

Hepatoselluler Karsinomada p53 KODON 249Ser Mutasyonu ve H8V ile Assosiasyonu

Doç.Dr.Nejat AKAR, Prof.Dr.Şükrü ÇİN, Dr.Ece AKAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Klinik Moleküler Patoloji BD, ANKARA

p53 geni hücre differansiasyonunu etkilemesi ile tümör baskılayıcı gibi etki gösteren bir gen olup, 17. kromozomun kısa kolunda (p13) yer almaktadır.

Bu gen, hücre proliferasyonunun kontrolunda rol oynayan 53 kd'lik bir nükleerfosfoproteini kodlamaktadır. p53 genindeki akkız mutasyonlar, en sık görülen tümör spesifik genetik değişikliklerdir ve birçok kanser tipinde yayınlanmıştır (ÜstEOSarkoma, meningoma, kolon, akciğer, myelodisplastik sendrom, över ve hepatoselluler karsinoma gibi). Bunların yanı sıra, nadir bir ailevi kanser sendromu olan L-Fraumeni sendromunda da p53 genine özgü mutasyonlar tanımlanmıştır. Toplam 11 eksonu olan p53 geninin belirli bölgelerinde, özellikle de 5-8. eksonlarında mutasyonlar en sık olarak gözlenmektedir (1). Pediatrik yaş grubunda nadir olarak görülen Hepatoselluler karsinoma'da (HCC) özellikle 7. eksonda kodon 249'da AGG (Arginine) dizisinin AGT'ye (Serine) değişimi söz konusudur. Bu değişimin, özellikle dietlerinde aflatoksin kontaminasyonu olan bölgelerde (özellikle Afrika) gözlenmiştir. Ancak HCC etyolojisinde Hepatitis B virüsünün da (HBV) rolü olduğu bilinmektedir. Türk dietinde aflatoksin düzeyi düşük ancak HBV prevalansı yüksek olarak bilinmektedir. Bugüne kadar toplam 12 Türk erişkin olguda yapılan incelemelerde bu mutasyona rastlanmamıştır (2-6).

Biz bu araştırmamızda HCC tanısı almış, üçü çocuk toplam beşe olguda HBV birlikteliğini ve p53 kodon 249 mutasyonunun olup olmadığını araştırdık.

MATERYEL VE METODLAR

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı Klinik Moleküler Patoloji Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma histopatolojik olarak HCC tanısı almış olan beş olgunun tümör dokularında gerçekleştirilmiştir.

Geliş Tarihi: 19.01.1993

Kabul Tarihi: 11.05.1993

Yazışma Adresi: Dr. Nejat AKAR

Yarış Sokak 11/4

06590 Cebeci/ANKARA

DNA, tümör dokusundan ve parafin bloklardan fenolkloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu ile elde edilmiştir. p53 geninin 7. eksonu içine alacak şekilde iki primer seti (F3:5';GTTGGCTCTGACTGTACCAC-3'; R3:5'CTGGAGTCTTCCAGTGTGAT-3') kullanılarak; dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Taq DNA Polimeraz (Promega) ve 100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, %0.01 Gelatin ile polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR, 94°C'de 90sn.;55°C'de 150 sn.;72°C'de 3dk. olacak şekilde 30 siklusta yapılmıştır, ilk siklusta denatürasyon 94°C'de 7dk ve son siklustan sonra 72°C'de 5dk olarak tamamlanmıştır (COY, A.B.D). PCR ürününe %6'lık Poliakrilamid gel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. PCR sonrası 110 bazlık olan PCR ürünü HaellI restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilmiştir. Bu bölge kodon 249'da HaellI kesim noktası taşımaktadır ve PCR ürünü HaellI ile kesildiğinde 75 ve 35 bazlık iki parçaya ayrılmaktadır. Mutasyon olması halinde ise HaellI kesim noktası ortadan kalktığından 110 bazlık kesilmemiş bir parça görülecektir (Şekil 1).

HBV, iki primer seti kullanılarak (HBVi: 5'-CAG CGG TAT AAA GGG ACT CAC G-3'; HBV2: 5'-TGG TGG CTC CAG TTC AGG A-3'); 94°C'de 60sn.; 55°C'de 120 sn.; 72°C'de 3dk. olacak şekilde 30 siklusta yapılmıştır, ilk siklusta denatürasyon 94°C'de 5dk ve son siklustan sonra 72°C'de 5 dk olarak tamamlanmıştır. (COY, A.B.D). Elde edilen PCR ürününün uzunluğu 699 bazdır. Pozitif virüs örneklerinin PCR ürününün uzunluğu 699 bazdır. Pozitif virüs örneklerinin PCR bölgesi HaellI ile kesilerek, nonspesifik PCR ürünleri yönünden denetlenmiştir. HB V-PCR', iki kez tekrarlanmıştır (Şekil 2a, 2b). PCR ürünleri %1'lik agar gel elektroforezinde kontrol edilmiştir.

