

## Kolon Kanserine Yatkınlık ile p53 Geni Kodon 72 ve PAI-1 Geni 4G/5G Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

Banu BAYRAM<sup>1</sup>, Mete ÖZKURT<sup>2</sup>, Bartu BADAĞ<sup>3</sup>, Nilüfer ERKASAP<sup>2</sup>, Serdar ERKASAP<sup>3</sup>, Bülent YILDIZ<sup>4</sup>, Enver İHTİYAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tıbbi Biyoloji AD, Tıp Fakültesi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, Türkiye

<sup>2</sup>Fizyoloji AD, Tıp Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

<sup>3</sup>Genel Cerrahi AD, Tıp Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

<sup>4</sup>Tıbbi Onkoloji AD, Tıp Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

✉: bayrambanu@hotmail.com

Geliş (Received): 16.08.2017

Düzeltilme (Revision):08.09.2017

Kabul (Accepted): 12.11.2017

### ÖZ

Bu çalışmada Türk popülasyonunda kolon kanseri ile p53 geni kodon 72 ve PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Genomik DNA 72 kolon kanserli hastadan ve 76 kontrol bireyinden izole edilmiştir. Her bir polimorfizm için uygun primerler kullanılarak izolen edilen DNA PCR tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri genotiplerin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezine tabi tutularak UV transilüminatör ile değerlendirilmiştir. p53 geni kodon 72 genotip dağılımı ve allel frekansları incelendiğinde kolon kanserli hastalar ve kontrol bireyleri arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmemiştir ( $p>0.05$ ). PAI-1 4G/5G genotip dağılımı ve allel frekansları açısından ise 4G/4G genotipi kontrol bireylerine göre kolon kanserli hastalarda daha yüksek bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Elde edilen verilere göre çalışmanın yapıldığı Türk popülasyonunda p53 geni kodon 72 polimorfizminin kolon kanseri gelişiminde bir yatkınlık faktörü olamayacağı, PAI-1 4G/5G polimorfizminin ise olabileceği kanısına varılmıştır

**Anahtar Kelimeler:** Kolon, Kanser, Gen, Polimorfizm, PAI-1, p53

## Association of Colon Cancer Susceptibility With P53 Gene Codon 72 And Pai-1 Gene 4g/5g Polymorphisms

### ABSTRACT

We aimed to investigate the relationship between colon cancer and p53 gene codon 72 and PAI-1 gene 4G/5G polymorphism in a Turkish study population. Genomic DNA was extracted from 72 patients with colon cancer and 76 controls. PCR technique was used to amplify extracted DNA with proper primers for each polymorphism. For identifying genotypes PCR products were assessed with UV transilluminator by being exposed to agarose gel electrophoresis. There was no statistical difference between colon cancer patients and controls according to p53 gene codon 72 genotype distribution and allele frequencies ( $p>0.05$ ). Due to PAI-1 gene 4G/5G genotype distribution 4G/4G genotype was frequently higher in colon cancer patients compared to controls ( $p<0.05$ ). As a conclusion of our study we may assert that p53 gene codon 72 polymorphism should not be related as a susceptibility factor for colon cancer development in the studied Turkish population while PAI-1 gene 4G/5G polymorphism should be related.

**Keywords:** Colon, Cancer, Gene, Polymorphism, PAI-1, p53

### GİRİŞ

Kolon kanseri dünya genelinde oldukça önemli bir sağlık sorunudur [1]. Kolon kanseri gelişiminin biyoloji ve genetiğinin anlaşılması hastalığın önlenmesi ve tedavisinde yeni yaklaşımların belirlenmesi açısından bir temel oluşturmaktadır [2]. Polimorfizmler gibi genetik varyasyonlar hastalıklara olan yatkınlıklarımızda farklılıklarımızı ortaya koymaktadır. Bu polimorfizmlerin birçoğu immün sistem ve hücrel stresin yanıtını düzenleyen genlerde, mutasyonların

baskılanmasında ve metabolizmada rol alan enzimleri kontrol eden genetik yollarda bulunurlar [3, 4].

p53 proteinini kodlayan gendeki en önemli genetik farklılıklar, kromozom 17p'de lokalizedir. p53 geni kodon 72'de tek nükleotidlik bir değişime bağlı olarak arjinin (Arg) veya prolin (Pro) amino asidi oluşur. Bu fark p53 proteininin biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine etki eder: prolin aminoasidi içeren p53 transkripsiyon aktivatörü iken, arginine amino asidini taşıyan p53 proteini apoptoz indükleyicisi olarak davranış sergiler [5].

