

Mide kanseri hastalarında survivin gen polimorfizmi araştırılması

Investigation of survivin gene polymorphism in patients with gastric carcinoma

Nesibe Yamak¹, Kürşat Oğuz Yaykaşlı², Hatice Soğuktaş¹, Emine Yaykaşlı¹, Murat Oktay³,
Havva Erdem³, Ertuğrul Kaya⁴, Aysun Ekinci⁵, Savaş Kaya⁶, Yener Kurman¹

ÖZET

Amaç: Dünya genelinde mide kanserinin insidansı düşmesine rağmen hala önemli bir sağlık problemidir. Türkiye'de ise yılda 30.000 yeni mide kanseri vakasıyla 2. en sık görülen kanserdir. Mide kanseri genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan çok faktörlü karmaşık bir hastalıktır. Kanserli dokuda aşırı ifade edilen survivin, apoptozis inhibe edici proteinlerdendir. Bu çalışmada Survivin -31 G/C polimorfizmi ile mide kanseri arasındaki ilişki araştırıldı.

Gereç ve yöntem: Çalışma Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Laboratuvarına gelen mide kanseri tanısı konmuş 46 hasta ve sağlıklı bireylerin oluşturduğu 42 kişilik kontrol grubu ile gerçekleştirildi. Bu bireylerin genotipi Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında PCR-RFLP yöntemiyle tayin edildi.

Bulgular: Hasta grubunda, GG genotipi 16 (% 34,8), GC genotipi 21 (% 45,7) ve CC genotipi ise 9 (% 19,6) olguda saptandı. Kontrol grubunda ise, genotip dağılımı sırasıyla 13 (% 31), 26 (% 61,9) ve 3 (% 7,1) bulundu. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı. Fakat CC genotipine sahip bireylerin mide kanserine yakalanma riskinin GG (OR=1,52) daha fazla risk oluşturduğu bulundu.

Sonuç: Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla Türk toplumunda mide kanseri ile Survivin -31G/C polimorfizmini araştıran ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçlar hasta ve kontrol gruplarımızın temsil ettiği toplum kesitinde mide kanseri ile Survivin -31 G/C polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermekle birlikte CC genotipinin mide kanserine yatkınlık oluşturduğu düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Polimorfizm, mide kanseri, survivin gen, apoptozis

ABSTRACT

Objectives: Despite decreasing incidence of gastric cancer in worldwide, it is still a major health problem. Every year, 30.000 new gastric cancer cases emerging, and it is the second most common cancer in Turkey. Gastric cancer is a complex multifactorial disease, emerging by interaction between genetic and environmental factors. Survivin, apoptosis inhibitory protein is over-expressed in cancer tissue. In this study, association between Survivin -31G/C polymorphism and gastric carcinoma was investigated.

Materials and Methods: 46 gastric carcinoma patients who had been admitted at Düzce University Research and Practice Hospital, Laboratory of Pathology and 42 healthy individuals have been included in the study. Samples have been subjected to genetic analysis by PCR-RFLP method in Medical Genetics Department laboratory at Düzce University.

Results: GG genotype was found in 16 (34.8%), GC genotype in 21 (45.7%), CC genotype in 9 (19.6%) in patient group. In control group, genotype distribution were found 13 (31%), 26 (61.9%) and 3 (7.1%) respectively. The statistically significant difference was not found when compared between patient and control groups. However, we observed the increased occurrence of gastric cancer associated with CC genotype (OR=1.52).

Conclusions: In our knowledge, this study is the first to evaluate the relationship between gastric carcinoma and Survivin -31G/C polymorphism in Turkish population. Our results show that there is no any association between gastric carcinoma and Survivin -31G/C polymorphism in the community which is represented by our study and control groups. However, it was concluded that CC genotype may create the susceptibility to gastric cancer.

