

Mesane kanseri ile DNA tamir genlerinden KU 70/80 genetik varyantlarının ilişkisinin araştırılması

Investigation of the relation between KU 70/80 DNA repair gene genetic variants and bladder cancer

Gülçin Yavuz Türel¹, Nilüfer Şahin Calapoğlu², Pınar Aslan Koşar³, Mustafa Calapoğlu⁴

¹ Arş.Gör., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

² Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

³ Yrd.Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

⁴ Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

Özet

Amaç: Mesane kanseri, dünya genelinde en sık görülen kanser türleri arasında erkeklerde 7. kadınlarda 17. genel olarak bakıldığında 9. sıradadır. Mesane kanseri ile ilgili yapılmış birçok çalışmada hücre bölünme olayında temel basamaklardan biri olan DNA tamir mekanizması ve bu mekanizmanın işleyişini sağlayan DNA tamir genleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Mesane kanseri ile DNA tamir genlerinden KU 70/80 genetik varyantlarının ilişkisinin araştırılması çalışmanın ana amacıdır.

Gereç ve Yöntem: DNA çift zincir kırıkları, DNA sarmalının her iki zincirinde yer alan fosfodiester bağının parçalanması sonucunda meydana gelir. Ökaryotik hücrelerde, DNA çift zincir tamir mekanizmasında homolog rekombinasyon (HR) ve serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (Non-Homolog end Joining, NHEJ) olmak üzere iki major yol vardır. NHEJ tamir mekanizmalarında görev alan Ku, XRCC gen ailesi tarafından ifade edilen Ku70 ve Ku 80 olmak üzere iki alt birimden oluşan heterodimerik bir proteindir. Çalışma grubu, 2010-2011 yılları arasında Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Üroloji Servisinde takip ve tedavi edilen, yaşları 30- 60 arasında, 34 erkek ve 4 kadın, toplam 38 mesane kanserli hastadan oluşmaktadır. Ku70 ve Ku80 genotiplendirme çalışması yapılarak, istatistiksel anlamlılık araştırılmıştır.

Bulgular: Araştırmada elde edilen veriler doğrultusunda, araştırma popülasyonunda ilk kez çalışılan Ku70 -1310C/G ve Ku80 -1401G/T polimorfizmleri ile mesane kanseri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Bulgular mesane kanseri oluşumunda rolü olabilecek bir etkeni eleديدinden bilimsel açıdan önemlidir.

Anahtar kelimeler: DNA tamir mekanizması, kanser, Ku70, Ku80, mesane, polimorfizm

Abstract

Objective: Bladder cancer is the 7th most common cancer among men 17th most common among women and 9th most common in general around the world. Several studies focus on the DNA repair mechanism and DNA repair genes, which is one of the fundamental steps of cell division process. Investigation of the relationship between bladder cancer and genetic variants of KU 70/80 DNA repair genes is the main objective of the study..

Materials and Methods: Breaking of phosphodiester bonds in both chains of DNA causes DNA double strand breaks. The two major ways of double chain repair mechanisms are homologous recombination (HR) and Non-Homolog end Joining (NHEJ). Ku is a heterodimeric protein expressed by XRCC gene family and consist of two subunits as Ku70 and Ku80, which plays role in NHEJ repair mechanism. The study group consisted of 38 bladder cancer patients, aged 30-60, 34 males and 4 females, followed up and treated at Isparta Süleyman Demirel University Research and Practice Hospital, Urology Service between 2010-2011. Ku70 and Ku80 genotyping studies were carried out and statistical significance was investigated.

Results: In terms of the data obtained in the study, it was found that there was no statistically significant relationship between the Ku70 -1310C/G and Ku80 -1401G/T polymorphisms studied for the first time in the study population and bladder cancer.

Discussion: Results are scientifically important because of the elimination of two factors which can play role in bladder cancer.

Key Words: DNA repair mechanism, cancer, Ku70, Ku80, bladder, polymorphism

Kabul Tarihi:15.10.2015

Giriş

Kanser gelişiminde hücre döngüsünün kontrolü, tümör baskılayıcı fonksiyon, DNA onarımı ve apoptoz kritik yolaklardır. Bu noktalarda görevli proteinlerde meydana gelebilecek bir mutasyon ya da polimorfizm ilgili genin ekspresyonunu değiştirerek kanserli hücre proliferasyonuna yol açabilmektedir (1).

