

Leptin ve Leptin Reseptörü Gen Varyantları ile Kolorektal Kanser Arasındaki İlişki Üzerine Bir Çalışma

Examining the Relationship Between Colorectal Cancer and Gene Polymorphisms of Leptin and Leptin Receptors

Neslihan Korkmaz¹, Adnan Selim Kimyon¹, Esra Ermiş¹, Tuba Edgünlü², Erkan Arpacı³, Hüseyin Engin³, Sevim Karakaş Çelik¹

¹Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı, Zonguldak

²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla

³Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı, Zonguldak

Özet

Kolorektal kanser; kalın bağırsak ve rektumda görülen malign oluşumlardır. Etyopatolojisi henüz net olarak aydınlatılmamış olan çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu bilinen bir hastalıktır. Çalışmamızda, adipositler tarafından salgılanan enerji dengesi, besin alımının düzenlenmesi ve besin emiliminde önemli rol oynayan leptin (LEP) ve leptin reseptörlerine (LEPR) ait gen polimorfizimlerinin kolorektal kanser ile ilişkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmamıza 55 kolorektal kanseri tanısı almış hasta ve 54 sağlıklı birey dahil edildi. Bireylerden alınan kanlardan DNA izolasyon kiti yöntemiyle DNA lar elde edildi. LEP rs7799039 ve LEPR rs1137101 gen polimorfizimleri PCR-RFLP yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, LEPR rs1137101 gen polimorfizmine ait AG genotipinin hastalık riskini 2.6 kat artırdığı tespit edildi (p<0.05). Ancak, kolorektal kanserli olgular ve LEP rs7799039 geni arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı (p>0.05). Çalışmamız sonucunda LEPR rs7799039 gen polimorfizminin kolorektal kanser etyopatogenezinde etkili olabileceği tespit edilmiştir. Sonraki aşamalarda, daha geniş popülasyonlarda ve genlere ait ekspresyon düzeyleri de araştırılması uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, Leptin, Leptin Reseptörü, Polimorfizm

Başvuru Tarihi / Received: 03.07.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 23.11.2017

Giriş

Kolorektal kanser dünyada en sık teşhis edilen kanserler arasında erkeklerde üçüncü, kadınlarda ikinci sırada yer almaktadır (1). Daha önce yapılan çalışmalarda vücuttaki yağ oranının kolorektal kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2). Çevresel koşullar, yaşam tarzı gibi etmenler kanser riskini arttırsa da artan yağ kitlesi de kolorektal kanser ile ilişkili olabilir. Adipositlerden sentezlenen leptin, dolaşıma katılır, proteinlere bağlanır ve özellikle hipotalamusta merkezi sinir sisteminde etkilidir. Hipotalamusta reseptörlere bağlanmasıyla tokluk faktörü gibi hareket ettiği kabul edilen leptin, besin alımını inhibe ederek enerji harcamasını uyarır (2,3). Leptinin beslenme davranışı, otonomik ve nöroendokrin fonksiyonu etkileyerek, hipotalamik nöropeptidlerin ifadesini düzenlediği böylece de enerji homeostazını etkilediği düşünülür. Önceki çalışmalarda leptinin vücuttaki yağ oranının

Abstract

Colorectal cancer is defined as malignant occurrences observed in the large intestine and rectum. It is a disease whose etiopathology has known to be influenced by environmental and genetic factors that are not yet clearly understood. We aimed to investigate the relationship between colorectal cancer and gene polymorphisms of leptin (LEP) and leptin receptors (LEPR), which play an important role in regulation of nutrient uptake and regulation of nutrient uptake and energy balance secreted by adipocytes. The study included 55 patients with colorectal cancer and 54 healthy individuals. DNA was obtained from the blood of individuals by DNA isolation kit method. LEP rs7799039 and LEPR rs1137101 gene polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP method. The statistical analysis of the results shows that AG genotype of LEPR rs1137101 gene polymorphism was found to increase the risk of disease 2.6 times (p <0.05). However, no significant correlation was found between colorectal cancer and LEP rs7799039 gene polymorphism (p > 0.05). As a result of our study, it was determined that LEPR rs7799039 gene polymorphism may be effective in the etiopathogenesis of colorectal cancer. As a further study, these gene expression levels should be investigated in large populations.