Plazminojen aktivatör inhibitör tip 1 (PAI-1) proteini ise çok yönlü bir proteolitik faktör olup, bir çok kanser hücresinde eksprese edilmektedir. PAI-1 protein aktivitesine bağlı olarak kanser büyümesi, invazyon ve anjiyogenez olaylarının modülasyonuna olanak sağlar [6]. Yapılan çalışmalarda PAI-1 aktivitesinin PAI-1 4G/5G polimorfizmi ile bağlantılı olduğu, 4G homozigotluğuna sahip bireylerin sırasıyla 4G5G ve 5G5G genotipine sahip bireylere göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [7,8].

Hasta ve hasta olmayan bireylerde bu varyantların genotip dağılımlarının belirlenmesi, bu polimorfizmlerin çeşitli hastalıklar ile ilişkisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [9]. Yapılan literatür taramalarına göre farklı popülasyonlarda kolon kanseri ve p53 geni kodon 72 ve PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmleri arasındaki ilişkinin ortaya konduğu çalışmalar söz konusudur. Ancak bir polimorfizme ait genetik varyasyonlar gen havuzları, yaşam tarzı ve çevre etkileşimlerine bağlı olarak popülasyonlar arasında değişiklikler sergiler [10]. Bu nedenle bu çalışmada Türk popülasyonunda p53 geni kodon 72 ve PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmlerinin genotip dağılımı ve allel frekanslarının belirlenerek bu polimorfizmler ile kolon kanseri gelişimi arasında bir ilişki olup olmadığını ortaya koyabilmek amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Çalışma popülasyonu

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalına başvuran 72 kolon kanserli hasta ile 78 sağlıklı kontrol bireyde gerçekleştirilmiştir. Kolon kanseri hastaları klinik ve patolojik tanıları ile değerlendirilmiş olup daha önce kemo/radyoterapi almamış bireylerden oluşturulmuştur. Sağlıklı kontrol bireyleri ise kolon veya herhangi bir kanser öyküsü taşımayan bireylerden seçilmiştir. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulundan çalışmanın etik onayı alınmış olup, çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan yazılı onam formu imzası temin edilmiştir.

### DNA izolasyonu

DNA çalışma bireylerinden alınan 2 ml venöz kandan kit prosedürüne uygun olarak izole edilmiş (Vivantis, Malesia) ve + 4°C'de saklanmıştır.

### p53 geni kodon 72 polimorfizmi genotipleme

İzole edilen DNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak amplifiye edilmiştir. Amplifikasyonda kullanılan allel spesifik primerler: forward, 5'-TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA-3' ve reverse, 5'-TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC-3' şeklindedir. 5 µl DNA örneği denatürasyon: 95°C'de 30 s, bağlanma: 59°C'de 30 s, ve uzama: 72°C'de 35 s olacak şekilde 35 döngülük bir protokole tabi tutulurken, 50 µl'lik PCR karışımı her bir primerden 10 pmol, 10X PCR buffer, 2 mM dNTPs, ve 5U Taq polimeraz içermektedir. PCR ürünleri 4 µl etidyum

bromid içeren %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulup CCD ile görüntülenerek jel analiz yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Elde edilmesi beklenen 199 bp /baz çifti)fragmentlik PCR ürünleri ardından bir saat 60°C'de 1 ünite *BstFNI* (Vivantis, Malesia) restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. Oluşan yeni ürünler 4 µl etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulup CCD ile görüntülenerek jel analiz yazılımı programı ile tekrar değerlendirildi.

### PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmi genotipleme

İzole edilen DNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak amplifiye edildi. Amplifikasyonda kullanılan allel spesifik primerler: 5G alleli için, 5'-GTC TGG ACA CGT GGG GG-3'; 4G alleli için, 5'-GTC TGG ACA CGTGGG GA-3', downstream primer, 5'-TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G-3' ve upstream primer, 5'-AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT-3' şeklindedir. 5 µl DNA örneği denatürasyon: 94°C'de 60 s, bağlanma: 54°C'de 30 s, ve uzama: 72°C'de 40 s olacak şekilde 35 döngülü bir protokole tabi tutulurken, 25 µl'lik PCR karışımı her bir allele spesifik ve downstream primerlerden 50 pmol, upstream primerden 2.5 pmol, 10X PCR buffer, 2 mM dNTPs, ve 5U Taq polimeraz içermektedir. PCR ürünleri 4 µl etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulup CCD ile görüntülenerek jel analiz yazılımı programı ile değerlendirilmiştir.

