

**GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANSERLERİNDE
METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GENİ
677C→T POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**
**The Investigation of Methylenetetrahydrofolate Reductase
Gene 677 C → T Polymorphism in Gastrointestinal Cancer**

Nazife TAŞÇIOĞLU¹, Serpil TAHERİ², Çetin SAATÇİ³, Yusuf ÖZKUL⁴

Özet : Metilentetrahydrofolat redüktaz (MTHFR) geni folat metabolizmasının anahtar rolü oynayan genlerindedir. MTHFR geninde 677C→T polimorfizmi en yaygın görülen polimorfizmdir. Çalışmamızda gastrointestinal sistem(GİS) kanserli hastalarda;MTHFR geni 677C→T polimorfizminin araştırılması amaçlandı.Bu amaçla GİS kanserli 64 hastanın (41 kolon ve 23 mide karsinomlu vaka) ve 40 sağlıklı kontrolün periferik kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapıldı. MTHFR geninde 677C→T polimorfizmi PCR RFLP yöntemi kullanılarak belirlendi. 64 GİS kanserli hastada MTHFR 677CC, 677CT, 677TT genotipleri sırasıyla 26(%41), 31(%48), 7(%11); kontrol grubunda ise 15(%37,5), 23(%57,5), 2(%5) olarak tespit edildi. GİS kanserlerinde MTHFR 677TT(homozigot mutant) genotipi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yaklaşık iki kat artmış olarak bulundu.Sonuçlar Ki Kare testi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı(P>0,05) Gruplar arası farkın istatistiksel anlam ifade etmemesinin çalışma gurubunun küçüklüğünden kaynaklandığı dolayısıyla MTHFR 677C→T polimorfizminin GİS kanserlerinde önemli olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak; geniş hasta grubuna sahip ileri çalışmalarda bu gen polimorfizminin araştırılmasının gerektiği kanısındayız.

Anahtar kelimeler: MTHFR, 677 C→T, PCR, GİS

Summary : Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene plays a key role in folate metabolism. The most common polymorphism in MTHFR gene is 677C→T substitution. In our study, peripheral blood samples were obtained from 64 Gastrointestinal (GIS) cancer (41 colon and 23 stomach cancers) cases and 40 healthy controls and DNA was extracted from these samples. MTHFR 677C→T variant allele was determined by PCR-RFLP assay. Frequencies of MTHFR 677CC, 677CT and 677TT genotypes were 26 (%41), 31 (%48) and 7 (%11) in the GIS cancer's cases and 15 (%37,5), 23 (%57,5) and 2 (%5) in the controls. MTHFR 677TT (homozygous) genotype was found approximately two fold increased in GIS cancers when compared with control group. However, no significant difference were found between these groups according to Chi Square test (p>0,05). It is thought that differences between these groups don't mean statistical value due to insufficient number of subjects. Therefore, MTHFR 677C→T polymorphism can be very important in GIS carcinomas. As a conclusion, we think there is a need for research of this polymorphism in larger populations.

Key words: MTHFR, folate, PCR, GIS

¹ Bilim Uzm.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biy. AD, Kayseri

² Doktora öğr.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biy. AD, Kayseri

³ Yrd.Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp.Fak.Tıbbi Genetik AD, Kayseri

⁴ Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp.Fak.Tıbbi Genetik AD, Kayseri

Kolon kanseri çeşitli genetik ve çevresel faktörleri içeren kompleks bir hastalıktır. Kırmızı etin fazla tüketimi, düşük meyve, sebze ve lif tüketimi ve yüksek alkol tüketimiyle ilişkilendirilen folat ve metiyoninin düşük alınması kolon kanserinin artış-

*** Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY-04-17 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ına neden olmaktadır. DNA metilasyonu ve DNA sentezi gibi birçok biyokimyasal yolda folat önemlidir. Folat eksikliğinde DNA'da bazların yanlış eşleşmesi, DNA hipometilasyonu ve insan kolon epitel hücrelerinde DNA tamirinin inhibisyonu gözlenebilir. DNA metilasyonundaki farklanmalar onkogenlerin ve tümör suppressör genlerin anormal ekspresyonuyla sonuçlanabilir. Folat metabolizmasını da birçok gen etkiler. Bu genlerdeki DNA polimorfizimleri oldukça dikkat çekicidir. Bunlardan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR, C677T, A1298C) , metiyonin sentetaz (MTR, A2756G) metiyonin sentaz redüktaz (MTRR, A66G), sistatyonin B-sentaz (CBS, ekzon 8) ve timidilat sentaz (TS) en çok bilinenleridir. Polimorfizmlerin hepsi genotip sıklıkları, etnik ve coğrafik dağılımlar göstermektedir(1).