Keywords: Colorectal Cancer, Leptin, Leptin Receptor, Polymorphism

düzenlenmesinde etkili olduğu da saptanmış ve yüksek leptin düzeylerinin de obezite ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (2). Leptin, fizyolojik etkisini leptin reseptörü (LEPR) aracılığıyla gerçekleştirir. Leptin reseptörleri başlıca beyin, kalp, testis ve adipöz gibi farklı dokularda farklı seviyelerde ifade edilir. Leptin reseptörlerinin, koroid pleksus ve hipotalamusta yerleşik olması leptinin etkisinin hipotalamusta seviyesinde düzenlendiğini düşündürmektedir (3,4).

Leptin, protein yağ tüketiminin inhibe edilmesini ve enerji harcanmalarını düzenleyen Janus kinaz sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) sinyal yolağında işlev görür. JAK-STAT yolu, hücre dışı polipeptid sinyallerinden alınan bilgileri, transmembran reseptörleri vasıtasıyla, hedef gen promotörlerine doğrudan iletir ve ikinci mesajcılar olmadan transkripsiyonel düzenleme için bir mekanizma sağlar. Leptinin, leptin reseptörüne bağlanmasıyla bu yolak aktive olur (3-5). Leptin, proliferasyonu uyarmasının yanı sıra, insan kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu engellediği gösterilmiştir (4). İnsan kolon kanser hücrelerinde leptin reseptörü vasıtasıyla fizyolojik etkisini gösterdiği tespit edilmiştir (5,6).

Adres / Correspondence: Tuba Edgünlü
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla
e-posta / e-mail : tedgunlu@gmail.com

Hipotalamik nöronlarda, yeterli leptin reseptör fonksiyonu, enerji metabolizması ve vücut ağırlığının düzenlenmesi, reseptörün hücre zarındaki gangliosidlerle etkileşimine bağlıdır (7). Leptin ve leptin reseptörü mutasyonları, obezite ile ilişkilendirilmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada; normal farelere ve leptin eksikliği olan farelere leptin enjekte edilmiş ve vücut yağında azalma görülmüştür. Ayrıca leptin düzeyindeki artışın iştahı azaltarak obeziteyi önlediği ileri sürülmüştür (8).

Epidemiyolojik çalışmalar, obezite gibi metabolik sendromların kolorektal kanser insidansını artırabileceğini göstermiştir. Obezitenin kolorektal kanser riskini 1.19 kat artırdığı ortaya koymuştur. Altta yatan mekanizmalar belirsizliğini koruyor olmasına rağmen, önceki kanıtlar karın içi visseral adipoz dokunun, kolorektal kanserin öncülü olan kolorektal adenomunu oluşturabileceği düşünülmüştür. Bu durumda, adipositlerin ve preadipositler kolon kanseri hücrelerinde büyüme uyarıcı rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Adipositler tarafından üretilen leptin gibi aktif maddelerin kolon ve rektumda kanserojen olarak etki gösterebileceği belirlenmiştir (9,10). Araştırmamızın amacı, Türk popülasyonunda leptin ve LEPR gen varyantları ile kolorektal kanser arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Grubu

Bu çalışmaya Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Medikal Onkoloji polikliniğine gelerek kolorektal kanser tanısı konulmuş 55 hasta ve 54 sağlıklı (kontrol grubu) birey dahil edilmiştir. Çalışma için Bülent Ecevit Üniversitesi Tıbbi Etik komisyonunca onay alınmıştır. Bilgilendirilmiş onam formu imzalatılan hasta ve sağlıklı kontrol bireylerden EDTA'lı tüplere 2-3 cc venöz kan alınmıştır. Alınan kanlar -20 0C de saklanmıştır. Venöz kanlardan, E.Z.N.A.® Blood DNA Mini kiti kullanılarak DNA elde edilmiştir.

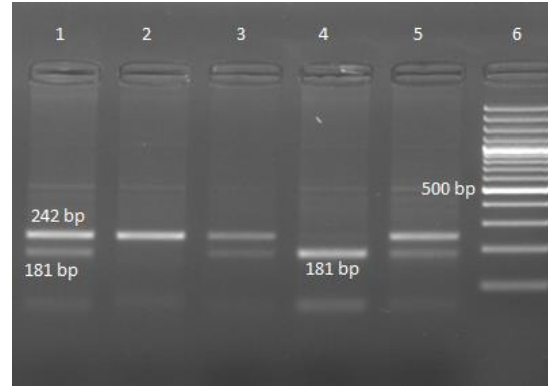
Genotipleme

Genotipleme için PCR işlemi; 20-100 ng DNA, 100µM dNTPs, 20 pmol primer, 1.5 mM MgCl₂, (NH₄)SO₄'lı 1 x PCR buffer ve 1 Unite Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher scientific, USA, EP0401) içerecek şekilde distile su ile 25 µL hacminde gerçekleştirildi. PCR işlemi termal cyclus (BIO-RAD T-100) ile gerçekleştirildi. LEP (rs7799039) ve LEPR (rs1137101) genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) koşulları Tablo 1' de gösterilmektedir.

