

MESANE KANSERLİ OLGULARDA H-RAS PROTO-ONKOJEN POLİMORFİZMİ

POLYMORPHISM IN THE H-RAS PROTO-ONCOGENE IN CASES OF URINARY BLADDER CANCER

Şengül TURAL*, Sezgin GÜNEŞ*, Recep BÜYÜKALPELLİ**, Hasan BAĞCI*

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, SAMSUN

ABSTRACT

Introduction: Ras proteins play role in signal transduction, cell division and differentiation. Ras protein is encoded by a gene located at 11p15.5 in human. The purpose of this study was to investigate the possible association of H-ras proto-oncogene T/C single nucleotide polymorphism at nucleotide sequence 81 with bladder cancer in Turkish population.

Materials and Methods: We studied 59 patients with histologically verified bladder cancer and 74 healthy volunteers. The H-ras proto-oncogene polymorphism was determined by polymerase chain reaction based restriction fragment length polymorphism and agarose gel electrophoreses methods.

Results: Findings seem to indicate that there is no association between the H-ras polymorphism at codon 81 and bladder cancer (OR, 1.531; %95 CI, 0.69-3.42; P=0.26). Also there is no association between H-ras polymorphism and smoking, exposure to carcinogens and age.

Conclusion: The H-ras polymorphism does not seem to play a role in Bladder Cancer in Turkish population.

Key words: Bladder Cancer, H-ras proto-oncogene, single nucleotide polymorphism

ÖZET

Ras proteinleri hücre zarından sinyal iletiminin düzenlenmesi, hücre büyüme ve farklılaşmasında görev yapar. Ras proteini insanda 11p15.5'de yerleşmiş bir gen tarafından kodlanır. Çalışmamızda Harvey rat sarcoma proto-onkojeni 81. nükleotidinde bulunan T→C polimorfizmi ile mesane kanseri ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza histolojik tanıları konulmuş 59 mesane kanserli olgu ve 74 sağlıklı gönüllü birey katılmıştır. H-ras proto-onkojeni polimorfizmini saptamak için polimeraz zincir reaksiyonu tekniğine dayalı RFLP ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri kullanılmıştır.

Elli dokuz mesane kanserli olgu ve 74 sağlıklı kontrol bireyinden elde edilen sonuçlar H-ras polimorfizmi ile mesane kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir (OR, 1.531; %95 CI, 0.69-3.42; p=0.26). Ayrıca, H-ras 81T/C polimorfizmi ile sigara kullanımı, karsinojenlere maruz kalma ve yaş arasında anlamlı olan bir ilişki görülmedi.

Bulgularımız, H-ras polimorfizminin Türk toplumunda mesane kanserine yatkınlıkta önemli bir rolü olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mesane kanseri, H-ras proto-onkojeni, tek nükleotid polimorfizmi

GİRİŞ

Mesane kanseri, kanser sıralamasında 6. sırada yer almakta ve erkeklerde kadınlara oranla 4 kat daha fazla görülmektedir¹⁻³.

Mesane kanseri gelişiminde, bazı tümör basıkılayıcı genler (p53⁴⁻⁶, Rb⁷⁻¹⁰, p21, p16), kromozom 9 delesyonları¹¹⁻¹⁴ ve bazı onkojenler (c-erb-B2 (HER-2/neu)^{15,16}, H-ras)^{17,18} önemli rol oynamaktadır¹⁹. Mesane kanseri etiyojisinde çevresel faktörlerin rolünü gösteren birçok epidemiyolojik çalışma yapılmıştır¹⁹.

189 amino asitlik, 21-kDa'luk bir protein kodlayan *Ras gen ailesi*, hücre zarından sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alır. İnsan tümörlerinin %30'unda Ras iletim yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur²⁰. Ras bir proto-onkojendir. Ras proteinlerinin aktif hale geçebilmesi için hücre zarına yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif Ras-GDP konformasyonunda bulunur²¹. Hücrenin uyarılması ile fosforilasyon sonucu aktif Ras-GTP konformasyonuna dönüşür. GDP yerine GTP bağlanarak aktif Ras-GTP konformasyonuna dönüşür. Ras aktivasyonu

Dergiye Geliş Tarihi: 18.09.2005

Yayına Kabul Tarihi: 06.02.2006

dönüşümlüdür²¹. Mutant Ras proteinleri, aktif Ras-GTP formunda kalır ve hücre bölünmesi için sürekli sinyal üretmek kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur. H-ras, K-ras ve N-ras genleri 1. ekzonun 12. ve 13. kodonlarında, 2. ekzonun da 61. kodonunda tek nükleotid değişikliği ile bir onkojene dönüşebilir²².