Key words: Polymorphism, gastric carcinoma, surviving gene, apoptosis

¹ Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

² Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

³ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

⁴ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Düzce

⁵ Diyarbakır Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Biyokimya, Diyarbakır, Türkiye

⁶ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

Yazışma Adresi /Correspondence: Dr. Kürşat Oğuz Yaykaşlı,

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, 81620 Konuralp, Düzce, Türkiye Email: kursatyay@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 17.07.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 31.08.2012

Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2012, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

GİRİŞ

Dünyada görülen ölüm vakalarının yaklaşık %20'si kanserden ileri gelmektedir.¹ Mide kanserinin ise dünya genelindeki insidansı düşmesine rağmen hala önemli bir sağlık problemidir.² Elde edilen son verilere göre dünyada 2008 yılında 738.000 kişi mide kanserinden hayatını kaybetmiştir. Bu istatistiğe göre mide kanseri vakalarının %8'inin ölümle sonuçlandığını gösterir. Mide kanserine yakalanma ve ölümlerin %70'i gelişen ülkelerde olmaktadır.³ Gelişen bir ülke olan ülkemizde ise yılda 30.000 yeni mide kanseri vakasının ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. İstatistiklere göre mide kanseri, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci, erkeklerde ise akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır.⁴ Mide kanseri genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan çok faktörlü karmaşık bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkmasında genetik yatkınlık önemli rol oynar.⁵

Apoptozis ise, hem hücre homeostazisinin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir. Apoptozis, genetik yolaklarla düzenlenmekte ve malign hücrelerde bu yolakların denetimi bozulabilmektedir. Bu da kontrolsüz hücre büyümesine ve tümör gelişimine neden olmaktadır.⁶

Yakın zaman önce bulunan ve BIRC5 olarak da bilinen Survivin, apoptozisi inhibe edici (Inhibitor of Apoptosis Proteins - IAPs) proteinlerdendir. 17q25 kromozomunda yer alan survivin geni, 3 intron 4 ekzondan meydana gelir ve 142 aminoasitlik bir proteini kodlar.^{7,8} Bugüne kadar 8 (BIRC1-BIRC8) adet rapor edilen bu anti-apoptotik proteinler, başlatıcı (kaspaz-9) ve efektör (kaspaz-3 ve kaspaz-7) kaspazları inhibe etmek suretiyle apoptozisi inhibe ederler. Survivin geni yapısında sadece BIR (baculovirus IAP repeat) domaini içermesi, RING ve CARD (caspase activation recruitment) domainin içermemesi sebebiyle de diğer anti-apoptotik genlere göre farklılık arz eder.⁹ Anti-apoptotik özeliğinin yanı sıra survivin proteini, hücre proliferasyonunda ve anjiyogenez de rol oynar.¹⁰ Hücre döngüsünün G2/M fazında ifade edilerek hücrenin bölünmesini sağlar.¹¹ Survivin geninin en önemli özelliklerinden biri kanser dokusunda normal dokuya göre çok daha fazla oranda ifade edilmesidir. Genellikle embriyonik dokuda ve fetal dokuda aşırı ifade edilen sur-

vinin normal dokuda tayin edilemeyecek kadar az ifade edilir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda mesane, kolon, kolorektal, akciğer, mide ve meme kanserlerinde survivin genin aşırı ifade edildiği bulunmuştur.^{12,13} Survivin proteini, apoptozisi inhibe ederek ve hücre proliferasyonunu artırarak tümör oluşumunu ve ilerlemesini sağladığı düşünülmektedir.¹⁴

Survivin gen ifadesinin düzenlenmesi transkripsiyon, translasyon gibi çeşitli aşamalarda kontrol edilmektedir. Survivin geninin promotör bölgesinde yer alan tek nükleotitik polimorfizmler (SNPs), survivin gen ifadesini ve kontrolünü etkiler. Bugüne kadar survivin geninin promotör bölgesinde 5 polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlar; -1547 A/G, -644 C/T, -625 C/G, -241 C/T ve -31 G/C polimorfizmleridir. Bunlar arasında CDE/CHR represör elementi bölgesinde yer alan -31 G/C polimorfizminin, survivin gen ifadesinin hem protein hemde mRNA seviyesinde arttırdığı bulunmuştur.^{15,16}