İnsan genomunda en çok bulunan genetik varyant tipi olan ve SNP olarak ifade edilen belirli bir pozisyonda meydana gelen tek nükleotid değişiklikleri, düzenleyici sekansları değiştirerek genin ekspresyonunu dolaylı yoldan etkileyebilmektedir. İnsan genomunda 10-30 milyon SNP olduğu tahmin edilmekle birlikte; rastgele seçilen bir popülasyondaki görülme sıklığı %1'den fazladır. Popülasyonlar arasında görülen genetik farklılıklar, hastalıklara karşı olan duyarlılığı, direnci ve hastalık prognozunu etkileyebilmektedir.

Ökaryotik hücrelerde iyonize edici radyasyon nedeniyle oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS), endonükleazların, topoizomerazların ve mekanik stresin etkisiyle DNA çift zincir kırıkları meydana gelmektedir. Çift dal kırıklarının tamirinde, Non- homolog uçların birleştirilmesi (NHEJ) ve Homolog rekombinasyona (HR) dayalı tamir olmak üzere iki ana mekanizma görev almaktadır (2). NHEJ mitotik hücrelerin G0, G1 ve erken S fazında çift dal kırığı tamirini gerçekleştirirken, HR geç S fazı ve G2 fazında, DNA duplikasyonu tamamlandıktan sonra, görevi devralır (3). Ku proteini, Ku70 ve Ku 80 alt birimden oluşan heterodimerik bir protein olup, genomik bütünlüğün sağlanmasında önemli görev almaktadır DNA onarımında görevli Ku70/80 genlerindeki polimorfizmler, proteinlerin işlevini ve dolayısıyla bireylerin hasarlı DNA'yı onarma kapasitesini değiştirebilmektedir (4,5,6). Eksik onarım kapasitesi de genetik kararsızlığa ve devamında kanser oluşumuna neden olabilmektedir (7).

Mesane kanseri, World Health Organization 2008 istatistiklerine göre Dünya genelinde en sık görülen kanser türleri arasında 9. sıradadır (8,9). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı 2005 verilerine göre ise mesane kanseri 100000'de 9,59 insidans ile Türkiye'de en sık görülen kanserler arasında 6. sırada yer almaktadır (10).

Bu çalışmada, XRCC1/XRCC3 proteinlerinin alt birimi olarak ifade edilen Ku70 ve Ku80 proteinlerini kodlayan genlerin promotor bölgelerinde yer alan sırasıyla -1310C/G (rs2267437) ve -1401G/T (rs828907) polimorfizmleri ile mesane kanseri arasındaki ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışma Grubu ve Doku Örneklerinin Toplanması

Çalışma grubu, 2010-2011 yılları arasında Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Üroloji Servisinde takip ve tedavi edilen, yaşları 30- 60 arasında, 34'ü erkek (E) ve 4 kadın (K) toplam 38 mesane kanserli hastadan oluşmaktadır.

2010-2011 tarihleri arasında opere edilerek patolojik tanısı mesane kanseri olan toplam 38 hastanın 25-04 numaralı BAP-DAK kararı ile yaklaşık 25 mg tümörlü doku ve bu dokuya komşu normal mesane doku örnekleri steril şişelere alınarak analiz zamanına kadar -20 °C de saklandı.

Ku70 ve Ku80 Genotiplendirme Çalışması

DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE) kullanılarak üretici firmanın önerilerine göre yapıldı. PCR termal döngü şartları 95°C'de 5 dak. ön denatürasyon, 35 döngü, 95°C'de 30 sn. denatürasyon, 51°C'de 1 dak. annealing (bağlanma) ve uzama 57 °C' de 45 sn. (Ku70 -1310C/G), 55 °C 30 sn (Ku80 - 1401G/T için) ve 72°C'de 10 dak. son uzama şeklinde gerçekleştirilerek örnekler +4°C'de bekletilmiştir (Mastercycler gradient, Germany). Her bir DNA ürünü için PCR primer sekans çiftleri ve kesim enzimleri Tablo 1'de verilmiştir. PCR reaksiyonunun yeterliliği %3'lük agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir.

DNA amplifikasyonundan sonra, PCR ürünleri Ku70 -1310C/G polimorfizminin belirlenmesi için PCR ürünü HhaI (Fermentas, Vilnius, Lithuania) kesim enzimi ile 37°C'de bir gece bekletilerek G allellerinin kesilmesi sağlanmıştır. Ku80 -1401G/T polimorfizminin belirlenmesi için ise PCR ürünü BfaI kesim enzimi ile 37°C'de bir gece bekletilerek G allellerinin kesilmesi sağlanmıştır. Enzim kesimi sonucu oluşan ürünler Tablo 1'de verilmiştir. RFLP sonucu oluşan ürünler ve 100 bp'lik marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas) 0.5 µg/ml ethidium

bromide içeren, %3'lük agaroz jelde 120 Voltta 20-30 dakikalık elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. UV ışık kullanılarak jel görüntüleme

sistemiyle (Vilber Lourmat) genotipler belirlenmiştir (Şekil 1 ve Şekil 2).