Bu çalışmada, Harvey rat sarcoma (H-ras) proto-onkogeninin, 1. ekzonunun 27. kodondaki 81 T→C tek nükleotid polimorfizminin mesane kanseri ile ilişkisi bir olgu-kontrol çalışmasında araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Şubat 2004-Aralık 2004 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Servisi'nde mesane tümörü tanısı konularak tedavi uygulanmakta olan 59 olgu (53 erkek, 6 kadın; ortalama yaş 65.32±1.23, medyan 67) ile ailesinde ve kendisinde mesane tümörü olmayan 74 sağlıklı gönüllü birey (54 erkek, 20 kadın; ortalama yaş 63.73±1.18, medyan 63) kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

Patoloji sonuçları UICC (*International Union Against Cancer*)'nin 2002 yılında kabul ettiği, TNM (*Tumor, Node, Metastases*) sınıflandırılmasına göre yapıldı²². Araştırmaya katılan 59 mesane kanserli olgunun üçünün patoloji sonucuna ulaşamadı. 59 mesane kanserli olguda, 11 (%19.6) birey G1, 23 (%41.1) birey G2, 22(%39.3) birey de G3 ve daha ileri dereceli, 5 (%8.9) birey Ta, 21 (%37.5) birey T1, 30 (%53.6) birey de T2 ve daha ileri evreli olarak saptandı.

Hasta ve kontrol bireylerinden uygun bilgilendirme işleminin ardından 5-10 ml venöz kan EDTA'lı tüplere alındı. DNA tuz çöktürme yöntemi kullanılarak elde edildi²³. DNA örnekleri çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.

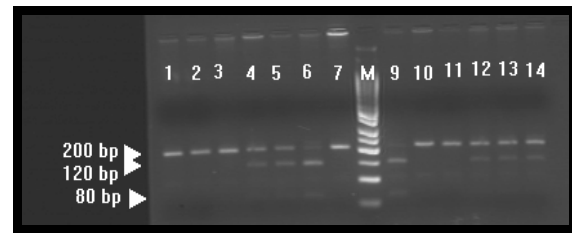
Moleküler Analiz: H-ras proto-onkogeni 81. nükleotid T→C polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ve Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) yöntemleri kullanılarak belirlendi. H-ras proto-onkogeninin 1. ekzonun 200 bç'lik bölgesi 5'-CTT GGC AGG TGG GGC AGG AGA-3' (Forward) ve 5'-CTA GCG CCG CCG TCC AGG TGC C-3' (Reverse) primerleri (İontek, Türkiye) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. PCR, 25µl'lik re-

aksiyon hacminde, 1xPCR tamponu, 4.5 mM MgCl₂, 200mM dNTP (MBI Fermentas, Litvanya), her primerden 500 mol/2µl, %7.5'luk dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, Almanya), 100 ng genomik DNA ve 1.25 U Taq DNA polimeraz (Promega, USA) kullanılarak Thermal Cycler'da (Techne Gradient, Cambridge, UK) yapıldı. Taq DNA polimeraz başlangıç denaturasyonundan sonra "Hot Start" olarak ilave edildi. PCR şartları; 95°C'de 3 dakika başlangıç denaturasyonu, 38 döngü; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 10 saniye hibridizasyon, 72°C'da 1 dakika sentez ve 72°C'de 10 dakika son sentez şeklinde gerçekleştirildi. On µl PCR ürünü, 5 ünite *Dra*III (MBI Fermentas, Litvanya) restriksiyon enzimi ile 37°C'de 16 saat inkübe edilerek kesildi. RFLP ürünleri %3'lük agaroz jele yüklenerek yürütüldü. Jel görüntüleme sistemi (Wilber Lourmat, Fransa) kullanılarak genotipler belirlendi. 200 bç'lik PCR ürünleri T/T genotipi; 200 bç, 120 bç ve 80 bç'lik PCR ürünleri T/C genotipi, 120 bç ve 80 bç'lik PCR ürünleri C/C genotipi olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analiz: H-ras proto-onkogeni polimorfizmi ile mesane tümörü arasındaki ilişki ki-kare testi ve %95'lik Güven Aralığında (Confidence Interval, CI) Odds Oranı (Odds Ratio, OR) hesaplanarak değerlendirildi. Alellerin her birinin gen frekansları bulunarak çalışılan popülasyonun denge durumu Hardy-Weinberg ve ki-kare testleri ile belirlendi.

