekül ağırlığından yola çıkarak p90 proteini olarak isimlendirilmiştir. CIP2A onkogeni 2002 yılında klonlanarak moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (1). Junttila ve ark. CIP2A onkogeni ekspresyonundaki artışın, protein fosforilaz 2A (PP2A) aracılığı ile gerçekleşen c-Myc Serin (62) defosforilasyonunu, böylelikle c-Myc degradasyonunu engellemek suretiyle hücrede artmış onkojenik sinyale neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, veri tabanlarında KIAA1524 ön isimlendirmesiyle de tanınan p90 proteinini, c-Myc artışına neden olan PP2A inhibisyonundan yola çıkarak “*Cancerous Inhibitor of PP2A*” (CIP2A) olarak isimlendirmişlerdir (2).

CIP2A geni kromozomal olarak 3q13.13 bölgesinde lokalize, yaklaşık 40 kb’ lik bir bölgede yer almaktadır. CIP2A geni negatif zincir üzerindedir ve 905 amino asitlik bir proteini kodlar (1). CIP2A proteini testis, beyin, prostat ve kemik iliği gibi sınırlı sayıdaki normal dokuda yüksek miktarda, diğer normal dokularda ise az miktarda sentez edilir (2). Günümüzde halen CIP2A’nın hücredeki biyolojik rolü bilinmemektedir. CIP2A geninin yeni bir onkogen olarak tanımlanmasının ardından, çalışmalar hastalardan elde edilen dokularda farklı kanser tiplerinde tanı, prognoz ve tedavi yönünden önemini araştırmaya yönelmiştir. CIP2A onkoproteini mide, meme, prostat, mesane, özofarengeal, küçük hücreli olmayan akciğer ve yumurtalık kanserleriyle ilişkilendirilmiştir (3-11). CIP2A solid tümörlerin dışında akut myeloid lösemi ile de ilişkilendirilmiştir (12). Ayrıca CIP2A’nın hepatosellüler karsinoma hücrelerinde AKT sinyal yolağı üzerinden

bortezomib indüklü apoptozisi inhibe ettiği ve dirençlilikten sorumlu olduğu gösterilmiştir (13). Yumurtalık kanseri hücre soyunda CIP2A ekspresyonunun baskılanmasının cisplatine hassasiyeti artırdığı gösterilmiştir (14). Yapılan bu çalışmaların yanı sıra, CIP2A onkogeninin kanser hücrelerinde ekspresyonun artmasına neden olan moleküler mekanizmalara yönelik çalışmalar da diğer taraftan ilerlemektedir. Mide kanserinde rolü olan *Helicobacter pylori* tarafından üretilen Cag A proteininin Src ve MEK/ERK sinyal yolları aracılığı ile CIP2A ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (15). Baş-boyun bölgesi skuamöz hücreli karsinomda CIP2A geni kopya sayısı artışının kötü prognoz ile ilişkisi gösterilmiştir (5). Ayrıca, EGFR-MEK1/2 sinyal yolu ve ETS1 transkripsiyon faktörü aracılığı ile CIP2A ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada AGS, HeLa, HT1080 gibi değişik kökenlerden gelen kanser hücre soylarında CIP2A geni promotör mutasyonlarının varlığı ve CIP2A protein miktarı arasındaki ilişki rapor edilmiştir (16). Bugüne kadar herhangi bir kanser tipinde CIP2A geninin kodlayan dizilerindeki mutasyonları araştıran bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca yumurtalık kanserinde CIP2A promotör bölge mutasyonları araştırılmamıştır. Çalışmamızda, CIP2A ekspresyonunun artmış olduğu daha önceki çalışmalar ile gösterilmiş olan (10, 17) insan yumurtalık kanseri hücre soylarında CIP2A’nın onkogenik etkisinin oluşmasında rolü olması muhtemel olan promotör bölge ve gen içi mutasyonları DNA dizi analizi yöntemiyle araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

