



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2015; 29 (2): 75 - 78
http://www.fusabil.org

Kolorektal Kanserli Hastalarda DNMT3B Gen Polimorfizm Sıklığı*

Pelin TAŞDEMİR¹
H. Gül DURSUN²
Tevfik KÜÇÜKKARTALLAR³
Ayşe Gül ZAMANI¹

¹Necmettin Erbakan Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,
Konya, TÜRKİYE

²Necmettin Erbakan Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Konya, TÜRKİYE

³Necmettin Erbakan Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi,
Genel Cerrahi Anabilim Dalı,
Konya, TÜRKİYE

Amaç: Kolorektal kanser (KRK) genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak gelişebilen, dünyada en fazla karşılaşılan gastrointestinal tümörlerden biridir. Sigara, alkol, sağlıklı olmayan beslenme biçimi, kanserojenik ajanlara maruz kalma, düşük methionin ve folat alımı gibi nedenlerle kolorektal kanser gelişebilir. DNA metilasyonu, CpG dinükleotidinde yer alan sitozinin 5' bölgesine bir metil grubu eklenmesiyle oluşan bir epigenetik modifikasyondur. DNA hipometilasyonu onkogenleri aktive eder ve kromozom yapısının kararlılığını yitirmesine neden olurken, DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açar. DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından oluşturulur ve *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* olarak adlandırılan 3 enzim grubu tarafından düzenlenir. Bu çalışmada *DNMT3B* gen bölgesinde yer alan 3 polimorfik bölge incelenerek hastalığın patogenezi üzerinde etkili olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 98 kolorektal kanser hastası ile 96 sağlıklı kontrol olgusunda *DNMT3B* geninin rs2424913, rs1569686 ve rs2424908 olmak üzere üç tekli nükleotid değişimi (SNP) değerlendirildi ve genotipleme PCR-RFLP yöntemi ile gerçekleştirildi.

Bulgular: Çalışılan üç polimorfizmin genotip ve allel frekansları kolorektal kanser hastaları ve kontrol olguları arasında önemli bir farklılık göstermedi ($P>0.05$).

Sonuç: Elde edilen veriler *DNMT3B* geninin rs2424913, rs1569686 ve rs2424908 polimorfizmlerinin kolorektal kanser etyopatogenezi üzerinde primer bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, *DNMT3B* geni, polimorfizm

Frequency of DNMT3B Gene Polymorphisms in Patients with Colorectal Carcinoma

Objective: Colorectal cancer (CRC) is one of the most common gastrointestinal tumors depending on genetic and environmental factors. In addition, smoking, unhealthy diet habit and environmental carcinogenic agents are also the assumed risk factors of CRC, such as alcohol, low methionine, low folate diets. DNA methylation, a major epigenetic modification involving the addition of a methyl group to the 5' position of a cytosine in a CpG dinucleotide, maintains chromosomal stability and regulates gene expression and has been reported to play a significant role in the development and progression of various cancers. DNA methylation is typically mediated by DNA methyltransferases (DNMTs), specifically *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B*. In this study we aimed to investigate whether *DNMT3B* gene polymorphisms have any effect on the pathogenesis of colorectal cancer.

Materials and Methods: The study group consisted of 98 colorectal cancer patients and 96 healthy controls. Three SNPs of *DNMT3B* gene, rs2424913, rs1569686 and rs2424908 were genotyped by PCR-RFLP technique.

Results: When genotype and allele frequencies of three SNPs compared between patients and controls, p values ranged from 0.08 to 0.98.