BULGULAR

H-ras proto-onkogeninin 81. kodon T→C polimorfizmine ait elektroforez örnekleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Ras geni 81T→C bölgesinde *Dra*III restriksiyon enzimi ile tanımlanan polimorfik aleller. 1, 2, 3, 7, 10 ve 11 no'lu kuyulardaki ampliconların genotipi TT; 4, 5, 12, 13 ve 14 no'lu kuyulardaki ampliconların genotipi CT; 6 ve 9 no'lu kuyulardaki ampliconların genotipi CC. M; 100 bç marker (DNA Ladder MBI, Fermentas).

Araştırmaya katılan 59 mesane kanserli hasta-
da T/T genotipi oranı %64.4, T/C genotipi oranı %

30.5 ve C/C genotipi oranı %5.1 olarak bulundu. Kontrollerde ise T/T genotipi oranı %54.1, T/C genotipi oranı %39.2 ve C/C genotipi oranı %6.8 olarak bulundu. Genotipler her iki grupta Hardy-Weinberg dengesindedir (Tablo 1 ve 2).

Tablo 1. Araştırmaya katılan mesane kanserli hastalarda genotiplerin frekansları

Genotipler	Gözlenen Frekanslar (%) (n=59)	Beklenen Frekanslar (%)	Ki-kare
T/T	38 (64.4)	37.76	0.339
T/C	18 (30.5)	19.82	
C/C	3 (5.1)	2.36	

Tablo 2. Araştırmaya katılan mesane kanserli hastaların kontrollerinde genotiplerin frekansları

Genotipler	Gözlenen Frekanslar (%) (n=74)	Beklenen Frekanslar (%)	Ki-kare
T/T	40 (54.1)	39.96	0.134
T/C	29 (39.2)	28.50	
C/C	5 (6.7)	5.08	

Mesane kanserli hastalarda T alelinin gen frekansı 0.80, C alelinin gen frekansı 0.20; sağlıklı bi-

reylerde ise T alelinin frekansı 0.74, C alelinin frekansı 0.26 olarak bulundu. Genotipleme sonuçlarına göre mesane kanserli hastaların ve sağlıklı bireylerin *H-ras* geni 81.nükleotid polimorfizmi genotip ve alel frekansları Tablo 3’de görülmektedir. *H-ras* proto-onkogen polimorfizmi ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Mesane kanserli hastalar ve kontroller arasında *H-ras* geni 81.nükleotid polimorfizminin sigara kullanımı ve yaş grubuna ait demografik verileri ise Tablo 4’te görülmektedir.

TARTIŞMA

H-ras geni sinyal iletimi ve hücre çoğalmasındaki rolü nedeniyle mesane kanserine yatkınlık yönünden aday genler arasındadır. Bu olgu-kontrol çalışması *H-ras* geni 81T→C polimorfizmi ile mesane kanseri arasında bir ilişki göstermemiştir.

H-ras geninde 81. nükleotid tek nükleotid değişikliği ile mesane kanseri riskini belirlemeye yönelik olarak John²⁴ ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada 312 mesane kanserli hasta, 254 hastane kontrol grubu ve 106 sağlıklı gönüllüden oluşan ikinci bir kontrol grubu analiz edilmiştir.

Tablo 3. Genotipleme sonuçlarına göre mesane kanserli hastaların ve sağlıklı bireylerin *H-ras* geni 81. nükleotid polimorfizmi genotip ve alel frekansları

H-ras 81 T/C Genotipleri	Mesane Kanserli Hastalar (%) (n=59)	Kontroller (%) (n=74)	OR (%95 CI)	p
T/T	38 (64.4)	40 (54.1)	1.00	
C/T	18 (30.5)	29 (39.2)	1.531 (0.69-3.42)	0.26
C/C	3 (5.1)	5 (6.7)	1.583 (0.30-7.09)	0.41
Alel Frekansı	T	0.80	0.74	
	C	0.20	0.26	

