

Batı Anadolu populasyonunda XRCC1 DNA tamir genindeki A399G polimorfizm sıklığının araştırılması

The Frequency of XRCC1 DNA Repair Gene A399G Polymorphism In The Western Anatolia

Tuğçe SEVER^{1,3}, Sacide PEHLİVAN¹⁻³

¹ Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

² Genetik Hastalıkları Araştırma ve Uygulama Merkezi

³ Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Özet

Bu çalışmanın amacı; sağlıklı Batı Anadolu populasyonunda XRCC1 geninin kodon 399 bölgesindeki polimorfizm sıklığını belirlemektir. İzmir’de yaşayan ve kanser öyküsü olmayan 100 kişilik kontrol grubunda, PCR-RFLP yöntemi (Msp I Restriksiyon Endonukleaz Enzimi) kullanılarak XRCC1-399 polimorfizmi araştırılmıştır. Analizler sonucunda A/A genotipini taşıyanların sıklığı %44.0, A/G genotipini taşıyanların sıklığı %41.0 ve G/G genotipini taşıyanların sıklığı %15.0 olarak saptanmıştır. Allel frekansları ise A nükleotidi için %64.5 ve G nükleotidi için %35.5 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar farklı populasyonlarla karşılaştırıldığında; A alleli ve Galleli için homozigotluk oranının Hindistan, Amerika, İngiltere, Kore ve Çin populasyonlarına benzer değerde olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: XRCC1, RFLP, PCR, DNA, İNSAN

Abstract

The aim of this study is to determine the frequency of polymorphism in codon 399 region of XRCC1 gene in the healthy Western Anatolian population. XRCC1-399 polymorphism is studied in the control group of 100 people living in Izmir, Turkey, who don't have a cancer story, using the method of PCR-RFLP (Msp I Restriction Endonuclease enzyme). The followings are found out as a result of the analyses: the frequency of the ones having A/A genotype is 44.0 %, the frequency of the ones having A/G genotype is 41.0 % and the frequency of the ones having G/G genotype is 15.0 %. Allel frequencies are found to be 64.5 % for A nucleotide and 35.5 % for G nucleotide. When the results obtained are compared with various populations, the homozygosity rate for Allel A and Allel G is determined to be at a similar value as the Indian, American, English, Korean and Chinese populations.

Keywords: XRCC1, RFLP, PCR, DNA, HUMAN

Gaziantep Üniversitesi Tıp Dergisi 2007, 1:22-25

GİRİŞ

XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1), DNA tamirinde görev alan bir enzimdir. Baz hasarları ve tek iplikli DNA kırıklarında DNA ligaz III’ün karboksili ile DNA polimeraz b’nin ve poly (ADP-riboz) polimerazın hasarlı DNA kısmına bağlanarak iş görür (1). XRCC1 geni 19q13.2 bölgesinde, 17 ekzonlu 2087 baz çifti (bç) uzunluğu olan transkripsiyon ürününe sahiptir. Farelerde XRCC1 genindeki delesyonun embriyonik letal fenotiple kendini gösterdiği saptanmıştır (2). XRCC1 geni açısından mutasyona uğramış Çin Hamster yumurtalık hücre hatları tek iplikli DNA’nın kırılmalarını, iyonize radyasyon ve alkali ajanlara karşı bununla birlikte gelen aşırı hassasiyet konusunda yetenek kaybı göstermişlerdir(3).

✉ Yazışma Adresi:

Sacide PEHLİVAN, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tlf: 0.342 3606060 Gaziantep / Türkiye