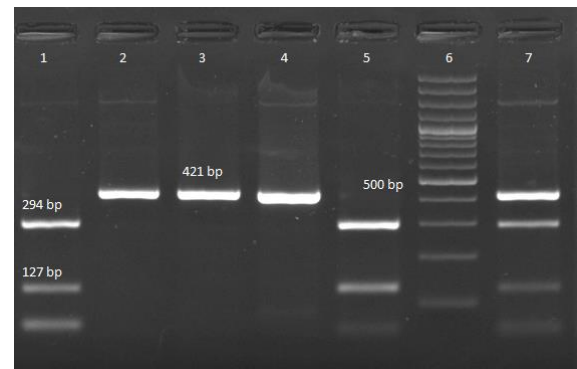
LEP ve LEPR gen polimorfizmleri, 0.5 mg / ml etidyum bromid içeren % 3 agaroz jeli üzerinde 30-40 dakika boyunca 135 V'de fragman ayrımı ile tespit edildi. Her bir jel şeridinde bir boyut standardı olarak 100 bp'lik bir DNA ladder (Thermo Scientific, USA, SM0242) kullanıldı. Jel bir jel elektroforezi görselleştirme sistemi (Vilber Lourmat E-BOX VX5) kullanılarak UV ışığı altında görselleştirildi (Şekil 1 ve 2).

İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz, SPSS 18.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL) ile gerçekleştirildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik ve allelik dağılım farklılıkları ki-kare testiyle değerlendirildi. Hastalık riski ile LEP ve LEPR polimorfizmleri arasındaki ilişki ise lojistik regresyon analizi ile araştırıldı. p değerinin < 0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.



Şekil 1. LEP rs7799039 gen polimorfizmine ait agaroz jel görüntüsü gösterilmektedir. 6. Kuyucukta 100 bp'lik marker bulunmaktadır. 1. Kuyucukta heterozigot genotip görülmekte olup 242 bp'lik bant A bandını, 181 bp'lik bant G bandını temsil etmektedir. 2. Kuyucukta AA homozigot genotip örneği, 4. Kuyucukta ise GG homozigot genotip örneği gösterilmektedir.



Şekil 2. LEPR rs1137101 gen polimorfizmine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1. Kuyucukta homozigot GG genotipi görülmektedir. İkinci kuyucukta tek bant görülmekte olup (421 bp) AA genotipi görülmektedir. Heterozigot (AG) bantları ise 7. kuyucukta görülmektedir.

Tablo 1. Leptin ve leptin reseptörü gen polimorfizimleri için PCR şartları.

Gen	Polimorfizm	Primerler	RE	Bağlanma sıcaklığı	PCR ürünleri
Leptin	rs7799039	F: 5'-TTTCCTGTAATTTTCCCGTGAG-3, R: 5'-AAAAGCAAAGACAGGCATAAA-3'	<i>CfoI</i>	50°C	G Allele: 181 bp, 61 bp A Allele: 242 bp
Leptin Reseptörü	rs1137101	F: 5'-ACCCTTTAAGCTGGGTGCCCAATAG-3', R: 5'-GCTAGCAAATATTTTGTAAGCAATT-3'	<i>MspI</i>	56°C	A allele: 421 bp G allele: 294 bp, 127 bp

Bulgular

Bu çalışmada; 55 kolorektal kanserli hasta ve 54 kontrol birey LEP rs7799039 ve LEPR rs1137101 genotipleri ve alleleri açısından değerlendirildi. LEP rs7799039 ve LEPR rs1137101 genotip analizlerinde AA, AG, GG oranları tespit edilmiştir. LEP rs7799039 açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubu için sırasıyla %35.2, %50.0, %14.8 olarak belirlenmiş olup, tablo 2 de gösterilmiştir. Kolorektal kanserli hasta grubunda ise sırasıyla bu oranlar sırasıyla %23.6, %58.2, %18.2 olarak gösterilmiştir. LEPR rs1137101 de genotip analizinde kontrol grubunda AA, AG, GG genotipleri sırasıyla %51.9, %37.0, %11.1 olarak belirlenmiştir. Kolorektal kanserli hasta grubunda ise sırasıyla %32.7, %61.8, %5.5 olarak belirlenmiştir.