### İstatistiksel analiz

Veriler SPSS ver.15 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki genotip dağılımları ve allel frekansları Pearson  $\chi^2$ -testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. p değeri 0.05'ten düşük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### TARTIŞMA

Elde edilen verilere göre çalışmayı yürüttüğümüz Türk popülasyonunda kolon kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında p53 geni kodon 72 polimorfizmi genotip dağılımları ve allel frekansları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 1-2). Arg72Pro, p53 proteininin aminoasit dizilimini etkiler ve oluşan iki p53 varyantı için farklı biyokimyasal özelliklerin oluşmasına sebep olur. Arg alleli apoptozun indüklenmesinde daha etkili iken, Pro alleli hücre döngüsünün durdurulmasının güçlü bir indükleyicisi olarak daha yüksek oranda DNA tamir kapasitesi sergiler [11]. Birçok çalışmada Pro allelinin kolon kanseri riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur [1]. Sonuçlarımız Arg allelinin Pro allelinden daha güçlü bir tümör baskılayıcı olması açısından yukarıda bahsettiğimiz model ile uyum göstermektedir. Abderrahmane ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, bu çalışmayaile benzer şekilde Batı Cezayir popülasyonunda p53 geni kodon 72 polimorfizmi ve kolon kanseri arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir [1]. Ancak Arjantin popülasyonunda yapılmış olan bir çalışmada p53 geni kodon 72 arjinin homozigotluğunun kolon kanseri gelişimine yakınlık sebebi olduğu öne

sürülmüştür [12]. Kore popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise p53 geni kodon 72 prolin homozigotluğunun kolon kanseri riski ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [13]. Tüm çalışmalar ortak ele alındığında halen bu polimorfizm ve kolon kanseri arasındaki ilişki netliğe kavuşmamaktadır. PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmi açısından sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde ise 4G/4G homozigotluğunun kolon kanserli hastalarda kontrol bireylerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ) (Tablo 1). 4G allel frekansı da kolon kanserli hastalarda kontrol bireylerine göre yüksek belirlenmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 2). PAI-1 geni 4G allelinin PAI-1 protein aktivitesini arttırmasına bağlı olarak özellikle kolon ve endometriyal kanser riskinin artmasına katkıda bulunduğu bu sebeple 5G allelinin kanser gelişimine karşı koruyucu özelliğinin olduğu belirtilmiştir [7]. Bizim sonuçlarımızda bu durum ile uyum içerisindedir. Beyaz ırkta yapılan bir çalışmada da PAI-1 geni 4G homozigotluğunun kolon kanseri için kullanışlı bir tanı belirteci olduğu öne sürülmüştür [9]. Bu sonuçlara karşıt bir şekilde Polonya popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise kolon kanseri ve hastalar arasında PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmi genotip dağılımları açısından bir farklılık olmadığı ancak yüksek PAI-1 protein aktivitesinin kolon kanseri ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır [14]. Tüm çalışmalar ortak ele alındığında ise bu polimorfizm ve PAI-1 aktivitesinin kolon kanseri ile doğrudan veya dolaylı ilişkide olduğu öne sürülebilir.

**Tablo 1.** Genotip dağılımları

Genetik Polimorfizm	p53 geni kodon 72 polimorfizmi		PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmi	
	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol
Grup	Arg/Arg	Arg/Arg	4G/4G	4G/4G
Genotip	Pro/Arg	Pro/Arg	4G/5G	4G/5G
	Pro/Pro	Pro/Pro	5G/5G	5G/5G
n	49	53	27	15
	3	4	25	44
	20	19	20	17
İstatistik	$p>0.05$		$p<0.05$	

**Tablo 2.** Allel frekansları

Genetik Polimorfizm	p53 geni kodon 72 polimorfizmi		PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmi	
	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol
Grup	Arg	Arg	4G	4G
Allel	Pro	Pro	5G	5G
%	70	72.4	54.9	48.7
	30	27.6	45.1	51.3
İstatistik	$p>0.05$		$p>0.05$	