SONUÇLAR

Çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

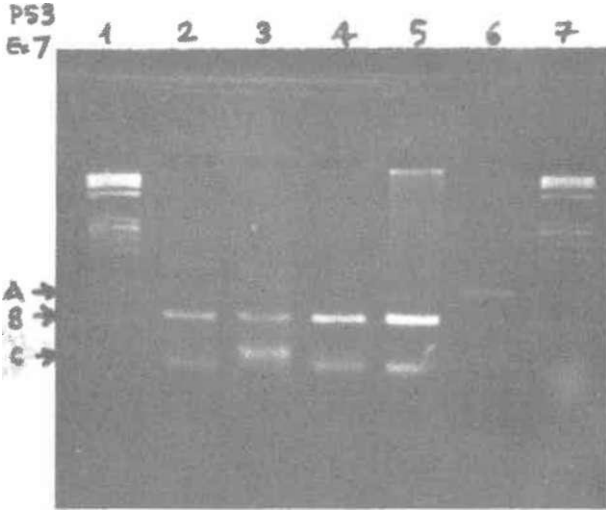
Primer karaciğer kanserlerinin en yaygın formu hepatoselluler karsinoma olup p53 geninde mutasyonlar sık olarak bulunmaktadır. Tümöre özgü p53 mutasyonlar, hücredeki büyüme düzenleyici fonksiyonları

olan p53 proteinin hatalı sentezin© yol açarlar. HCC'de p53 proteinin hatalı sentezine yol açarlar. HCC'de p53 geninin 1.eksondaki, kodon 249'da ortaya çıkan (Arg)-(Ser) değişiminin sıklıkla olduğu belirlenmiştir (2-6).

Değişik ülkelerden toplanan örneklerde, bu mutasyonun varlığı araştırılmıştır. HCG etyofojisinde HBV ve aflatoksinin rolü olduğu üzerinde durulmaktadır (3,6). Bu mutasyonel özgünlük, özgül (spesifik) karsinojenler için karşı karşıya kalmayı yansıtabilir (2-3).

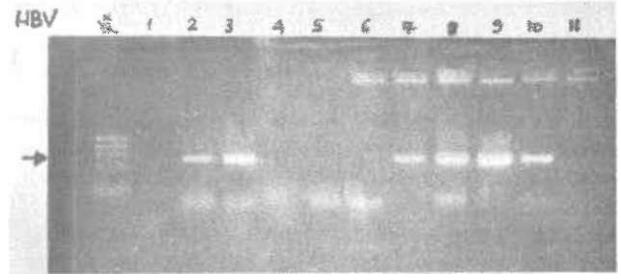
Öztürk ve arkadaşları, 167 olgudan 12 tanesinde bu mutasyonu belirlemişlerdir. Bu olguların tümü Afrika ve Güneydoğu Asya (Çin) ülke kökenlidir. Kuzey Amerika, Avrupa, Ortadoğu ve Japonya örneklerinde bu mutasyonu belirleyememişlerdir (4). Hayvvard ve arkadaşları ise 16 Avustralyalı olgudan hiçbirinde bu mutasyona rastlamamışlardır (5). Patel ve arkadaşları ise, inceledikleri İngiltere kökenli 17 olgudan birinde; düşük aflatoksinli bölgelerden gelen 30 olgudan birinde; Afrika kökenli 8 olgudan ikisinde bu mutasyonu saptamışlardır (6).

Bu üç çalışmanın sonuçları birbirlerine karşıt sonuçlar taşımaktadır. Çünkü Öztürk ve arkadaşları, aflatoksinin yoğun olduğu bölgelerde bu mutasyonu bulduklarını ileri sürerken Hayvvard ve arkadaşları ise aflatoksinin yüksek oranda bulunduğu bölgelerde bu mutasyona rastlamamışlardır. Patel ve ark. ise her iki grupta da bu mutasyonu belirlemişlerdir (3-6).



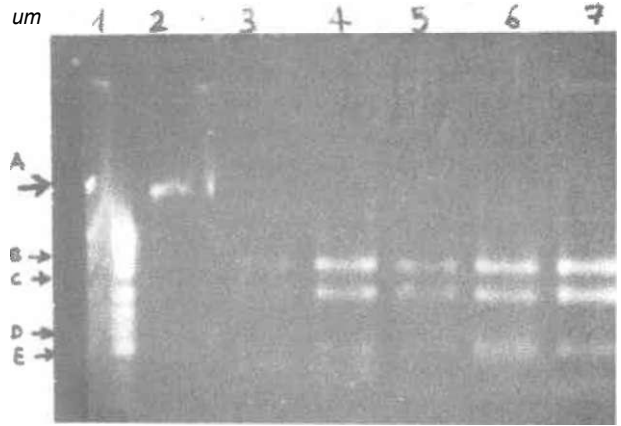
Şekil 1. p53 geni exon 7'nin PCR ürününün Hae III restriksiyon endonükleaz ile kesimi ile elde edilen sonuçlar (%4'lük Agar gel elektroforezi)(%1 NuSieve Agar)

