

HATAY İLİ'NDE MTHFR C677T TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMİ VE PROSTAT KANSERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Evaluation of the Relationship between MTHFR C677T Single Nucleotide Polymorphism and Prostate Cancer in Hatay

Müzeyyen İzmirli^{1,2*}, Hasret Ecevit², Bülent Gögebakan^{1,2}, Mehmet İnci³, Davut Alptekin⁴

1. Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Hatay

2. Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Biyokimya Genetik AD, Hatay

3. Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji AD, Hatay

4. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Adana

ÖZET

MTHFR (Metilentetrahidrofolatredüktaz), folat metabolizması ve DNA sentez yolağındaki kilit rolü sebebiyle en önemli enzimlerden biridir. Enzimi kodlayan gendeki C677T tek nükleotid polimorfizmi, prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Çalışmanın amacı, ilgili polimorfizmin, prostat kanseri teşhisi konmuş hasta ve sağlıklı kontrol bireyler arasında kıyaslanarak, hastalık ile ilişkisinin değerlendirilmesidir.

Çalışmaya, 20 prostat kanseri teşhisi konmuş hasta ve herhangi bir patolojisi saptanmamış 20 sağlıklı birey dahil edilmiştir. İlk olarak, bu bireylerden alınan kan örneklerinden DNA'ları izole edildi. İlgili polimorfizmin bulunduğu bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldıktan sonra, uygun restriksiyon enzimi aracılığıyla, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile kesildi. Daha sonra Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi tekniği ile örnekler yürütüldü ve jel görüntülenerek oluşan bantlar yorumlandı.

Sonuçlar, MTHFR C677T polimorfizm genotipleri açısından değerlendirildiğinde, çalışmaya dâhil ettiğimiz hasta bireylerin %60'inde CC (homozigot normal), %40'inde CT (heterozigot mutant); sağlıklı bireylerin ise %60'ında CC, %35'inde CT ve %5'inde TT (homozigot mutant) genotipi olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, MTHFR 677TT genotipinin prostat kanseri için koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: MTHFR C677T, prostat kanseri, polimorfizm.

ABSTRACT

MTHFR (Methylenetetrahydrofolate reductase) is one of the most important enzymes because of its function about folate metabolism and DNA synthesis pathways. The C677T single nucleotide polymorphism in the gene encoding the enzyme, have been associated with many diseases including prostate cancer. We aimed to evaluate the association between the polymorphism and prostate cancer by comparing the results between patients and controls.

Patients, who suffer from prostate cancer (n: 20) and healthy controls (n: 20) were included the study. First of all, DNA isolation was performed from the blood samples that are taken in hemogram tubes. After reproducing the region about relevant polymorphism by Polymerase Chain Reaction (PCR), it was cut by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) with suitable enzyme and viewed by Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

When the results evaluated MTHFR C677T polymorphisms genotypes, the ratios were CC %60, CT %40; and CC %60 CT %35 TT %5 for patients and healthy controls respectively.

As a result, it is found that the MTHFR 677TT genotype has protective effect for prostate cancer.

Keywords: MTHFR C677T, prostate cancer, polymorphism.

Geliş tarihi / Received: 24.07.2014

Kabul tarihi / Accepted: 14.09.2014

Yazışma Adresi: Yrd.Doç.Dr. Müzeyyen İZMİRLİ, Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD ve Moleküler Biyokimya Genetik AD, Hatay, E-posta: muzeyyenizmirli@gmail.com

GİRİŞ

MTHFR (Metilen tetrahidrofolat redüktaz), folat metabolizmasında kilit rol oynayan, 5-10 metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata dönüşümünü geri dönüşümsüz katalizleyen enzimdir. 5-metiltetrahidrofolat, folatın plazmadaki majör formu olup, homosisteinden metiyonin sentezi için bir metil donörü olarak hareket eder. Ayrıca, folatın pürin ve pirimidin oluşumuna katılması enzime metabolik dengenin korunmasında hayati önem kazandırır (1). MTHFR enzimini kodlayan gen 1p 36.3 te lokalizedir ve 4. ekzonunun 677. nükleotit pozisyonunda sitozin yerine timinin gelmesi sonucu oluşan nokta mutasyonu, ilgili enzimde alanin aminoasidinin yerine valinin gelmesi ile sonuçlanarak enzimin termolabil bir varyantının oluşmasına (*t*MTHFR) yol açar. Bu durum total enzim aktivitesinin %55-65 düşmesine sebep olarak folat metabolizmasının dengesini bozar (2-4).