Türk toplumunda mide kanseri hastalarında farklı gen polimorfizm çalışmaları yapılmış olmasına rağmen survivin -31 G/C polimorfizmi ile alakalı çalışma mevcut değildir. Sunduğumuz bu çalışmada bu polimorfizmin mide kanseri gelişimi ile ilişkisi araştırılarak, Türk toplumundaki polimorfizm sıklığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Laboratuvarına gelen mide kanseri tanısı konmuş 46 hastanın parafin bloklarındaki tümör dokuları alınmıştır. Kontrol grubu olarak ise herhangi bir kanser tanısı konulmamış 42 bireyin parafin bloklarındaki tümör içermeyen dokuları alınmıştır. Kişilerin yaş, cinsiyet, aile hikayesi, tümör derecesi ve tümör tipi dahil olmak üzere demografik bilgileri kayıt edilmiştir. Parafin bloktan DNA izolasyonu, analytikjena blackPREP FFPE DNA Kit kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, parafin bloktan alınan kesitler üzerine 400 µl QPT ve 25 µl PK eklendi ve önce 50°C'da 1 saat sonra 90°C'da 2 saat inkübasyona bırakıldı. Santrifüj sonrası supernatant filtreye alındı üzerine 200 µl SBS eklendikten sonra santrifüj edildi. Filtre 700 µl MS solüsyonu ile iki defa yıkandı. Daha sonra filtreye elution tampon çözeltisi ilave edilip, santrifüj edilerek DNA elde edildi. Survivin genindeki -31 G/C

(rs9904341) polimorfizmi, polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism=PCR-RFLP) yöntemiyle analiz edildi. PCR için forward 5'- CGTTCTTT-GAAAGCAGTCGAG-3' ve reverse 5'- TGTAGA-GATGCGGTGGTCCT -3' primerleri kullanarak, 5 dakika 95 oC'de ilk denatürasyon, 30 saniye 95 oC'de denatürasyon, 45 saniye 66 oC'de bağlanma, 60 saniye 72 oC'de uzama ve 10 dakika 72 oC'de son uzama protokolü kullanılarak 35 döngüde yapıldı. Survivin genindeki -31 G/C polimorfizmi belirlemek için PCR ürünleri Eco0109I Fermentas FastDigest FD0264 restriksiyon enzimiyle inkübe ederek kesildi. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar kaydedildi.

Jel görüntüsünde 329 bp'lik band görünüyorsa CC genotipi, 234 bp ve 92 bp olarak iki ayrı band oluşursa GG genotipi, 329 bp, 234 bp ve 92 bp ola-

rak üç farklı band görünüyorsa CG heterozigot genotipi olarak belirlendi.

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 18.0 paket programı kullanılmıştır. Gruplar arasında sayısal değişkenlerin karşılaştırılmasında Student's t-testi, kategorik veriler için ise Ki-kare testi yapıldı. Tüm değişkenlerin birlikte ilişkisi Lojistik regresyon analizi ile kontrol edildi. Betimleyici değer olarak ortalama ± standart sapma ve oranlar verildi. P değeri 0.05 düzeyi anlamlı seviye olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma grubuna mide kanseri tanısı konmuş 35-81 yaş aralığında 46 birey dahil edildi. Bireylerin yaş ortalaması 63±13 olarak bulundu. Kontrol grubuna ise 26-75 yaş aralığında 42 birey dahil edildi. Kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalamasının 49±12 olarak bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. Survivin -31 G/C polimorfizmi açısından bireylerin yaş özellikleri

	Kontrol (n=42)		Hasta (n=46)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon		OR için %95 Güven Aralığı
	Ort±SD	Min-Maks	Ort±SD	Min-Maks	p	OR	p	
Yaş	49±12	26-75	63±13	35-81	<0,001	1,097	<0,001	1,044 - 1,152

Ort±SD: Ortalama±Standart deviasyon, OR: Odds Oranı

Hasta grubunun 13'ü (%28,3) kadın, 33'ü (%71,7) erkekti. Kontrol grubu ise 29 (%69) kadın ve 13 (%31) erkekten oluşuyordu. Hasta ve kontrol grubu arasında hastaların cinsiyetleri açısından anlamlı bir farklılık vardı (p<0,001). Hasta grubunda 1 (%3,6)'inin düşük, 15 (%53,6)'sının orta ve 12 (%42,9)'unun yüksek tümör derecesine sahiptir. Yine hasta grubunda 35 (%81,4)'ünün adenokarsinom, 1 (%2,3)'ünün karsinom, 6 (%14)'ünün taşlı yüzük ve 1 (%2)'ünün epitelyel tümör tipine sahipti. Çalışma grubundaki bireyler sigara kullanımı açısından değerlendirildiğinde 22 (%48,9)'unun sigara kullanmadığı, 23 (%51,1)'inin sigara kullandı-