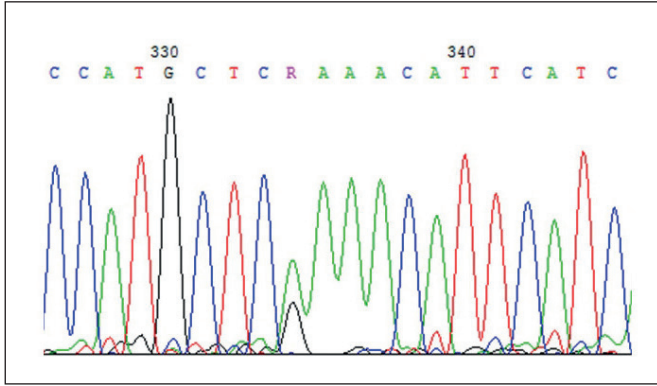
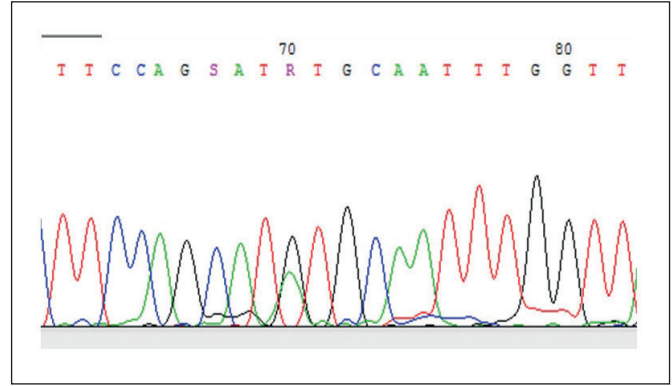
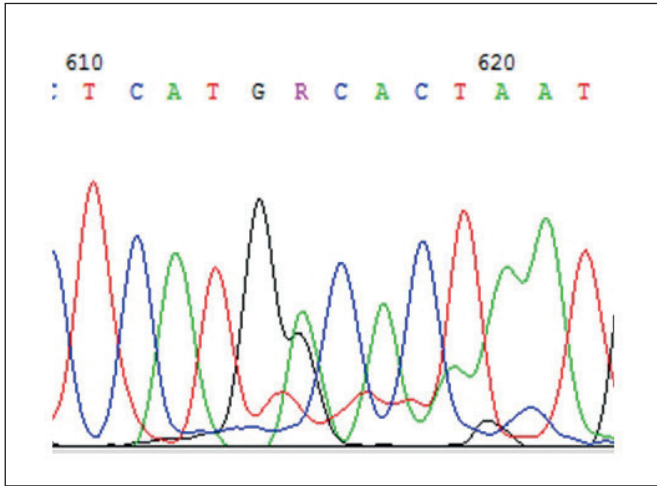
Öncelikle CIP2A geni için veri tabanlarında yer alan fonksiyonel açıdan önemli olabilecek genomik varyantlar tespit edildi. CIP2A geni bilinen bu genomik varyantları,

Tablo I: CIP2A geni DNA dizi analizi için kullanılan primer dizileri.

	F primer	R primer
1. Bölge	GCAGAAGGGGCGGGTGTAGG	CGCCACTCCTCGGCCTCACT
2. Bölge	GGCCGACCGAACTGAGATGGT	CCACCGCCCTGCCCCAAATT
3. Bölge	AGTTTGCCCACTCTGTGCAAGA	TGGAGAATGGCACAACCCTATTGA
4. Bölge	CCTCTGAGGTTCTCACAGTCCTGC	ACTATCCCCAGTAGTCAGGCAACAA
5. Bölge	TCACAGGAGACTTAGGTCAATGGCA	ACTGATCGTCCGTCCAGGGGA
6. Bölge	TGCCTAAGGTTACCGTCTGTTGTTG	AGGAAAAGGCTGAGGAAGCAGCA
7. Bölge	ATGAGAATGCTGATGGTGTGCACA	TCGGGTCTCAGAAAAGAAATGCTGC
8. Bölge	ACCACATCAGTCAACCAAAACATGT	AGCAATTGCCTGTAACCTCCACCA
9. Bölge	ACTTGCCCTTAGAGCGCAGGCA	TGCACACTTGAAAATACCAGGTGCT
10. Bölge	CCCAATTCCTTAGGCTTCCT	GGCAAAACAGAATAGAAAGCAA
11. Bölge	TTGGATTCTACTCTTGCTGCAT	GCACTAGGCTAGGCTGTCTCA
12. Bölge	TGTCTCTGAAGAAGCACAAAAGA	TGCATGCAATTTCAAAAGAGA