Tablo 1. Ku70 rs2267437 ve Ku80 rs828907 promotor polimorfizmlerinin primer sekansları, polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) şartları

Polimorfizm	Primer sekansı (5'--3')	Kesim enzimi	SNP sekansı	DNA parça uzunluğu (bp)
Ku70 C-1310G rs2267437	F: CTCAGACCACTCTCTTCTC R: TCACTTCACAGTAGTCGTTG	<i>HhaI</i>	C G	390 bp 291 + 99 bp
Ku80 G-1401T rs828907	F: TAGCTGACAACCTCAACAGAT R: ATTCAGAGGTGCTCATAGAG	<i>BfaI</i>	T G	252 bp 171 + 81 bp

İstatistiksel Analiz

Allel ve genotip frekansları (pearson χ^2 istatistik), O.R. ve p değerleri dominant ve resesif genetik modeller FINETTI programı kullanılarak analizi edilmiştir (10). Ayrıca test edilen grupların Hardy-Weinberg dengesi ve Armitage's trend test (ATT) FINETTI programı kullanılarak belirlenmiştir.

Bulgular

Mesane Kanseri tanısı konmuş 38 bireyde Ku70 -1310C/G ve Ku80 -1401G/T promotor bölge polimorfizmlerini belirleyebilmek amacıyla, ilgili gen bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve bu polimorfizmlere spesifik restriksiyon enzimleri kullanılarak amplifikasyon ürünlerinin kesimi

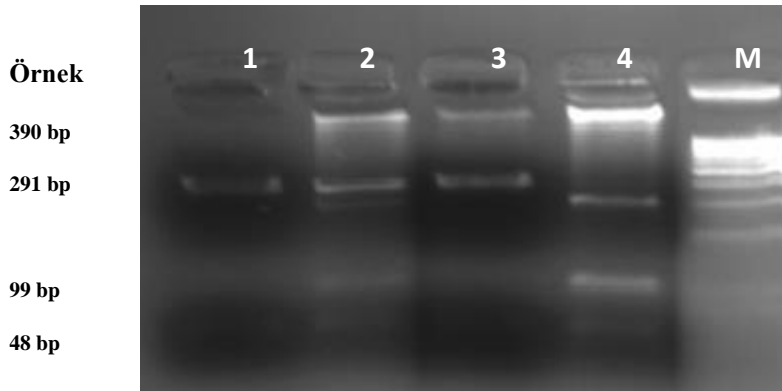
gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Çalışmada hasta grubu yaş ortalamaları 65,7 olan 4 bayan ve 34 erkek bireyden oluşturulmuştur. Çalışma grubunun %71'inin sigara, %34'ünün de alkol kullandığı bireyler tarafından ifade edilmiştir.

Ku70 -1310C/G ve Ku80 -1401G/T Polimorfizmi Bulguları

Ku70 -1310C/G ve Ku80 G-1401T polimorfizmleri , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresinden ulaşılan short genetic variations veri tabanından (dbSNP) rs2267437 ve rs828907 numaralı nükleotid değişimleri belirlenmiştir (12, 13).

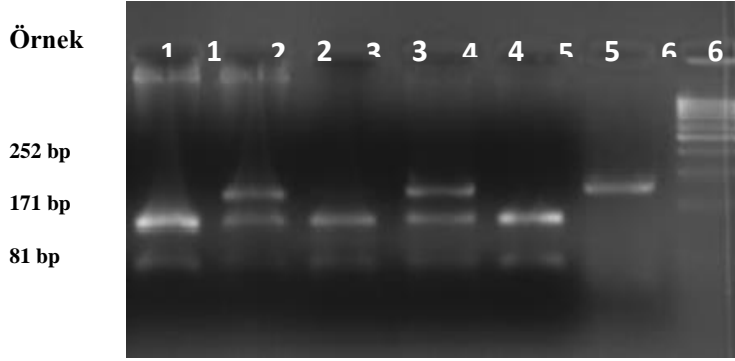
Şekil 1. Ku70 -1310C/G polimorfizmine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü

1:homozigot normal (CC), 2:heterezigot (CG), 3:homozigot normal (CC), 4:homozigot polimorfik (GG), M: markır



Şekil 2. Ku80 -1401T/G polimorfizmine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü

1:homozigot normal (GG), 2:heterezigot (GT), 3:homozigot normal (GG), 4:heterezigot (GT), 5:homozigot normal (GG), 6:homozigot polimorfik (TT), M: markır