MTHFR geninde oluşan polimorfizmler ve özellikle C677T polimorfizmi enzim aktivitesini etkileyerek, birçok kronik hastalığın oluşması ve gelişmesiyle ilişkilendirilmiştir. Yapılan analizler, MTHFR C677T tek nükleotit polimorfizminin şizofreni, konjenital kalp defektleri ve çeşitli kanser türleri gibi hastalıkların gelişme riskini arttırdığını göstermiştir (5-9). Ayrıca, bu polimorfizmin, özellikle batı ülkelerinde ve ileri yaşta en sık tanı konulan ve ölüm sebebi olan malignitelerden biri olan prostat kanseri riskiyle de ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (10). Prostat kanseri, erkek bireyler arasında en yaygın olarak görülen ikinci habis tümördür (11). Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı'nın 2009 yılı verilerine göre, ülkemizde erkek bireylerde görülen kanser vakalarının % 36.1'ini prostat kanseri oluşturmaktadır. Hatay ilinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise kanser vakalarının %7.9'unu prostat kanserli hastaların oluşturduğu tespit edilmiştir (12). Bu hastalığın etiyojisi % 5-10'luk bir oranla ailesel öykü ve genetik yatkınlığa dayandırılmakta ve aslında büyük ölçüde de bilinmemektedir (13).

Çalışmada, ilgili polimorfizmin prostat kanseri teşhisi konmuş hasta ve sağlıklı kontrol bireyler arasında kıyaslanması ve prostat kanserinin bu polimorfizm ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji polikliniğine başvuran, 20 prostat kanseri teşhisi konmuş hasta ve herhangi bir patoloji saptanmamış 20 sağlıklı birey üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma ile ilgili olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 26.06.2014 tarihli 11 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerden 3 ay içerisinde toplanan ve hemogram tüplerine alınan kan örnekleri çalışma başlayıncaya kadar +4°C'de saklandı. İlk olarak bu kanlardan manüel bir yöntem olan

Mustafa Kemal Üniv.Tıp Derg, Cilt 5, Sayı 19, Yıl 2014

Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi (14) aracılığıyla DNA'lar izole edildi. İlgili polimorfizmin bulunduğu bölge İzmirli ve ark. (2009)'nın yapmış oldukları çalışmadaki prosedüre uygun olarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldıktan sonra, uygun restriksiyon enzimi aracılığıyla ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile kesildi (15). Poliakrilamid Jel Elektrofrez tekniği ile örneklerin yürütüldüğü jel görüntülenerek değerlendirildi. Sonuçlar, hasta ve kontrol bireyler arasında kıyaslanarak prostat kanserinin bu polimorfizm ile ilişkisi değerlendirildi.

MTHFR genine ait 198 baz çiftlik PCR ürününün elde ediliminde, her bir primerden 10 pmol (Forward: 5'TGA AGG AGA AGG TGT C→TG CGG GA3' ve Reverse: 5'AGG A→CG GTG CGG TGA GAG TG3'), 2 mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 2.5 U *Taq polimeraz* ve 100-500 ng DNA örneği içeren PCR mix'i kullanıldı. Konvansiyonel PCR cihazındaki reaksiyon döngüsü;

Ön denatürasyon: 95°C 0:03:00

Denatürasyon: 95°C 0:00:30

Yapışma: 62°C 0:00:30

Sentez: 72°C 0:00:30

Toplam döngü: 30

Son sentez: 72 °C 0:10:00 sn

şeklinde ayarlandı (15). PCR ürünlerinin kesimi, GANTC dizisini tanıyarak nükleotit dizisini 175 ve 23 bp olmak üzere iki fragmente ayıran *Hinf I* enzimi ile gerçekleştirildi. Bu enzimle 37°C'de 3 saat muamele edilen PCR ürünleri daha sonra %10'luk poliakrilamid jelde, 100 V 90 dk'ya ayarlanan güç kaynağı aracılığıyla yürütüldü. Elektrofrez işlemi sonrasında jel görüntülenerek oluşan bantlar yorumlandı (15).

BULGULAR

Çalışmaya dâhil ettiğimiz hasta ve kontrol grubunun genotip içeriği tablo 1'de verilmiştir. Tablo 2'de ise C677T tek nükleotit polimorfizmini temsil eden genotip yüzdeleri hasta grupta %60'inde CC (homozigot normal), %40'inde CT (heterozigot mutant); sağlıklı bireylerde ise %60'ında CC, %35'inde CT ve %5'inde TT (homozigot mutant) olarak verilmiştir.

Tablo 1. Araştırmaya dâhil ettiğimiz çalışma popülasyonumuzun MTHFR C677T polimorfizminin genotip değerlendirmesi

HASTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	CT	CT	CT	CC	CT	CT	CC	CT	CC	CC
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC
KONTROL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	CT	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CT
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	CC	CT	TT	CC	CC	CT	CC	CT	CC	CC

Tablo 2. MTHFR C677T polimorfizminin hasta ve kontrol grup arasında dağılımı

	CC		CT		TT	
	n	%	n	%	n	%
HASTA	12	60	8	40	-	-
KONTROL	12	60	7	35	1	5

TARTIŞMA

MTHFR folat metabolizmasında rol alan kilit enzimdir. Enzim geninde tespit edilen C677T tek nükleotit polimorfizminin prostat kanseri dahil, çeşitli hastalıklar ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (5-9).