LEP rs7799039 polimorfizimi için kontrol grubu sırasıyla A alleli %60.2, G alleli %39.8, hasta grubu için ise A alleli %52.7, G alleli %47.3 olarak gösterilmiştir. LEPR rs1137101 gen polimorfizmi için kontrol grubunda, A alleli %70.4, G alleli %29.6, hasta grubunda ise, A alleli %63.6, G alleli %36.4 olarak tespit edilmiştir.

Bu veriler ışığında LEPR rs1137101 gen polimorfizmi bakımından Türk popülasyonunda, kolorektal kanser riski açısından anlamlı bir ilişki bulunmuş tespit edilmiştir. AG genotipinin kolorektal kanser hastalığı riskini 2,6 kat artırdığı belirlenmiştir (p<0.05, ki-kare testi). LEP rs7799039 ve kolorektal kanser arasında ise anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır (p>0.05, ki-kare testi). Analiz sonuçları Tablo 2 ve 3'te gösterilmektedir.

Tablo 2. LEP rs7799039 ve LEPR rs1137101 gen polimorfizmlerine ait genotip frekansları sonuçları.

Genotip	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	X ² P değeri	OR (95% GA)
Leptin rs7799039				
AA	19 (%35.2)	13 (%23.6)	0.413	Referans
GA	27 (%50.0)	32 (%58.2)		1.732 (0.724-4.142)
GG	8 (%14.8)	10 (%18.2)		1.827 (0.569-5.869)
Leptin reseptörü rs1137101				
AA	28 (%51.9)	18 (%32.7)	0.032	Referans
AG	20 (%37.0)	34 (%61.8)		2.644 (1.177-5.943)
GG	6 (%11.1)	3 (%5.5)		0.778 (0.172-3.511)

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

Tablo 3. LEP rs7799039 ve LEPR rs1137101 gen polimorfizmlerine ait allel frekansları sonuçları.

Allel	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	X ² P değeri	OR (95% GA)
Leptin rs7799039				
A	65 (%60.2)	58 (%52.7)	0.278	Referans
G	43 (%39.8)	52 (%47.3)		1.355 (0.792-2.319)
Leptin reseptörü rs1137101				
A	76 (%70.4)	70 (%63.6)	0.316	Referans
G	32 (%29.6)	40 (%36.4)		1.357 (0.770-2.393)

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

Tartışma

Kanda serbest ve proteine bağlı olmak üzere iki formda bulunur. Leptinin aktivitesinden serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu belirlenmiştir (11). Vücut yağ kütlesi hakkında adipöz dokudan beyne bilgi veren kan yoluyla taşınan bir sinyal olduğu düşünülen leptin; adipöz doku ve beyin arasında iletişimi sağlar (12). Leptin enerji alımı veya harcanmasını, nöroendokrin fonksiyonu düzenleyen birkaç nöreptidin ifadesini değiştirmek için hipotalamustaki spesifik reseptörlerine bağlanarak düzenler (13). Leptin sinyalinin kaybı insanda şiddetli obeziteye neden olur ve dolaşımdaki leptin konsantrasyonu BMI ile pozitif ve güçlü bir ilişkiye sahiptir (14). Adipokinler yağ dokusu tarafından salgılanmakta olup kolorektal kanser ile ilişkili bulunmuştur. LEP ve LEPR de adipokin genlerindedir (15). Leptin, enerji dengesi, insülin ve iltihap içindeki rolü nedeniyle kolorektal kanserde de önemli bir rol oynayabileceği düşünülmüştür (16).

Bu çalışmada Türk popülasyonunda ilk kez LEP rs7799039 ve LEPR rs1137101 gen polimorfizimlerinin kolorektal kanser üzerindeki etkisi araştırıldı. Kolorektal kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında LEP rs7799039 varyantlarında, genotip ve allel frekansları için anlamlı sonuç bulunamadı. Bununla beraber LEPR rs1137101 gen varyantlarında allel frekansı için anlamlı bir sonuç bulunamazken, genotip frekansı için AG genotipinin hastalık riskini 2,6 kat arttırdığı tespit edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda leptin ve leptin reseptör polimorfizimlerinin kolorektal kanser ile olan ilişkisi araştırılmıştır ve farklı sonuçlar tespit edilmiştir. Slattery ve ark. leptin geni rs2167270 varyantları ile kolorektal kanser arasında bir ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir (14). Ancak Lui ve ark leptin, LEPR ile kolorektal kanser arasında anlamlı ilişki bulmamıştır. Bazı çalışmalarda ise özellikle leptin reseptörü ile kolorektal kanser arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (17-19). Çalışmalardaki bu farklılıklar çevresel etmenler, popülasyon farklılıkları, yaş, kilo, sigara içme durumu gibi etmenlerden dolayı farklılık göstermiş olabilir.