- Sıra 1 ve 7 : OX 174/Hae III ile kesilmiş (Marker)
 Sıra 2 : Normal bir kişide PCR ürününün Hae III enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan 75 ve 35 bazlık parçalar (B ve C)
 Sıra 3-5 Hepatosellüler karsinoma tümör dokularında PCR ürününün Hae III enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan 75 ve 35 bazlık parçalar (B ve C)
 Sıra 6 Hae III enzimi ile kesilmemiş 110 bazlık PCR ürünü (A)



Şekil 2A, Hepatitis B virüs PCR ürünü sonuçları (%1'lik Agar Gel Elektroforezi)

- SıraOX : OX xi74/Hae III ile kesilmiş (Marker)
 Sıra 1 : Hepatit B virüs negatif örnek
 Sıra4-6 : Hepatit B virüs negatif doku örnekleri
 Sıra 2-3 : Hepatit B virüs pozitif hepatosellüler karsinoma örnekleri
 Sıra 7-10 : Hepatit B virüs pozitif hepatit örnek
 Sıra 11 : Negatif kontrol (PCR kontrolü için)



Şekil 2B. Hepatitis B virüs pozitif PCR örneklerinin Hae III enzimi ile kesilerek elde edilen nonspesifik PCR ürünleri yönünden denetlenmesi (%1'lik Agar Gel Elektroforezi)

- Sıra1 : OX 174/Hae III ile kesilmiş (Marker)
 Sıra2 : Hepatit B virüs Hae III ile kesilmemiş PCR ürünü (A)
 Sıra3-7 : Hepatit B virüsü Hae III ile kesilmiş PCR ürünü (B,C,D,E)

Aflatoksin B1, besinlerde kontaminant olarak bulunur. Hedef nükleotitlerde sıklıkla G-T değişimine yol açar ve hayvanlarda potent bir hepatokarsinojendir (3). CD 249'da gözlenen mutasyon da bir G-T değişimidir. Daha önce yapılan çalışmalar ile bu bilgiler birlikte düşünüldüğünde; bu mutasyonun HBV ile oluşturulmadığını ileri sürülebilir.

Aflatoksin alımı yanı sıra, HCC indüklemesi için enfeksiyon da gerekli olabilir (7). Bunların dışında bir başka oksidatif DNA hasarı ile G-T değişikliğine yol açabilecek alternatif mutajon varlığı da ileri sürülmüştür (6).

İki ayrı çalışmada incelenen HCC'li 12 Türk olguda p53 mutasyonuna rastlanmamıştır (4,6). Türk

Tablo 1. Hepatoselluler karsinomada p53 Kodon 249Ser mutasyonu ve HBV ile assosiyasyonu

Olgu	Örnek	HBV	CD 249
1-	Tümör dokusu		(-)
2	Parafin blok	0)	(-)
3-	Tümör dokusu	(-)	(-)
4-	Parafin blok	M	(-)
5-	Parafin blok	W	(-)

dietinde aflatoksin miktarı düşük düzeyde olup; HBV prevalansı ise; %1-5 arasında değişim gösterir (4).

Biz bu çalışmamızda incelediğimiz 5 olguda p53 kodon 249Ser mutasyonunu belirleyemedik. Bu olgulardan HBV yönünden incelenen beş olgudan dördünde pozitif olarak belirlenmiştir, Türk toplumunda incelenen olgu sayısı böylece 17'ye çıkmış olmaktadır,

Aflatoksin'in p53 geninde spesifik mutasyonların oluşmasındaki rolü ve HBV enfeksiyonunun bu baz değişikliğine tek başına katkısının olup olmadığı hipotezini belirleyebilmek için daha fazla sayıda tümör örneklerinde çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Malkin D, Li FP, Strong LC, Prauneni JF, Nelson CE, I DH, Kassel j, Qryka AM, Bischoff FZ, Tainsky MA, Fm SH. Germ Line p63 Mutations in a familial Syndrome Breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Sc»* 1990; 250:1233-8,
- Hsu iC, Metealf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris O Mutational hotspot in the p53 gene In human hepatocelli carcinomas. *Nature* 1991; 350:427-8.
- Bressac B, Kow M Wands J, Öztürk M, Selective G to C mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma fr southern Africa. *Nature* 1991; 350:429-30.
- Öztürk M and coll. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991; 338:1356.
- Hayward NK, Walker GJ, Graham W, Cookstey E. Hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Nature* 1991; 352:764.
- Patei P, Stephenson J, Scheuer PJ, Francis GE. p53 codon 249 ser mutations in hepatocellular carcinoma patients with low aflatoxin exposure. *Lancet* 1992; 339:881.
- Stagie BL, Zhou Y, Bute) JS. Hepatitis B Virus Integration Event in Human Chromosome 17p Near the p53 Gene Identifies the Region of the Chromosome commonly deleted in virus-positive hepatocellular carcinomas. *Cancer Research* 1991; 51:49-54.