Çalışmamızda, Hatay ilindeki 20 prostat kanseri teşhisi konmuş hasta ve 20 sağlıklı kontrol bireyler arasında MTHFR C677T tek nükleotit polimorfizmini kıyaslayarak hastalık ile ilişkisi değerlendirilmiştir. C677T polimorfizmi frekansları istatistik yapmadan yüzde olarak değerlendirildiğinde, hasta bireylerde CC %60, CT %40, sağlıklı bireylerde CC %60 CT %35 TT %5 oranında tespit edilmiştir.

Konu ile alakalı ülkemizde de çalışmalar yapılmış olup, İstanbul'da yapılan bir çalışmada polimorfizmin prostat kanseri riskine karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterirken (16).

Eskişehir’de yapılan diğer çalışma hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlememiştir (17).

Ekvador popülasyonunun dahil edildiği, güney Amerika popülasyonunu temsil eden çalışmada, ilgili polimorfizm ile prostat kanserinin gelişimi arasında önemli derecede ilişki olduğu ve bu polimorfizmin hastalığa yatkınlığı artırdığı tespit edilmiştir (18) Bir diğer çalışma Jamaika’daki Afrika kökenli popülasyonda yapılmıştır. Bu çalışmada MTHFR C677T ve prostat kanseri arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve herhangi bir ilişki bulunmamıştır (19). Tayvan’da, prostat kanseri teşhisi konmuş hasta ve sağlıklı kontrol bireylerin dahil edildiği bir araştırma, T alelinin prostat kanseri riskine karşı önemli derecede koruyucu olduğunu göstermiştir (20). Safarinejad MR ve ark’nın (2010) yapmış oldukları çalışma da MTHFR TT genotipinin prostat kanseri riskini yaklaşık %40 düşürdüğünü tespit eden bir diğer çalışmadır (21). Kimura ve ark’nın Almanya’da yapmış oldukları çalışmada MTHFR valin alleli (TT) prostat kanserli hastalar arasında temsil edilmesine rağmen, prostat kanserli hasta ve kontrol grubu arasında önemli bir farklılık görülmemiştir (22). Hollanda’da yapılan bir diğer çalışmada ise, homozigot mutant genotipin (TT) prostat kanseri riskini önemli derecede artırdığı görülmüştür. Riskin özellikle, düşük folat seviyesi, fazla alkol alımı ve yaş artışıyla korele olduğu sonucuna varılmıştır (23). Farklı coğrafi alanlarda ve farklı popülasyonlarda yapılan çalışmaların sonuçları da farklı olmuştur. Örneğin, Güney Amerika ve Hollanda’da MTHFR C677T polimorfizminin prostat kanseri riskini artırdığı (18,23), Jamaika ve Almanya’da ise herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (19,22). Tayvan ve İran gibi Asya ülkelerinde ise polimorfizmin mutant TT genotipi koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir. Bizim araştırmamızda da yüzdelere değerlendirildiğinde hasta grubunda hiç TT mutant tip gözlenmezken sağlıklı grupta %5 oranında TT mutant genotip gözlenmiştir (20-21). Bu göz önünde bulundurulduğunda sonuçlarımız TT genotipinin prostat kanserinde koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu da ülkemizde Küçüküseyin ve ark. larının İstanbul’da yaptıkları çalışma ve Asya popülasyonu çalışmaları ile koreledir (16,20-21).

Sonuç olarak, coğrafya ve popülasyon değişiklikleri polimorfizm çalışmalarında önemli bir kriterdir. Bu yüzden konu ile ilgili kapsamlı ve daha net bir bilginin sağlanması için, MTHFR C677T polimorfizminde, folat metabolizmasının profili ve farklı popülasyonlara ait yaşam alışkanlıklarının da dikkate alınarak çalışılması daha faydalı olacaktır. Bizim araştırmamızdaki çalışma popülasyonumuz Hatay yöresini temsil etmektedir. MTHFR C677T tek nükleotit polimorfizmi ve prostat kanseri ile ilgili bu çalışma konu ile ilgili olarak