Literatürde LEP ve LEPR'nin kolorektal kanser üzerindeki etkisi araştırılmış fakat Türk popülasyonunda daha önce böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışma literatürdeki bu eksikliği kapatmakla beraber bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Bu sınırlılıklar yetersiz hasta-kontrol örnekleri, az sayıda polimorfizim çalışması ve vaka örneklerinin sınırlı çaptaki bölgeden toplanmış olmasıdır

Sonuç olarak, bulgularımız Türk popülasyonunda LEP rs7799039 kolorektal kanser

arasındaki ilişkiyi desteklememekle beraber LEPR rs1137101 kolorektal kanser arasında genotip frekansında AG genotipinin hastalık riskini 2.6 kat arttırdığını desteklemektedir. Bu bilimsel açıdan önemli bir sonuçtur. Bununla beraber leptin ve leptin reseptörünün kolorektal kanser üzerindeki etkisini kesin olarak ortaya koymak için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulacaktır.

Teşekkür

Bu projenin bütçesi Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Birimi 2016-50737594-01 numaralı 'Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Lisans ve Yüksek Lisans öğrenci laboratuvarlarının eğitim alt yapısının oluşturulması ve geliştirilmesi' projesinden karşılanmıştır.

Etik Kurul Onayı: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıbbi Etik komisyonu'ndan 11.01.2017 tarih ve 2017/01 sayılı onayı ile alınmıştır.

Kaynaklar

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37.
3. Ogunwobi, Olorunseun O., Ian LP Beales. The anti-apoptotic and growth stimulatory actions of leptin in human colon cancer cells involves activation of JNK mitogen activated protein kinase, JAK2 and PI3 kinase/Akt. *Int J Colorectal Dis*. 2007; 22(4):401-9.
4. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2001;121(1):79-90.
5. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-71.
6. Nordström V, Willershäuser M, Herzer S, et al. Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central nervous system regulates body weight and energy homeostasis. *PLoS Biol*. 2013;11(3):e1001506.
7. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37.
8. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16: 2533-47.
9. Nam SY, Kim BC, Han KS, et al. Abdominal visceral adipose tissue predicts risk of colorectal adenoma in both sexes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8: 443-450 e441-442.
10. Amemori S, Ootani A, Aoki S, et al. Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292: G923-9.
11. Brabant G, Horn R, von zur Mühlen A, et al. Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia*. 2000;43(4):438-42.
12. Donahue RP, Prineas RJ, Donahue RD, et al. Is fasting leptin associated with insulin resistance among nondiabetic individuals? The Miami Community Health Study. *Diabetes Care*. 1999;22(7):1092-6.
13. Marik PE. Leptin, obesity, and obstructive sleep apnea. *Chest*. 2000;118(3):569-71.

14. Hager J, Dina C, Francke S, et al. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet.* 1998;20(3):304-8.
15. Pechlivanis S, Bermejo JL, Pardini B, et al. Genetic variation in adipokine genes and risk of colorectal cancer. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(6):933-40.
16. Slattery ML, Wolff RK, Herrick J, Caan BJ, Potter JD. Leptin and leptin receptor genotypes and colon cancer: Gene-gene and gene-lifestyle interactions. *Int J Cancer.* 2008 Apr 1;122(7):1611-7.
17. Liu P, Shi H, Liu R, et al. Lack of association between LEPR Q223R polymorphisms and cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *J BUON.* 2014 Jul-Sep;19(3):855-62.
18. Partida-Perez M, de la Luz Ayala-Madrigal M, Peregrina-Sandoval J, et al. Association of LEP and ADIPOQ common variants with colorectal cancer in Mexican patients. *Cancer Biomark.* 2010;7(3):117-21.
19. Pechlivanis S, Bermejo JL, Pardini B, et al. Genetic variation in adipokine genes and risk of colorectal cancer. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(6):933-40.