5,10-MTHFR, folat metabolizmasında merkezi bir rol oynar. Folatın birincil forma sirkülasyonunda tersinmez olarak 5-10-metilentetrahidrofolatı (MTHF), 5-MTHF'a çevirir (2). 5-MTHF de nova metiyonin sentezi için metil grup sağlar ve indirekt olarak DNA metilasyonuna katılır. DNA sentezi için deoksitridülatın timidilata dönüşmesinde 5,10-MTHF gereklidir (1, 3).

Gen 5,10 MTHFR'yi şifreler (2). Gayette ve ark. (1994) floresans instü hibridizasyon yöntemiyle MTHFR geninin 1p36.3 de lokalizasyonunu belirlemiştirlerdir. MTHFR geni 150 kD'luk, 656 amino asitten oluşan homodimerik bir proteini şifreler. İnsanda 11 exondan oluşur (4).

MTHFR geni klonlandıktan sonra, alanin →valin değişimiyle MTHFR'nin spesifik aktivitesinde % 50-%60 azalmasıyla sonuçlanan 677 C→ T polimorfizmi olduğu gösterilmiştir. Bu allelik varyant için homozigot bireyler %15'in üzerindedir. 677C→T mutasyonu ayrıca 5-metil THF'in düzeyinin azalmasına ve DNA sentezi ve timidilat için 5,10 MTHF'ın düzeyinin artmasıyla sonuçlanır (5).

Genel popülasyonda MTHFR'nın termolabilitesi keşfedildikten sonra 677C→T değişimiyle ilişkilendirilmiştir ve bu polimorfizim ile çeşitli hastalık tipleri arasındaki korelasyon araştırılmıştır (5).

Çalışılan hastalık tiplerine, Nöral tüp defektleri, Alzheimer's hastalığı, kolon kanseri, lösemi, kardiovasküler hastalıklar, şeker hastalığı, Down sendromu, gebelik komplikasyonları da dahil edilmiştir(5).

Bu çalışmada, gastrointestinal sistemde en sık gözlenen mide ve kolon kanserli hastalarda MTHFR 677 C→T gen polimorfizminin Türk toplumunda sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 64 gastrointestinal(GİS) kanserli(41 kolon ve 23 mide kanserli) hasta ve genetik ünitemize gelen GİS kanseri olmayan 40 sağlıklı kontrol grubundan kan örnekleri alınmıştır. EDTA'lı 2ml kan alınarak DNA, klon yöntemi kullanılarak izole edildi. MTHFR genine özgü sense primer 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' ve antisense primer 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' kullanılarak PCR işlemi yapıldı.PCR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi için PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde koşturuldu(6).

MTHFR 677C®T polimorfizminde C→ T baz çiftinin değişimi bir Hinfl (G ANTC) restriksiyon bölgesi oluşturur Hinfl restriksiyon muamelesi için, 2,5ml buffer, 2,5 U(0,5ml) enzim (Hinfl), 15ml PCR ürünü distile su ile 25ml' ye tamamlandı, 37°C' de 1 gece inkübe edildi.

Enzimle kesilmiş PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturulduğunda jel üzerinde yabanıl tip (677CC) 198 bp'de tek bant gösterir, heterozigotlar(677CT) 198,175 ve 23 bp fragmentlerini gösterir. Homozigot mutantlar(677TT) 175 ve 23 bp fragmentleri gösterir(6).Sonuçlar bu bilgiler ışığında değerlendirilip grupların değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlenmesi için Ki Kare testi kullanıldı.