ğı tespit edildi. Kontrol grubundaki bireylerin ise 26 (%70,3)'ünün sigara kullanmadığı, 11 (%29,7)'sinin ise sigara kullandığı tespit edildi. Sigara kullanımı açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu (p=0,051) (Tablo 2).

Mide kanserli hasta grubunda, G/G genotipi 16 (%34,8), G/C genotipi 21 (%45,7) ve C/C genotipi ise 9 (%19,6) olguda saptandı. Kontrol grubunda incelendiğinde, G/G genotipi 13 (%31), G/C genotipi 26 (%61,9) ve C/C genotipi ise 3 (%7,1) olguda bulundu. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında grupların dağılımları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 3).

Tablo 2. Survivin -31 G/C polimorfizmi açısından bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri

Özellikler		Kontrol (n=42)		Hasta (n= 46)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon		OR için %95 Güven Aralığı
		Sayı	%	Sayı	%		P	OR	
Cinsiyet	K	29	69	13	28,3	<0,001	0,199	0,009	0,059 - 0,673
	E (referans)	13	31	33	71,7				
Tümör Derecesi	Düşük	-	-	1	3,6	-	-	-	-
	Orta	-	-	15	53,6				
	Yüksek	-	-	12	42,9				
Tümör tipi	Adenokarsinom	-	-	35	81,4	-	-	-	-
	Karsinom	-	-	1	2,3				
	Taşlıyüzük	-	-	6	14				
	Epitelyel	-	-	1	2,3				
Sigara	Yok (referans)	26	70,3	22	48,9	0,051	-	-	-
	Var	11	29,7	23	51,1				

OR: Odds Oranı

Tablo 3. Survivin -31 G/C polimorfizmi açısından bireylerin genotip dağılımları

Genotip	Kontrol (n=42)		Hasta (n=46)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon		OR için %95 Güven Aralığı
	Sayı	%	Sayı	%		p	OR	
GG (referans)	13	31	16	34,8	0,16	-	-	-
GC	26	61,9	21	45,7		0,828	0,849	0,117-5,838
CC	3	7,1	9	19,6		1,52	0,507	0,442-5,231

OR: Odds Oranı

TARTIŞMA

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis sağlıklı organizmalarda görülen normal hücrel bir olaydır ve çok sayıda gen tarafından kontrol edilir. Apoptotik yolakta görev alan genlerin işlev kaybı ya da kazanımı hücrel hemeostazinin bozulmasına yol açarak kanser gibi hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olur. Yakın bir zaman önce bulunan survivin ise apoptozisi inhibe eden bir protein olup aynı zamanda hücre proliferasyonunda rol oynar. Yapılan araştırmalarda birçok kanser türünde survivin gen ifadesinin aşırı arttığı bulunmuştur. Buradan yola çıkarak survivinin, kanser mekanizmasında yer aldığı düşünülmektedir.¹⁷ Yapılan bu çalışmada bugüne kadar rapor edilmiş 5 survivin gen polimorfizminden en çok çalışılan olan -31 G/C polimorfizminin mide kanseri gelişimine etken olup olmadığı araştırılmıştır. Yaptığımız araştırma

sonucunda survivin geni -31 G/C polimorfizminin mide kanseri hastalarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamasına karşın, homozigot mutant alleli olan CC genotipine sahip bireylerin mide kanserine yakalanma riskinin homozigot GG alleleline sahip bireylere göre daha fazla risk oluşturduğu bulunmuştur (OR= 1,52). C alleli taşıyıcılığının mide kanserine yakalanma riskini önemli derecede arttırdığı gözlemlendi. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda homozigot C alleli taşıyıcılığının keratosistik odojenik tümör gelişiminde¹⁰ ve servikal karsinogeneze¹¹ yatkınlık oluşturmadığı bulunmasına rağmen, akciğer kanserinde,⁹ tiroid kanserinde (OR=1,7),¹¹ ürettelyel kanserinde (OR=4),¹² kolektal kanserinde (OR=2,73),¹³ mesane kanserinde (OR=2,61),¹⁴ ovaryum kanserinde,¹⁶ nazofaringal karsinomada (OR=1,4),¹⁸ renal hücreli karsinomlarda (OR=1,38)¹⁹ yatkınlık oluşturduğu bulunmuştur.