Tablo 4. Mesane kanserli hastalar ve kontroller arasında *H-ras* geni 81. nükleotid polimorfizminin sigara kullanımı ve yaş grubuna ait demografik veriler

Demografik veriler	H-ras Genotipleri	Mesane Kanserli Hastalar (%) (n=59)	Kontroller (%) (n=74)	OR (%95 CI)
≤ 65 yaş	TT	15 (25.4)	25 (33.8)	1.00
	CT+CC	12 (20.3)	20 (27.0)	1.00 (0.38-2.61)
>65 yaş	TT	23 (39.0)	15 (20.3)	1.00
	CT+CC	9 (15.3)	14 (18.9)	2.38 (0.83-6.89)
Sigara kullanan	TT	31 (52.5)	20 (28.6)	1.00
	CT+CC	19 (32.2)	22 (31.4)	1.8 (0.78-4.12)
Sigara kullanmayan	TT	7 (11.9)	17 (24.3)	1.00
	CT+CC	2 (3.4)	11 (15.7)	2.26 (0.32-2.03)

*4 kontrol bireyinin sigara kullanım bilgilerine ulaşılamadığı için değerlendirilmeye alınmamıştır.

Çalışmada mesane kanserli hastalarda CC genotip frekansının (%13.5) kontrol grubuna (%7.1) göre daha yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ve mesane kanserli hastalar arasında görülen bu farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır (OR, 2.04; %95 CI, 1.15-3.61; p=0.014). İkinci kontrol grubu olan sağlıklı gönüllülerle yapılan karşılaştırmada elde edilen sonuçlar aynı eğilimi göstermektedir (OR, 1.91; %95 CI, 0.87-4.16). Elde edilen bu sonuçların yanında, histopatolojik sonuçlara bakıldığında, CC genotip frekansının yüksek dereceli histopatoloji sonuçları olanlarda daha yüksek oranda olduğu görülmüştür (G1: %11.8, G2: %11.7, ≥G3: %14.5, Ta: %6.4, Tis: %50, T1: %14.4, ≥T2: %16.8)²⁰.

Çalışmamızda 59 mesane kanserli hasta ve 74 kontrol DNA'sının RFLP analizi sonucunda mesane kanserli hastaların %5.1'inde CC, %30.5'inde TC ve %64.4'ünde TT; kontrol grubundaki bireylerin %6.7'sinde CC, %39.2'sinde TC ve %54.1'inde TT genotipleri belirlendi. CC genotip frekansı Johne ve arkadaşlarının bulgularının aksine kontrol grubumuzda daha yüksek (CC genotip frekansı mesane kanserli hastalarda %5.1, kontrol grubunda %6.7) görüldü⁽²⁴⁾. H-ras proto-onkojeni 81 T→C polimorfizmi TT genotip frekansının mesane kanserli hastalarda %64.4, kontrollerde ise %54.1 olarak bulunmuştur. TT genotipi frekans bulgularımız da Johne ve arkadaşlarının bulgularıyla çelişmektedir²⁴. Bu durum hasta ve kontrol grubumuzun sayısının azlığıyla ilgili olabileceği gibi ilgili polimorfizmin etnik farklılıklar göstermesinden de kaynaklanabilir. Çalışma grubu ve kontrol grubu arasındaki kadın erkek oranları sonuçlar arasındaki farklılığın nedeni olabilir. Johne ve arkadaşları CC genotipi ve erken yaş (<65), kadın mesane kanserli hastalar, yılda 20 paketten fazla sigara kullananlar ve mesleki karsinogenlerle karşı karşıya kalanlar arasında anlamlı derecede ilişki gözlemiştir²⁴. Bizim çalışmamızda ise, H-ras 81T/C polimorfizmi ile yaş, sigara kullanımı ve karsinogenlere maruz kalma arasında istatistiksel anlamı olan ilişki görülmedi.

Sanyal ve arkadaşları, 302 mesane kanserli olgu ve 121 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada H-ras geni 81 T→C polimorfizmi ile mesane kanseri arasındaki ilişkiyi çalışmıştır. Johne ve arkadaşlarının aksine istatistiksel olarak anlamsız olmakla birlikte CC alelinin mesane kanseri riskini azalttığını bildirmişlerdir (OR, 0.12; %95 CI, 0.02-

0.67; p=0.006). Bulgularımız, Sanyal ve arkadaşlarının bulgularıyla paralellik göstermektedir²⁵.