Conclusions: The results of study show that rs2424913, rs1569686 and rs2424908 polymorphisms of *DNMT3B* gene have not a primer effect on pathogenesis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer, *DNMT3B* gene, polymorphism

Geliş Tarihi : 02.10.2015

Kabul Tarihi : 06.10.2015

Yazışma Adresi Correspondence

Pelin TAŞDEMİR
Necmettin Erbakan
Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Konya - TÜRKİYE

pelinvural@hotmail.com

Giriş

Kolorektal kanser, yılda 570.000 yeni vakayla tüm dünyada en fazla karşılaşılan gastrointestinal tümörlerden biridir (1). Sigara, alkol, sağlıklı olmayan beslenme biçimi, kanserojenik ajanlara maruz kalma, düşük methionin ve folat alımı gibi nedenlerle kolorektal kanser gelişebilir (2). DNA metilasyonu, CpG dinükleotidinde yer alan sitozinin 5' bölgesine bir metil grubu eklenmesiyle oluşan bir epigenetik modifikasyondur. DNA hipometilasyonu onkogenleri aktive eder ve kromozom yapısının kararlılığını yitirmesine neden olurken, DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açar (3). Pek çok çalışma (4, 5) sonucu tümör supresör genlerin promotor kolorektal kanser oluşumunda rol aldığını göstermiştir.

* Bu çalışma, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 131218009).

DNA metilasyonu genel kural olarak DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından oluşturulur ve *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* olarak adlandırılan 3 enzim grubu tarafından düzenlenir. *DNMT1*, maintenance metiltransferaz olarak da bilinir ve yarı metillenmiş DNA bölgelerine bağlanır. *DNMT3A* ve *DNMT3B*, de novo metiltransferazlar olarak adlandırılır ve yarı metillenmiş ve hiç metillenmemiş bölgelere bağlanarak metilasyonu gerçekleştirirler (6). *DNMT3B* geni 20q11.2 no'lu kromozomda yer alır ve pek çok polimorfik bölge içerir. Çalışmalar sonucunda promotor bölgede yer alan ve promotor bölgenin aktivitesi için son derece önemli olan 3 polimorfik bölgenin varlığını göstermiştir (7). *DNMT3B* genetik polimorfizminin tümör oluşumu açısından önemi birçok çalışma ile gösterilmiştir ancak değişik bölgelerde, farklı etnik gruplar ve ırklar açısından değerlendirme yapılması gerekliliği aşıkardır.

DNMT3B genetik polimorfizminin tümör oluşumundaki rolü ortaya çıkarılmış olsa da değişik ırk, bölge ve etnik gruplarda çalışılması gerekliliği göz önünde bulundurularak, Türkiye'de kolorektal kanserli hastalarda *DNMT3B* genetik polimorfizminin belirlenmesi için bu çalışma planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hastalar ve Kontrol Olguları: Çalışma bir vaka-kontrol çalışması olarak tasarlanmış olup 98 kolorektal kanser tanısı almış hasta ve 96 sağlıklı birey ile gerçekleştirilmiştir. Tanıları Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi bölümü tarafından konmuş olan hastalardan rutin amaçlarla alınmış olan kanlarının bir kısmı hastaların bilgilendirilmiş imzalı onam formları eşliğinde Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarına gönderildi. Hastaların değerlendirilmesi ve takipleri yine Meram Tıp Fakültesi'nde Genel Cerrahi Uzmanı tarafından gerçekleştirildi. Kontrol grubu ise yine N.Ü Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği'ne değişik nedenlerle başvuran kolorektal kanser tanısı almamış kişilerden seçildi. Hasta bilgi formu hazırlanarak hastanın yaşı, cinsiyeti, kanser aile öyküsü olup olmadığı, beslenme alışkanlıkları, sigara ve alkol kullanımı sorgulanarak kaydedildi. Sigara içen hastalar, 1 yıldan uzun süredir günde en az 1 adet sigara içen hastalar olarak tanımlandı. Sigara içmeyenler ise hayatı boyunca hiç kullanmamış olanlar ya da kan örneklerinin alındığı tarihten en az 1 yıl öncesinde kullanmayı bırakmış

hastalar olarak tanımlandı. Alkol alımı 30 g/gün olarak tanımlandı. Projenin etik kurul onayı "N.Ü Meram Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu"ndan 2012/120 karar sayısı ile alındı.