Tablo II: Yumurtalık kanseri hücre soylarında tespit edilen CIP2A geni genomik değişimleri.

Yumurtalık Kanseri Hücre Soyları	Ekzon 3	İntron 6	İntron 8
SK-OV-3	-	-	-
Ov-CAR3	c.686G>A (rs2278911) / N	c.1515+212A>G (rs1454194) / N	c.2211-105A>G (rs2045095) / N
Caov-3	-	c.1515+212A>G (rs1454194) / N	c.2211-105A>G (rs2045095) / N

**Şekil 1:** Ekzon 3'teki c.686 G>A (rs2278911) değişimi.**Şekil 3:** İntron 8'deki -105A>G (rs2045095) değişimi.**Şekil 2:** İntron 6'daki +212A>G (rs1454194) değişimi.

eksonları, intron-ekson bağlantı bölgelerini ve promotor bölgesini kapsayacak şekilde 12 bölgeye ayrılarak insan yumurtalık kanseri hücre soyları olan SK-OV-3, Ov-CAR3, Caov-3 hücre soylarında DNA dizi analizi yöntemiyle analiz edildi. Böylelikle CIP2A geni, daha önce tanımlanmış genomik varyantlar açısından tarandığı gibi aynı zamanda genin kodlayan dizilerinin büyük bölümü ve promotor bölgesi için DNA dizi analizi yöntemi ile tarandı. CIP2A geni üzerinde ilgilenilen gen bölgelerinin PCR yöntemiyle çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri Tablo I' de yer almaktadır. DNA amplifikasyonları ProFlex model PCR cihazı (Applied Biosystems) kullanılarak sağlandı. PCR ürünleri %2' lik agaroz jel elektroforezi ve

jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) ile görüntülenerek kontrol edildikten ve manuel yöntemle saflaştırıldıktan sonra, saflaştırılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile tekrar kontrol edilerek DNA dizi analizi reaksiyonları gerçekleştirildi. DNA dizi analizi reaksiyonu sonrası manuel saflaştırma yapılarak kapiller elektroforezleri gerçekleştirildi. Elde edilen DNA dizi analizi sonuçları CIP2A geni referans dizilerine karşılaştırılarak değerlendirildi ve genomik değişimler saptandı. Saptanan genomik değişimler sekans reaksiyonları ve dizi analizi tekrar edilerek teyit edildi.

BULGULAR

İnsan yumurtalık kanseri hücre soyları olan SK-OV-3, Ov-CAR3, Caov-3 hücrelerinde CIP2A geni DNA dizi analizi yöntemiyle tarandığında bir tanesi genin kodlayan dizilerinde, diğer ikisi intronik dizilerde olmak üzere toplam üç genomik değişim saptandı. Veri tabanlarında yapılan araştırma bu üç genomik değişimin daha önce bildirilmiş olduğunu gösterdi. Kodlayan diziler üzerinde yer alan genomik değişim CIP2A proteininde 229. pozisyondaki Arjinin amino asidinin Glisine dönüşmesine neden olan c.686 G>A (rs2278911) değişimidir (Şekil 1). Diğer iki intronik değişim ise intron 6' daki +212 A>G (rs1454194) ve intron 8'deki -105A>G (rs2045095) değişimleridir (Şekil 2 ve 3). Tespit edilen genomik değişimler ve hangi hücre soylarında buldukları Tablo II' de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda CIP2A geninin kodlayan dizileri, ekzon-intron bağlantı bölgeleri ve promotor bölgesi DNA dizi