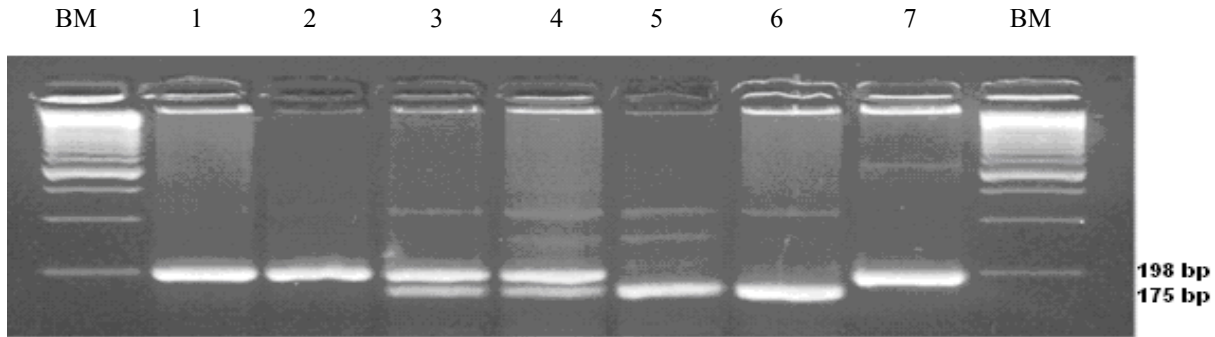
BULGULAR

MTHFR 677C→T polimorfizimi için PCR ile amplifiye edilen gen ürünlerinin Hinf I restriksiyon endonükleaz ile muamele edilip, MTHFR 677C→T polimorfizimi için %2'lik agaroz jelde koşturulduğunda oluşan yabancı tip (677CC), heterozigot (677CT) ve homozigot (677TT) olguları Şekil 1'de görülmektedir.

MTHFR 677CC ve 677TT için allel sıklıkları mide kanserli vakalar arasında sırasıyla % 35 ve %13 40 kontrol vakalarda ise sırasıyla % 37,5 ve %5, olarak tespit edilmiştir. MTHFR gen heterozigot

formu (677CT) ise hasta grubunda (%52) ve kontrol grubunda (%57.5) olarak gözlemlendi (Tablo 1) (Sonuçlar Ki Kare testi ile değerlendirildiğinde aralarındaki fark anlamlı bulunamamıştır, $P>0.05$).

MTHFR 677CC ve 677CT genotipi kolon kanseri vakalarında %44 ve %46, kontrol vakalarda ise % 37.5, %57.5 olarak tespit edilmiştir. MTHFR 677 varyant allel için homozigot olgular kolon kanserli grupta (%9,8) kontrol gruptan (%5) yaklaşık iki kat fazladır (Tablo I). Sonuçlar Ki Kare testi ile değerlendirildiğinde aralarındaki fark anlamlı bulunamamıştır ($P>0.05$).



BM → Boyut Marker, 1-2 → Yabancı tip (677CC, 198 bp), 3-4 → Heterozigot (677CT, 198 ve 175 bp)
5-6 → Homozigot Mutant (677TT, 175 bp), 7 → PCR Ürünü (enzimle kesilmemiş)

Şekil 1. MTHFR 677C→T Polimorfizminin %2'lik agaroz jel görüntüsü.

Tablo I. Mide ve kolon kanserli hasta gruplarında ve kontrol grubunda 677CC, 677CT, ve 677TT raslanma oranları

Gruplar	677CC (Normal)		677CT (Heterozigot)		677TT (Homozigot)		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Mide Kanseri	8	34,8	12	52,8	3	13	23
Kolon Kanseri	18	43,9	19	46,3	4	9,8	41
Kontrol	15	37,5	23	57,5	2	5	40
Toplam	41	34,9	54	51,9	9	8,7	104

TARTIŞMA

Düşük penetranslı genlerdeki allelik farklılıklar, kanser-indükleyici bileşikler hassasiyetle incelendiğinde bireylerarası farklılıklar görülebilir. Bu genlerden birinde bir varyasyon taşıyan birey için artmış kanser riskinin küçük olduğu varsayılabilir fakat bu varyasyonların bazılarının popülasyondaki yüksek frekansları, popülasyonun yüksek risk altında olduğu ileri sürülmektedir (7).