Kan Örnekleri ve DNA İzolasyonu: Hastalar ve kontrol grubundan 2 mL'lik EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri çalışmaya kadar +4°C'de saklandı. Genomik DNA SDS-proteinaz K yöntemiyle izole edildi.

DNMT3B Genotip Analizi: *DNMT3B* geninin rs2424913, rs1569686 ve rs2424908 polimorfizmlerinin genotipleme PCR-RFLP yöntemi ile gerçekleştirildi. Online Primer3web (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.html) veritabanı kullanılarak bir primer çifti tasarlandı. Reaksiyon karışımı 10.4-14.4 µL distile su, 1.6 µL MgCl₂ (25 mM), 10 pmol primer 1, 10 pmol primer 2, 4 pmol prob 1, 4 pmol prob 2, 2 µL reaksiyon master mix ve 2 µL genomik DNA (50-200 ng/mL) içermekteydi. Reaksiyon şartları 95°C'de 10 dk başlangıç denaturasyonu, ardından 45 döngü olmak üzere 95°C'de 10 sn hızlı denaturasyon, 62°C'de 10 sn annealing ve 72°C'de 15 sn extension şeklindeydi. 10 µL lik reaksiyon karışımı 37°C bir gece HaeIII endonükleaz enzimiyle muamele edilerek ve oluşan DNA fragmanları %5'lik agaroz jelde yürütüldü.

İstatistiksel Analiz: Hardy-Weinberg eşitliğini test etmek için beklenen genotip değerleri allel frekanslarından hesaplandı. Gözlenen genotip değerlerinden sapmalar ki-kare testi ile belirlendi. Genotip prevalansındaki farklılıklar ile genotip ve hastalık arasındaki ilişkiyi test etmek üzere SNPStats programı kullanıldı. Haplotip-hastalık arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla da Haploview 4.2 versiyonu uygulandı.

Bulgular

Çalışmada 98 kolorektal kanserli bireyden oluşan hasta grubunda kadın/erkek oranı (%48)/(%52), 96 bireyden oluşan kontrol grubunda ise (%46.9)/(%53.1) idi. Yaş ortalaması hasta grubunda 60.1±14.5 ve kontrol grubunda 52.4±13.6 şeklindeydi (Tablo 1).

Çalışılan üç polimorfizmin genotip ve allel frekansları kolorektal kanserli hastaları ve kontrol olguları arasında önemli bir farklılık göstermedi ($P>0.05$). Elde edilen veriler *DNMT3B* geninin rs2424913, rs1569686 ve rs2424908 polimorfizmlerinin kolorektal kanser etyopatogenezi üzerinde primer bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri

	Hasta	Kontrol	P
Toplam sayı (n)	98	96	
Kadın/Erkek (n)	47 (%48) / 51 (%52)	45 (%46.9) / 51 (%53.1)	0.880
Yaş (Ortalama±Standart sapma)	60.1±14.5	52.4±13.6	<0.001
Eşlik Eden Hastalık (Yok/Var)	54 (%55.1) / 44 (%44.9)	54 (%56.3) / 42 (%43.7)	0.872
Sigara kullanımı (Var/ Yok)	27 (%27.6) / 71 (%62.4)	43 (%44.8) / 53 (%55.2)	0.012
Alkol kullanımı (Var/Yok)	6 (%6.1) / 92 (%93.9)	13 (%17.7) / 79 (%82.3)	0.023
Beyaz toprak Maruziyeti (Var/Yok)	52 (%53.1) / 46 (%46.9)	48 (%50.5) / 47 (%49.5)	0.725

Tablo 2. Kolorektal kanserli (KRK) hastalarda ve kontrol olgularında *DNMT3B* gen polimorfizmlerinin genotip ve allel frekansları ve bu polimorfizmlerin kolorektal kanser ile ilişkisi