PCR-RFLP yöntemi uygulanarak yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda, her bir bireye ait tümörlü doku ve normal doku örnekleri Ku70 -1310C/G ve Ku80 -1401G/T polimorfizmlerine ait allel ve genotip frekansları açısından HWE istatistiğine göre Ku80 genotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülürken, Armittage's trend testin de ise anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Yaşlarının aritmetik ortalamasını 65,7 olarak bulduğumuz hasta grubumuz, Ku70 ve Ku80 genotipleri ile bu genotipe sahip bireylerin yaşları açısından tek yönlü varyans analizi tekniğinden (One Way ANNOVA) yararlanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler neticesinde, genotipler ile bu genotiplere sahip bireylerin yaşları arasında da bir ilişki belirlenmemiştir.

Tablo 2. Ku70 C-1310G ve Ku80 G-1401T polimorfizmlerinin genotip, allel ve genotip frekansları ve ilişkilendirme sonuçları

Polimorfizm	Örnek tipi	Genotipler			HWE (<i>p</i> değeri)	MAF	OR (95% CI)/ P-değeri				Armittage's trend test
		11	12	22			Allel	Genotip (frequency)			
		11	12	22			1 göre 2	11 göre 22	11göre (12 + 22)	(11 + 12) göre 22	Ortak eşitsizlik oranı
Ku70 C-1310G rs2267437	Normal doku (n=38)	5 (0,188)	23 (0,491)	10 (0,320)	0,204	0,566	0,81 (0,43-1,53) P=0,515	0,55 (0,14-2,17) P=0,391	0,42 (0,13-1,39) P=0,150	0,88 (0,32-2,40) P=0,797	0,78 P=0,502
	Tümör doku (n=38)	10 (0,237)	17 (0,500)	11 (0,263)	0,526	0,513					
Ku80 G-1401T rs828907	Normal doku (n=38)	15 (0,366)	16 (0,478)	7 (0,156)	0,502	0,395	1,00 (0,52-1,92) p=1,000	1,13 (0,34-3,79) p=0,838	0,81 (0,32-2,01) p=0,642	0,73 (0,24-2,21) p=0,574	0,97 p=1,000
	Tümör doku (n=38)	17 (0,366)	12 (0,478)	9 (0,156)	0,043	0,395					

İstatistiksel olarak anlamlı değerler kalın yazı ile gösterilmiştir. 1 majör alleli, 2 minor alleli ifade etmektedir. SNP genotipleri 11 (majör allel homozigot), 12 (heterozigot) ve 22 (minor allel homozigot) olarak kodlanmıştır. HWE Hardy-Weinberg equilibrium; MAF minor allel frekansı; OR eşitsizlik oranı; %95 CI %95 güvenirlilik aralığıdır.

Tartışma

DNA tamir genlerinde meydana gelen polimorfizmler, tamir kapasitesinde değişiklikler meydana getirerek çeşitli kanserlere neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalar ile Ku70 ve Ku80'in promotor bölgelerinde meydana gelen polimorfizmlerin çeşitli kanser türleri ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bau ve arkadaşları (2008), oral kanser tanısı almış 380 hasta ile yapmış oldukları çalışmada, Ku70 T-991C, C-57G ve A-31G polimorfizmleri ile oral kanser arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. C alleli taşıyan bireylerin (T/C ve C/C) T/T (wild) genotipe oranla 2,14 kat oral kanser riski taşıdıkları belirtilmiştir. C-57G ve A-31G polimorfizmleri açısından ise hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark belirlememişlerdir (14).

Bir başka çalışmada, mide kanseri ve Ku70 T-991C, C-57G ve A-31G polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmaya 136 mide kanserli hasta dahil edilmiş ve T-991C polimorfizmi açısından TC ve CC genotipli bireylerin TT genotipine sahip olanlara oranla anlamlı derecede mide kanseri riski taşıdığı belirtilmiştir (15).

He ve arkadaşları 293 meme kanserli hasta ile yaptıkları çalışma ile Ku70 -1310C/G polimorfizmi ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamışlardır. CG ve GG allellere sahip bireylerin CC homozigot bireylere oranla daha yüksek risk taşıdıkları belirtilmiştir (16).

Wang ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınlanan 1270 meme kanserli vaka ile yaptıkları çalışmada, Ku80 G-1401T polimorfizmi ile meme kanseri ilişkisinin T allel frekansı için anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir (17). Benzer şekilde Li ve arkadaşları da 241 mide kanserli hasta ile yapmış oldukları

çalışmada, Ku80 -1401T allelinin mide kanserli hastalarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bir oranda bulunduğunu belirlemişlerdir (18).