SONUÇ

Çalışmamız sonunda, H-ras proto-onkojeni 1. ekzonunda yer alan 81 T→C polimorfizmi mesane kanseri riskini 1.5 kat arttırmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

- 1- **Landman J and Droller M:** Risk factors in clonal development from superficial to invasive bladder cancer. *Cancer Surveys* 31: 5-15, 1998.
- 2- **Sourvinors G, Kazanis I, Demetrios D, et al:** Genetic detection of bladder cancer by microsatellite analysis of p16, Rb1 and p53 tumor suppressors' genes. *J Urol.*165: 249-252, 2001.
- 3- **Sanchez Carbayo M:** Use of high-throughput DNA microarrays to identify Biomarkers for bladder cancer. *Clinical Chemistry* 49: 23-31, 2003.
- 4- **Habuchi T, Ogawa O, Kakeni Y, et al:** Allelic loss of chromosome 17p in urothelial cancer: Strong association with invasive phenotype. *J Urol.* 148: 1595-1599, 1992.
- 5- **Esrig D, Elmanjian D, Groshen S:** Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J. Med.* 331: 1259-1264, 1994.
- 6- **Sarkis S, Bajorin DF, Reuter VE, et al:** Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol.* 13: 1384-1390, 1995.
- 7- **Cordon-Cardo C, Waetinger D, Petrylak D:** Altered expression of the retinoblastoma gene product: Prognosis indicator in bladder cancer. *J The Nat Cancer Inst.* 84: 1251-1256, 1992.
- 8- **Xu HJ, Cairns P, Hu SX:** Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer* 53: 781-784, 1993.
- 9- **Grossman HB, Liebert M, Antelo M, et al:** P53 and Rb expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 4: 829-834, 1998.
- 10- **Cote RJ, Esrig D, Groshen S, et al:** P53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 384: 123-124, 1997.
- 11- **Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, et al:** Allelic losses of chromosome 9, 11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.* 50: 44-47, 1990.
- 12- **Keen AJ, Knowles MA:** Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of bladder. *Oncogene* 9: 2083-2088, 1994.
- 13- **Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al:** A cell cycle regulator potentially involved in the genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994.
- 14- **Wu Q, Posatti L, Montesi M, et al:** Growth arrest and suppression of tumorigenicity of bladder-carcinoma cell lines induced by the p16/CDKN2 (p16INK4A, MTS1) gene and other loci on human chromosome 9. *Int J Cancer.* 65: 840-846, 1996.
- 15- **Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, et al:** Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell

- carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 63: 601-608, 1991.
- 16- **Mellon JK, Lunec J, Wright C, et al:** C-erb B-2 in bladder cancer: Molecular biology, clinical correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol.* 155: 321-326, 1996.
- 17- **Czerniak B, Deitch D, Simmons H, et al:** Ha-ras gene codon 12 mutation and DNA ploidy in urinary bladder carcinoma. *Br J Cancer* 62: 762-763, 1990.
- 18- **Fontana D, Bellina M, Scoffone C, et al:** Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. *Eur Urol.* 29: 470-476, 1996.
- 19- **Jung MD and Messing E:** Molecular mechanisms and pathways in Bladder Cancer development and progression. *Cancer Control* 7: 325-334, 2000.
- 20- **Adjei AA:** Blocking oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *J The Nat Cancer Inst.* 93: 1062-1073, 2001.
- 21- **Campbell PM, Der CJ:** Onkogenic ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 14: 105-114, 2004.
- 22- **Przybojewska B, Jagiello A and Jalmuzna P:** H-ras, K-ras, and N-ras Gene Activation in Human Bladder Cancers. *Cancer Genet and Cytogenet.* 121:73-77, 2000.
- 23- **Miller SA, Dykes DD, Polsky HF:** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nul Acid Res.* 16: 12-215, 1988.
- 24- **Johne A, Roots I, Brockmöller J:** A single nucleotide polymorphism in the human H-ras proto-onkogene determines the risk of urinary bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12: 68-70, 2003.
- 25- **Sanyal S, Festa F, Sakano S, et al:** Polymorphisms in DNA repair and bladder cancer. *Carcinogenesis* 25: 729-734, 2004.