SNP	Genotipler	KRK, n (%)	Kontroller, n (%)	AOR (95% CI)	P değeri
Rs2424913	CC	35 (35.7)	32 (33.3)	Referans	Referans
	CT	45 (45.9)	52 (54.2)	0.511	0.225
	TT	18 (18.4)	12 (12.5)	0.936	0.929
	CT+TT	63 (64.3)	64 (66.7)	1.111	0.727
	Alel C	115 (58.7)	116 (60.4)	1.075	0.726
	T	81 (41.3)	76 (39.6)	(0.717-1.613)	
Rs1569686	TT	13 (13.3)	10 (10.4)	Referans	Referans
	TG	46 (46.9)	44 (45.8)	0.890	0.870
	GG	39 (39.8)	42 (43.8)	0.407	0.272
	TG+GG	85 (86.7)	86 (89.6)	1.315	0.695
	Alel T	72 (36.7)	64 (33.3)	0.861	0.482
	G	124 (63.3)	128 (66.7)	(0.567-1.307)	
Rs2424908	CC	58 (59.2)	62 (64.6)	Referans	Referans
	CT	26 (26.5)	29 (30.2)	1.013	0.981
	TT	14 (14.3)	5 (5.2)	8.394	0.087
	CT+TT	40 (40.8)	34 (35.4)	0.795	0.439
	Alel C	142	143	1.492	0.09
	T	54	39	(0.93-2.39)	

Tartışma

DNA metilasyonu memeli genomundaki en yaygın epigenetik modifikasyondur ve X kromozom inaktivasyonu, transkripsiyonel susturma, genomik imprinting, genomik stabilite ve gen ekspresyonu ile ilişkili kalıtılabilir epigenetik özellikleri temsil eder. Bununla birlikte hipermetilasyon ve hipometilasyon gibi DNA metilasyon paternleri bazı kanserlerin gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (8). *DNMT3B* embriyonik gelişimde ve karsinogenez sırasında anormal DNA metilasyonunda önemli role sahiptir (9). İlave olarak *DNMT3B* geni polimorfizmleri enzimatik aktivitesini etkileyebilir ve *DNMT3B* promotöründeki SNP'ler pekçok tümöre yatkınlıkla ilişkilendirilen de novo metilasyonda önemli rol oynar (10-12).

Bu çalışmada *DNMT3B* genine ait 3 bölgenin genotipleme yapılmış ve bu bölgelerin polimorfizminin kolorektal kanser riski ile ilişkili olup olmadığı değerlendirilmiştir. Mevcut çalışmada, çalışılan *DNMT3B* geni bölgelerinin polimorfizmi ile kolorektal kanser arasında bir ilişki saptanamamıştır. Hasta ve kontrol olguları her üç bölge için genotiplendirilmiş, genotip dağılımları kodominant, dominant, resesif ve overdominant genetik modellere göre değerlendirilmiş ve sonuç olarak hiç bir bölge hiçbir genetik modelde genotiplerin hastalık ile ilişki göstermediği bulunmuştur. Literatürde kolorektal kanser ile *DNMT3B* gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok makale vardır. Ancak bu 3 polimorfizm birlikte çalışılmamıştır.

Sık karşılaşılan bir polimorfizm olan rs2424913'ün özellikle *DNMT3B*'in promotör aktivitesini %30 oranında arttırdığı bilinmektedir (11, 13, 14). Bu durum, akciğer

kanseri (14), prostat kanseri (7), baş-boyun kanserleri (9) ve kolorektal kanser (13) riskini arttırmaktadır.

Bao ve ark. (13) kolorektal kanserle rs2424913 arasında ilişkili olmadığını ancak rs1569686'nın G alelinin kolorektal kanser açısından koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yine Iacopetta ve ark. (15) *DNMT3B* rs2424913'nin TT genotipinin proksimal kolon kanserleri açısından koruyucu etkiye sahipken distal ve rektal kanserler riski için herhangi bir ilişki tespit edememiştir. 2012 yılında yayınlanan bir meta analizde, rs2424913 polimorfizmi için yapılan 17 çalışmada (5229 vaka ve 6910 kontrol), CC + CT genotipini taşıyan bireylerin homozigot TT genotipini taşıyan bireylere göre kolorektal kanser riskinin arttığı gösterilememiştir. Yine aynı meta analizde rs1569686 polimorfizmi için yapılan 11 çalışmada (3513 vaka ve 3714 kontrol), G alelinin kolorektal kanser açısından koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (16). Bu sonuçlar bu çalışmayla uyumludur.