2009 yılında Willems ve arkadaşlarının ailesel olmayan meme kanseri ile Ku70 C-1310G polimorfizminin ilişkisini araştırdıkları çalışmada 206 hasta bireyde, endojen östrojen seviyesi yüksek meme kanserli hasta grubunda CG alleli anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (19).

Bu çalışmada, Ku70 -1310C/G ve Ku80 -1401G/T polimorfizmleri ile mesane kanseri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma grubuna dahil edilen 38 mesane kanserli hastanın Ku70 ve Ku80 genlerine ait genotipleri incelendiğinde Ku70 için; tümörlü dokularda risk alleli olan G'nin bulunma oranını %50 olarak belirlerken, Ku80 için; risk alleli olan T'nin bulunma oranını %58 olarak tespit edilmiştir. Bu durum incelenen literatürlerle uyum görmektedir. Araştırmada istatistiksel olarak genotip ve allel frekansları açısından; tümörlü ve normal doku örneklerinin karşılaştırıldığında ise Ku70 -1310 C/G polimorfizmi için risk alleli olan guanin ve Ku80 -1401C/T polimorfizmi için risk alleli olan timin için anlamlı sonuçlar elde edilememiştir ($p>0.05$). Türkiye'de yapılmış polimorfizm çalışmalarına ait literatür araştırmaları sonucunda Ku70 ve Ku80 genleri ile ilgili olarak daha önce herhangi bir çalışmanın yayınlanmamış olduğunu belirlenmiştir. Kanser çalışmaları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise, yayınlanmış çalışmaların hiç birinde hasta gruplarının tümörlü dokularına karşı kendi normal doku örneklerinin kontrol grubu olarak kullanılmadığı görülmüştür. Bu nedenle elde edilen veriler bilimsel açıdan farklı bir bakış açısını ortaya koymaktadır.

Kaynaklar

1. İmyanitov E, Hanson K, Zhivotovsky B. Polymorphic variations in apoptotic genes and Cancer predisposition. *Cell Death Differ* 2005;12(8):1004-7.
2. Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, Jasin M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev* 2001;15(24):3237-42.

3. Thacker J, Zdzienicka MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2004 ;3(8):1081-90.
4. Fell VL- Schild Poulter C. The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2015;76:15-29.
5. Jones JM, Gellert M, Yang W. A Ku bridge over broken DNA. *Structure* 2001;9(10):881-4.
6. Dik C. van Gent, Jan HJ, Kanaar H, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics* 2001;2:196-206.
7. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(12):1513-30.
8. WHO cancer mortality database. <http://www-dep.iarc.fr/> accessed on:05.01.2015
9. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Bohle A, Palou J, Buckley et al. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Urology Supplements* 2008;7: 618-26.
10. TS Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı <http://www.ketem.org/istatistik.php> erişim tarihi: 01.02.2015
11. Strom TMW. (2009) Case-control studies. <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> accessed on:04.03.2015
12. Referans SNF cluster report. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2267437 accessed on: 08.01.2015
13. Referans SNF cluster report II http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=828907 accessed on: 08.01.2015
14. Bau DT, Tseng HC, Wang CH, Chiu CF, Hua CH, Wu CN et al. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. *Oral Oncol* 2008;44(11):1047-51.
15. Yang MD, Wang HC, Chang WS, Tsai CW, Bau DT. Genetic polymorphisms of DNA double strand break gene Ku70 and gastric cancer in Taiwan. *BMC Cancer* 2011;11:174.
16. He W, Luo S, Huang T, Ren J, Wu X, Shao J, Zhu Q. The Ku70 -1310C/G promoter polymorphism is associated with breast cancer susceptibility in Chinese Han population. *Mol Biol Rep* 2012;39(1):577-83.
17. Wang HC, Liu CS, Chiu CF, Chiang SY, Wang CH, Wang RF et al. Significant association of DNA repair gene Ku80 genotypes with breast cancer susceptibility in Taiwan. *Anticancer Res* 2009;29(12):5251-4.
18. Li JQ, Chen J, Liu NN, Yang L, Zeng Y, Wang B et al. Ku80 gene G-1401T promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2011;17(16):2131-6.
19. Willems P, De Ruyck K, Van den Broecke R, Makar A, Perletti G, Thierens H et al. Polymorphism in the promoter region of Ku70/XRCC6, associated with breast cancer risk and oestrogen exposure. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135(9):1159-68.

İletişim:

Arş.Gör. Gülçin Yavuz Türel
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye
Tel: +90.555.6036550
E-mail: gulcinnyavuz@gmail.com