Hatay'da yapılan ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir. Ayrıca, yaptığımız çalışmada MTHFR 677TT genotipi prostat kanseri için koruyucu etki göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmadaki desteklerinden ötürü Mustafa Kemal Üniversitesi Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim dalında öğrenci olan Kübra Gündüz, Nilüfer Bilgiç, Leyla Ataç ve Haluk Uluca'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1- Molloy AM. Genetic aspects of folate metabolism. Subcell Biochem. 2012; 56, 105-30.
- 2- Chai AU, Abrams J. Homocysteine: a new cardiac risk factor? Clin Cardiol. 2001; 24: 80-84.
- 3- Guilliams TG. Homocysteine a risk factor for vascular diseases: Guidelines for the clinical practice. JANA. 2004; 7(1): 11-24.
- 4- Medina MA, Amores-Sanchez MI. Genetic basis of hyperhomocysteinemia. Mol Genet Metab. 2000; 71: 478-480.
- 5- Lewis SJ, Zammit S, Gunnell D, Smith GD. A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005; 5; 135B(1), 2-4.
- 6- Langevin SM, Lin D, Matsuo K, Gao CM, Takezaki T, Stolzenberg-Solomon RZ, Vasavi M, Hasan Q, Taioli E. Review and pooled analysis of studies on MTHFR C677T polymorphism and esophageal cancer. Toxicol Lett. 2009; 30; 184(2): 73-80.
- 7- Dong X, Wu J, Liang P, Li J, Yuan L, Liu X. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. Arch Med Res. 2010; 41(2): 125-33.
- 8- Zhang J, Qiu LX, Wang ZH, Wu XH, Liu XJ, Wang BY, Hu XC. MTHFR C677T polymorphism associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 15,260 cases and 20,411 controls. Breast Cancer Res Treat. 2010; 123(2): 549-55.
- 9- Yin M, Dong L, Zheng J, Zhang H, Liu J, Xu Z. Meta-analysis of the association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of congenital heart defects. Ann Hum Genet. 2012; 76(1): 9-16.
- 10- Zhang WB, Zhang JH, Pan ZQ, Yang QS, Liu B. The MTHFR C677T Polymorphism and Prostate Cancer Risk: New Findings from a Meta-analysis of 7306 Cases and 8062 Controls. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012; 13(6): 2597-604.

- 11- 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; 15;127(12): 2893-917.
- 12- Arica S, Nazlıcan E, Özer C, Şilfeler DB, Arica V, Özgür T, Özaydın Ü. The frequency and distribution of cancer cases in Hatay District in 2008. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2011; 2 (2): 192-195.
- 13- Kobayashi LC, Limburg H, Miao Q, Woolcott C, Bedard LL, Massey TE, Aronson KJ. Folate intake, alcohol consumption, and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism: influence on prostate cancer risk and interactions. *Front Oncol*. 2012; 14; 2: 100.
- 14- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.
- 15- İzmirli M, İnandıklıoğlu N, Abat D, Alptekin D, Demirhan O, Tansug Z, Bayazit Y. MTHFR Gene Polymorphisms in Bladder Cancer in the Turkish Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2011; Vol 12.
- 16- Küçük hüseyin Ö, Kurnaz Ö, Akadam-Teker AB, Narter F, Yılmaz-Aydoğan H, İsbir T. Effects of the MTHFR C677T polymorphism on prostate specific antigen and prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(9): 2275-8.
- 17- Muslumanoglu MH, Tepeli E, Demir S, Uludag A, Uzun D, Atli E, Canturk KM, Ozdemir M, Turgut M. The analysis of the relationship between A1298C and C677T polymorphisms of the MTHFR gene with prostate cancer in Eskisehir population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009; 13(5): 641-5.
- 18- López-Cortés A, Jaramillo-Koupermann G, Muñoz MJ, Cabrera A, Echeverría C, Rosales F, Vivar N, Paz-y-Miño C. Genetic polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the Ecuadorian population. *Am J Med Sci*. 2013; 346(6): 447-54.
- 19- Jackson MD, Tulloch-Reid MK, McFarlane-Anderson N, Watson A, Seers V, Bennett FI, Egleston B, Ragin C. Complex interaction between serum folate levels and genetic polymorphisms in folate pathway genes: biomarkers of prostate cancer aggressiveness. *Genes Nutr*. 2013; 8(2): 199-207.
- 20- Wu HC, Chang CH, Tsai RY, Lin CH, Wang RF, Tsai CW, Chen KB, Yao CH, Chiu CF, Bau DT, Lin CC. Significant association of methylene tetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms with prostate cancer susceptibility in taiwan. *Anticancer Res*. 2010; 30(9): 3573-7.

- 21-** Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Relationship between three polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T, A1298C and G1793A) gene and risk of prostate cancer: a case-control study. *Prostate*. 2010; 1; 70(15): 1645-57.
- 22-** Kimura F, Franke KH, Steinhoff C, Golka K, Roemer HC, Anastasiadis AG, Schulz WA. Methyl group metabolism gene polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *Prostate*. 2000; 45,225-31.
- 23-** Heijmans BT, Boer JM, Suchiman HE, Cornelisse CJ, Westendorp RG, Kromhout D, Feskens EJ, Slagboom PE. A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Re*. 2003; 63,1249-53