Kuzey İtalya'da yapılan bir çalışmada azalan proksimal kolorektal kanser riskinde MTHFR 677TT genotipinin rolü olduğunu bildirilmiştir(8). Literatürde iki çalışma hariç MTHFR677 TT genotipi ve kolon kanseri arasında ters ilişki bildirilmemiştir(3). De Jong ve arkadaşları düşük penetranslı genler ve kolorektal kanserin ilişkisini inceledikleri çalışmalarında, yeterli folat düzeyine sahip MTHFR 677 TT homozigot taşıyıcıların kolorektal kanser için düşük riske sahip göründüklerini fakat bu kişilerde folat düzeyi, düşük olduğunda hem DNA metilasyonunun hem de DNA sentezinin nükleotid sentezindeki karışıklıktan dolayı bozulduğunu ve kolorektal kanserin artmış riskiyle sonuçlandığını göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda da hem kolon hem mide kanseri vakalar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MTHFR 677 TT homozigot varyant iki kat artmış riske sahip olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde uygulanan Ki Kare testi farkların anlamlı olmadığını göstermektedir. Ancak bu sonucun hasta sayısının yeterli olmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Mide karsinomunun etyolojik faktörleri araştırıldığında; gıda olarak çok miktarda tüketilmiş balık, et ve turşu şeklinde sebze tüketilen toplumlarda hastalığın sıklığının belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Diyetle aşırı tuz alınması ve taze sebze ve meyve tüketiminin az oluşu da mide kanseri olgularının artışında sıklıkla paralellik gösterir (9).

Kişilerin diyet alışkanlıkları mide kanseri riskini artırdığı için özellikle MTHFR 677TT ve MTR 2756GG genotipine sahip risk grubundaki kişilerin diyetlerine daha fazla dikkat etmeleri önerilebilir.

Ayrıca MTHFR polimorfik lokusu (677C®T) endometrial kanser, servikal intraepitel neoplazi, meme ve ovaryum kanserlerinin artmış riskiyle ilişkilendirilmiştir (10). Bizim bulgularımız sözkonusu genlerin kanserle ilişkisi açısından değerlendirildiğinde bu çalışmaların sonuçlarıyla uyum göstermektedir ve folat metabolizmasında etkili olan ve yaygın polimorfizm gösteren genlerin mide kanserinde de önemli bir rol oynayabileceği fikrini desteklemektedir. Fakat bu analizler az sayıda kişiyle gerçekleştirilmiştir ve ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Literatürdeki çalışmalarda; varyant MTHFR 677 TT genotipli bireyler 677 CC yabancıl tiple kıyaslandığında in vitro da %30 enzim aktivitesine sahip oldukları görülmüştür. 677 CT heterozigotlarda ise %65 normal enzim aktivitesi görülür. (2, 3).

Sonuç olarak, kanser gelişiminde etkili olan tümör süpresör gen ve onkogenlerin yanı sıra bu düşük penetranslı genlerin de gözardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca geniş hasta gruplarını içeren ileri çalışmalarla MTHFR gen polimorfizimlerinin araştırılması gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Eicholzer M, Luthy Z, Moser V, et al. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Med Wkly* 2001,131: 539-549.
2. Sharp L, Little J. Polymorphism in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia. *Am J Epidemiol* 2004, 159: 423-443.
3. Virich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9: 427-433.
4. Gayette P, Par A, Milas R, Frasset P, Tran P, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian genome* 1998, 9: 652-656.

5. Carmet R, Gren R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate and hemocysteine. *Am Society of Hem* 2003,62-81.
6. Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999,96 (22):12216-8.
7. Keku T, Millikan R, Worley K, et al. 5-10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in african americans and whites. *Canser Epidomiol Bio makers and Prev* 2002, 11:1611-1621.
8. De Jong M M, Nolte I M, de Meerman GJ, et al. Low-penerance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility. *Canser Epidemiol Bio markers and and Prev* 2002, 11: 1332-1352.
9. Arthur S, Schneider MD, Philip A, Seanto MD, *Patoloji (2.Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri*, Ankara, 2001, 227-239.
10. Song C, Xing D, Tan W, Wel Q, Lin D, Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a chinese population. *Canser Reasearch* 2001,61: 3272-3275.