Bizim yaptığımız bu çalışmada survivin -31 G/C polimorfizminin mide kanserine yatkınlık oluşturduğunun bulunması sebebiyle literatürle uyumluluk göstermektedir. -31 G/C polimorfizmi, survivin geninin CDE/CHR bölgesinde olduğundan dolayı fonksiyonel olduğu düşünülmektedir. Ayrıca -31 G/C polimorfizminin survivin gen ifade düzeyini hem mRNA hem de protein seviyesinde arttırdığı yapılan araştırmalarda bulunmuştur. Bundan dolayı -31 G/C polimorfizmi birçok kanser türünde anlamlı sonuç vermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda Türk toplumunda mide kanseri ile survivin -31 G/C polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamış olmasına rağmen CC genotipinin hastalığa yatkınlık oluşturduğu düşünülebilir. Bu çalışma daha geniş vaka sayılı çalışmalar yapılarak desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Kelle İ, Kanser Tedavisinde Biyotoksinler. *Dicle Tıp Dergisi* 2007;34(3):226-32.
2. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer* 2009;125(5):666-73.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(1):69-90.
4. Tuncer AM. Türkiye’de Kanser Kontrolü. Ankara: Onur Matbaacılık, 2007.
5. Liu KJ, Qi HZ, Yao HL, et al. An updated meta-analysis of the p53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk, *Mol Biol Rep* 2012; 39(124):8265-75.
6. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gene polimorphism and genetic susceptibility to cancer. *Marmara Med J* 2008; 21(3):282-95.
7. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma, *Nat Med* 1997; 3(8):917-21.
8. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis, *Genes Dev* 1999; 13(3):239-52.
9. Jang JS, Kim KM, Kang KH, et al. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer*. 2008; 60(1):31-9.
10. Andric M, Nikolic N, Boskovic M, et al. Survivin gene promoter polymorphism -31G/C as a risk factor for keratocystic odontogenic tumor development, *Eur J Oral Sci* 2012; 120(1):9-13.
11. Yazdani N, Sayahpour FA, Haghpanah V, et al. Survivin gene polymorphism association with papillary thyroid carcinoma, *Pathol Res Pract*.2012; 15:208(2):100-3.
12. Wang YH, Chiou HY, Lin CT, et al. Association between survivin gene promoter -31 C/G polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population. *Urology* 2009; 73(5):670-4.
13. Gazouli M, Tzanakis N, Rallis G, et al. Survivin -31G/C promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(1):145-50.
14. Jaiswal PK, Goel A, Mandhani A, Mittal RD. Functional polymorphisms in promoter survivin gene and its association with susceptibility to bladder cancer in North Indian cohort. *Mol Biol Rep* 2012; 39(24):5615-21.
15. Borbely AA, Murvai M, Szarka K, et al. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2007; 60(2):303-306.
16. Han CH, Wei Q, Lu KK, Liu Z, Mills GB, Wang L. Polymorphisms in the survivin promoter are associated with age of onset of ovarian cancer. *Int J Exp Med* 2009; 2(2):289-299.
17. Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy, *Trends Mol Med* 2001; 7(4):542-7.
18. Ma F, Zhang H, Zhai Y, et al. Functional polymorphism -31C/G in the promoter of BIRC5 gene and risk of nasopharyngeal carcinoma among chinese, *PLoS One* 2011; 3:6:e16748.
19. Qin C, Cao Q, Li P, et al. Functional promoter -31G>C variant in survivin gene is associated with risk and progression of renal cell cancer in a Chinese population, *PLoS One* 2012;7:e28829.