analizi yöntemiyle SK-OV-3, Ov-CAR3, Caov-3 yumurtalık kanseri hücrelerinde tarandı. Kanser hücre soylarından elde edilen CIP2A geni DNA dizileri veri tabanlarından elde edilen referans diziler ile karşılaştırıldığında 3 farklı genomik değişiklik tespit edildi. Bu genomik değişimlerden rs2278911 kodlayan diziler üzerinde yer almaktadır ve 229. pozisyondaki Arjinin amino asidinin Glisine dönmesine neden olan c.686 G>A değişimidir. 1000 genom projesi verilerine göre rs2278911 (NM_020890.2:c.686G>A. NP_065941.2:p.Arg229Gln) referans numarasıyla daha önce bildirilmiş olan değişimin sıklığı Avrupa toplumları için 0.08 olarak bildirilmektedir. Kodlayan diziler üzerinde yer alarak amino asit değişimine neden olan bu değişimin kanser dışı dokularda bildirilmiş olması bu değişimin kansere özgü somatik bir mutasyon olmadığını göstermektedir. Literatürde rs2278911'in kansere yakınlıkla ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma mevcuttur ve bu çalışmada rs2278911'in hepatoselüler karsinoma ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (18). Çalışmamızda tespit edilen diğer genomik değişimler intronik diziler üzerinde yer alan, rs1454194 ve rs2045095 referans numaraları ile tanınan daha önce bildirilmiş genomik değişimlerdir. 1000 genom projesinde bu iki SNP'nin birbirine çok yakın sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir. Literatür bilgisine ilave olarak çalışmamızda rs1454194 ve rs2045095 SNP' lerinin Ov-CAR3 ve Caov-3 hücrelerinde birlikte heterozigot formda görülmeleri ve SKOV-3 hücrelerinde ise her ikisinin de olmaması bu iki SNP'nin aynı haplotip üzerinde bulduklarını düşündürmektedir. Literatür taramalarımızda rs1454194

ve rs2045095 SNP' lerinin klinik önemine ilişkin bir çalışmayla karşılaşmamıştır. Promotor bölgedeki değişimlerin gen ekspresyonunu değiştirebildikleri bilinmektedir. Mide, serviks ve fibrosarkom hücre soylarında CIP2A promotor bölge mutasyonları bildirilmiştir (16). Ayrıca diğer birçok kanser tipinde olduğu gibi yumurtalık kanserlerinde de CIP2A ekspresyonunun artmış olduğu bilinmektedir (10, 17). Bununla birlikte çalışmamızda yumurtalık kanseri hücrelerinde CIP2A gen ekspresyonu üzerine belirleyici etkisi olan promotor dizilerinde herhangi bir genomik değişim saptanmadı. SKOV-3'ün diğer yumurtalık kanseri hücre soylarına göre cisplatine daha fazla dirençli olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Artan CIP2A'nın AKT fosforilasyonunu arttırmak suretiyle cisplatin direncine neden olduğu öne sürülmüştür (14). Ancak yaptığımız çalışmada CIP2A ekspresyonunda artışa ve SKOV-3'teki cisplatin dirençliliğine neden olabilecek bir genomik değişim saptanmamıştır.