Bununla birlikte genetik polimorfizmler etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir. Türk toplumunda kolorektal kanserlerle ilişkili olduğu düşünülen pekçok polimorfizm çalışılmış ancak *DNMT3B* polimorfizmi ile ilgili hiçbir yayına rastlanmamıştır (17-21).

Sonuç olarak çalışmamızda *DNMT3B* geni ile kolorektal kanser arasında genotip düzeyinde bir ilişki bulunamamıştır. Bu açıdan *DNMT3B* geni kolorektal kanser etyopatogenezinde anahtar bir rol oynamıyor gibi görünmektedir. *DNMT3B* geninin kolorektal kanser etyopatogenezindeki rolünün tam olarak tanımlanabilmesi için gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerini değerlendiren ilave çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* 2007; 50: 131-150.
2. Linhart HG, Lin H, Yamada Y, et al. DNMT3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev* 2007; 21: 3110-3122.
3. Bheemanaik S, Reddy YV, Rao DN. Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases. *Biochem J* 2006; 399: 177-190.
4. Esteller M, Fraga MF, Guo M, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 3001-3007.
5. Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 2000; 910: 140-155.
6. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597-610.
7. Singal R, Das PM, Manoharan M, et al. Polymorphisms in the DNA methyltransferase 3b gene and prostate cancer risk. *Oncol Rep* 2005; 14: 569-573.
8. McCabe DC, Caudill MA. DNA methylation, genomic silencing, and links to nutrition and cancer. *Nutr Rev* 2005; 63: 183-195.
9. Wang J, Walsh G, Liu DD, et al. Expression of Delta *DNMT3B* variants and its association with promoter methylation of p16 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 8361-8366.
10. Sun MY, Yang XX, Xu WW, et al. Association of DNMT1 and DNMT3B polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese women from South China. *Genet Mol Res* 2012; 11: 4330-4341.
11. Montgomery KG, Liu MC, Eccles DM, et al. The DNMT3B C-T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: A case-control study. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 390-394.
12. Khorshied MM, El-Ghamrawy MK. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B -579G>T) promoter polymorphism and the susceptibility to pediatric immune thrombocytopenic purpura in Egypt. *Gene* 2012; 511: 34-37.
13. Bao Q, He B, Pan Y, et al. Genetic variation in the promoter of DNMT3B is associated with the risk of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 1107-1112.
14. Shen H, Wang L, Spitz MR, et al. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 4992-4995.
15. Iacopetta B, Heyworth J, Girschik J, et al. The MTHFR C677T and DNMT3 C-149T polymorphisms confer different risks for right- and left-sided colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009;125: 84-90.
16. Zhu S, Zhang H, Tang Y, et al. DNMT3B polymorphisms and cancer risk: A meta analysis of 24 case-control studies. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 4429-4437.
17. Ozen F, Sen M, Ozdemir O. Methylenetetrahydrofolate reductase gene germ-line C677T and A1298C SNPs are associated with colorectal cancer risk in the Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 7731-7735.
18. Yamak N, Yaykasli KO, Yilmaz U et al. Association between survivin gene polymorphisms and the susceptibility to colon cancer development in the Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 8963-8967.
19. Sari FM, Yanar HT, Ozhan G. Investigation of the functional single-nucleotide polymorphisms in the BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Biomed Rep* 2015; 3: 105-109.
20. Düzköylü Y, Arıkan S, Turan S, et al. Possible relationship between the resistin gene C-420G polymorphism and colorectal cancer in a Turkish population. *Turk J Gastroenterol* 2015; 26: 392-396.
21. Canbay E, Kahraman OT, Bugra D, et al. Association between PTEN IVS4 polymorphism and development of colorectal cancer in a Turkish population. *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17: 1-6.