## SONUÇ

Türk popülasyonunda p53 geni kodon 72 ve PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmlerinin genotip dağılım ve allel frekanslarının belirlenerek bu polimorfizmler ile kolon kanseri gelişimi arasında bir ilişki olup olmadığını ortaya koyabilmeyi amaçladığımız bu çalışmanın sonucunda çalışmayı yürüttüğümüz Türk popülasyonunda p53 geni kodon 72 polimorfizminin kolon kanseri gelişimine yakınlıkta bir risk faktörü olmadığını ancak PAI-1 geni 4G/5G polimorfizminin bir risk faktörü olabileceği kanısına varıldı. Ne var ki hastalıklara yakınlıkta genetik polimorfizmlerin rolünü ortaya net koyabilmek için daha büyük popülasyonlar üzerinde çalışmaları yürütmek oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamız, Türk popülasyonunda bu polimorfizmlerin kolon kanseri gelişimine olan katkılarını kısmen ortaya koyan bir ön çalışma niteliği taşımaktadır.

## KAYNAKÇA

- [1] Abderrahmane R., Louhibi L., Moghtit F. Z., Boubekeur A., Benseddik K., Boudiema A., Benrrahal F., Aberkane M., Fodil M., Saïdi-Mehtar N. TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms and colorectal cancer risk: A West Algerian population study, Pathology Oncology Research, 21, 629-635, 2015.
- [2] Rodrigues N. R., Rowan A., Smith M. E.F., Kerr I. B., Bodmer W. F., Gannon J. V. Lane D. P. p53 mutations in colorectal cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87, 7555-7559, 1990.
- [3] Zienolddiny S., Skaug V. Single nucleotide polymorphisms as susceptibility, prognostic, and therapeutic markers of nonsmall cell lung cancer. Lung Cancer, 3, 1-14, 2012.
- [4] Sugimura H., Tao H., Suzuki M., Mori H., Tsuboi M., Matsuura S., Goto M., Shinmura K., Ozawa T., Tanioka F., Sato N., Matsushima Y., Kageyama S., Funai K., Chou P. H., Matsuda T. Genetic susceptibility to lung cancer, Frontiers in Bioscience, 3, 1463-1477, 2011.
- [5] Soussi T., Wiman K. G. TP53: an oncogene in disguise. Cell Death Differentiation, 22:8, 1239-1249, 2015.
- [6] Wang S., Cao Q., Wang X., Bingjie L., Min T., Wanqing Y., Jianzheng F., Jian Q., Chao Q., Wei Z. PAI-1 4G/5G polymorphism contributes to cancer susceptibility: Evidence from Meta-Analysis, Plos One, 8:2:e56797, 2013.
- [7] Gunes H. V., Cosan D. T., Ata N., Birdane A., Ustuner M. C., Dikmen M., Bayram B., Degirmenci I. Plasminogen activator inhibitor type-1 gene 4G/5G polymorphism is associated with hypertensive patients in the Turkish Population, Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 14:3, 303-305, 2010.
- [8] Loktionova A., Watson M. A., Stebbings W. S. L., Speakman C. T. M., Bingham S. A. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism and colorectal cancer risk and prognosis, Cancer Letters, 189, 189-196, 2003.
- [9] Hirschhorn J. N., Lohmueller K., Byrne E., Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies, Genetics in Medicine, 4, 45-61, 2002.
- [10] Kilicci C., Bayram B., Ozkurt M., Onlu H., Erkasap N., Mutlu F. Plasminogen activator inhibitor type-1 gene 4G/5G polymorphism and polycystic ovary syndrome, Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 15:7-8, 565-567, 2011.
- [11] Proestling K., Hebar A., Pruckner N., Marton E., Vinatzer U., Schreiber M. The Pro allele of the p53

- codon 72 polymorphism is associated with decreased intratumoral expression of BAX and p21, and increased breast cancer risk, *Plos One*, 7:10. e47325, 2012.
- [12] Pérez L. O, Abba M. C, Dulout F. N, Golijow C. D. Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina, *World Journal of Gastroenterology*, 12:9, 1426-1429, 2006.
- [13] Song H. R., Kweon S. S., Kim H. N., Piao J. M., Yun W. J., Choi J. S., Hwang J. E., Yoon J. Y., Kim H. R., Park Y. K., Kim S. H., Choi Y. D., Shin M. H. p53 codon 72 polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer in a Korean population, *Gastric Cancer*, 14, 242-247, 2011.
- [14] Basiak J., Smolarz B., Kubryn I., Kulig A., Dziki A., Ulancka J., Pander B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) level and 4G/5G genetic polymorphism in patients with colorectal cancer, *Experimental Oncology*, 22, 48-51, 2000.