SONUÇ

Bulgularımız, yumurtalık kanseri için CIP2A ekspresyonundaki artışta CIP2A'daki genomik değişimlerin etkisini dışlamaktadır. CIP2A gen ekspresyonunun kanserde normal dokulara kıyasla yüksek olması; CIP2A gen kopya sayısındaki artış, promotor bölge mutasyonları ve CIP2A'nın transkripsiyonel aktivatörleri ile kısmen açıklanabilmiş olmasına karşın, bu artışın temelinde yer alan moleküler mekanizmalar tümüyle aydınlatılmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Soo Hoo L, Zhang JY, Chan EK. Cloning and characterization of a novel 90 kDa 'companion' autoantigen of p62 overexpressed in cancer. *Oncogene* 2002; 21(32):5006-15.
2. Junttila MR, Puustinen P, Niemela M, Ahola R, Arnold H, Böttzauw T, Ala-aho R, Nielsen C, Ivaska J, Taya Y, Lu SL, Lin S, Chan EK, Wang XJ, Grenman R, Kast J, Kallunki T, Sears R, Kähäri VM, Westermarck J. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* 2007; 130(1):51-62.
3. Khanna A, Bockelman C, Hemmes A, Junttila MR, Wiksten JP, Lundin M, Junnila S, Murphy DJ, Evan GI, Haglund C, Westermarck J, Ristimäki A. MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(11):793-805.
4. Li W, Ge Z, Liu C, Liu Z, Björkholm M, Jia J, Xu D. CIP2A is overexpressed in gastric cancer and its depletion leads to impaired clonogenicity, senescence, or differentiation of tumor cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14(12):3722-8.
5. Routila J, Bilgen T, Saramaki O, Grenman R, Visakorpi T, Westermarck J, Ventela S. Copy number increase of oncoprotein CIP2A is associated with poor patient survival in human head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2016; 45(5):329-37.
6. Come C, Laine A, Chanrion M, Edgren H, Mattila E, Liu X, Jonkers J, Ivaska J, Isola J, Darbon JM, Kallioniemi O, Thezenas S, Westermarck J. CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin Cancer Res* 2009; 15(16):5092-100.
7. Dong QZ, Wang Y, Dong XJ, Li ZX, Tang ZP, Cui QZ, Wang EH. CIP2A is overexpressed in non-small cell lung cancer and correlates with poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(3):857-65.
8. Qu W, Li W, Wei L, Xing L, Wang X, Yu J. CIP2A is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 2012; 29(1):113-8.
9. Vaarala MH, Vaisanen MR, Ristimäki A. CIP2A expression is increased in prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29(1):136.

10. Fang Y, Li Z, Wang X, Zhang S. CIP2A is overexpressed in human ovarian cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Tumour Biology* 2012; 33(6):2299-306.
11. Ma T, Zhang L, Xiao P, Liu Y, Li Y, Shi P, Zhou Y. Clinical significance of CIP2A expression in bladder cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2014; 94(34):2681-3.
12. Coenen EA, Zwaan CM, Meyer C, Marschalek R, Pieters R, van der Veken LT, Beverloo HB, van den Heuvel-Eibrink MM. KIAA1524: A novel MLL translocation partner in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2011; 35(1):133-5.
13. Chen KF, Liu CY, Lin YC, Yu HC, Liu TH, Hou DR, Chen PJ, Cheng AL. CIP2A mediates effects of bortezomib on phospho-Akt and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 2010; 29(47):6257-66.
14. Zhang X, Xu B, Sun C, Wang L, Miao X. Knockdown of CIP2A sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin: an in vitro study. *International journal of clinical and experimental medicine* 2015; 8(9):16941-7.
15. Zhao D, Liu Z, Ding J, Wenjuan Li, Sun Y, Yu H, Zhou Y, Zeng J, Chen C, Jia J. Helicobacter pylori CagA upregulation of CIP2A is dependent on the Src and MEK/ERK pathways. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 3):259-65.
16. Khanna A, Okkeri J, Bilgen T, Tiirikka T, Vihinen M, Visakorpi T, Westermarck J. ETS1 Mediates MEK1/2-dependent overexpression of cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A (CIP2A) in human cancer cells. *PLoS One* 2011; 6(3):e17979.
17. Bockelman C, Lassus H, Hemmes A, Leminen A, Westermarck J, Haglund C, Butzow R, Ristimaki A. Prognostic role of CIP2A expression in serous ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 2011; 105:989-95.
18. Li Y, Wang K, Dai L, Wang P, Song C, Shi J, Ren P, Ye H, Zhang J. HapMap-based study of CIP2A gene polymorphisms and HCC susceptibility. *Oncol Lett* 2012; 4(2):358-64.