E-Mail : spehlivan@gantep.edu.tr

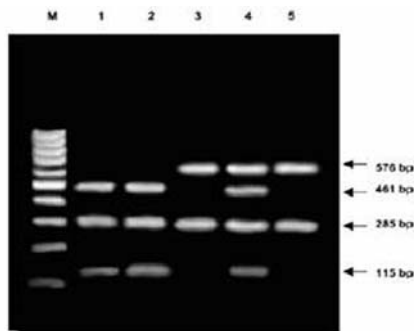
XRCC1'in endogenik ve ekzogenik DNA hasarlarını gidermede anahtar bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda XRCC1'in kodlanma bölgesinde kodon 194 (Arg---'9bTrp), 280 (Arg---'9bHis) ve 399 (A-Arg---'9bG-Gln) olarak adlandırılan üç adet polimorfizm tanımlanmıştır. Bu polimorfizmler evrimsel olarak korunmuş bölgelerde bir aminoasit değişimini içerir ve XRCC1'in fonksiyonunda azalmaya sebep olabilmektedir. Kodon 399 poly (ADP-riboz) polimeraz enzimi binding domaini ve BRCA1'in tanımlanmış karboksil ucunda yer almaktadır (4). Lökositlerdeki mutasyonlar kardeş kromatid değişim frekanslarını ve iyonize radyasyona karşı hassasiyeti arttırmıştır (5-9). Bununla birlikte diğer çalışmalarda Arg399Gln polimorfizmi ve küçük DNA parçaları arasında önemsiz bir ilişki olduğu gösterilmiştir (60-10-11).

Bu çalışmanın amacı; sağlıklı Batı Anadolu popülasyonunda XRCC1 geninin kodon 399 bölgesindeki polimorfizm sıklığını belirlemek ve diğer toplumlara karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Sağlıklı, yaşları 17-52 arasında değişen 100 bireyden izin alınarak çalışma yapıldı. Bireylerden alınan kanlar EDTA'lı tüplere aktarıldı, adı-soyadı ve yaş vb. diğer bilgileri yazıldı. DNA izolasyonu Invitek (Katalog No: CA050036) kiti ile yapılarak elde edilen DNA materyali daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Bu DNA'lardan, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile XRCC1 Kodon 399'a ait oligonukleotid primerler (forward: 5'TCTCCCTTGGTCTCCAACCT-3' ve reverse: 5'-GGGTCTCGGTCTGATGA-3') kullanılarak çoğaltıldı. Amplifikasyon; her genomik DNA'dan 200 ng, PCR Tamponu, 1.75 mM MgCl₂, 20mM deoxyribonucleotide - 5' - triphosphate (dNTPs), 2 ünite Taq polimeraz ve 5 pmol/µl oligonukleotid primerler eklenerek toplam 25µl'de yapıldı.



Şekil 1. XRCC1 Kodon 399'un (Msp I - PCR-RFLP Analizi) agaroz elektroforezi. Marker (Fermantas #SM0388)

1-2: Arg/Arg wild genotipi
3-5: Gln/Gln homozigot polimorfik genotipi
4: Arg/Gln heterozigot genotipi

Başlangıç denatürasyonu, 95°C'de 3 dakikadan sonra 30 saniye 94°C, 45 saniye 57°C ve 45 saniye 72°C olma üzere 35 devir yaptırılıp 72°C'de 5 dakika bekletilerek amplifikasyon tamamlandı. PCR ürünlerinin, yatay elektroforezde %2.0 agaroz jel kullanılarak UV altında görüntülenmesi sağlandı. Amplifiye olan PCR ürünlerine restriksiyon enzim analizi MspI (*Hpa II*) enzimi ile yapıldı (Fermantas #ER0571). Enzim kesimi için su banyosunda 37°C'de 1 saat bekletildikten sonra %2.5 agaroz jel kullanılarak Gln/Gln allelleri için 576/285 bç, Arg/Arg allelleri için 461/285/115 bç, Arg/Gln allelleri için 576/461/285/115 bç oluşan bantlar örneklerde analiz edildi (Şekil 1)(12).

SONUÇLAR

XRCC1 geninin kodon 399 bölgesinin kesimine ait örnek resim Şekil 1'de gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerin DNA'ları XRCC1 A399G polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde, A/A polimorfizmini taşıyanların sıklığı %44.0, A/G taşıyanların sıklığı %41.0 ve G/G taşıyanların sıklığı %15.0 olarak saptanmıştır. Allel frekansları ise A nükleotidi için %64.5 ve G nükleotidi için ise %35.5 olarak belirlenmiştir. 100 bireyden oluşan sağlıklı grubumuza ait sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Sağlıklı Populasyonda, XRCC1 Genindeki A399G Polimorfizminin dağılımı

	Genotip	Toplam (%) ^a
XRCC1	A/A	44 (44)
	A/G	41 (41)
	G/G	15 (15)
Allel Frekansı	A	129 (64.5)
	G	71 (35.5)

^an=100

TARTIŞMA

DNA devamlı olarak endogenik ve ekzogenik mutajenler ve karsinojenlerle hasara uğramaktadır. DNA hasarları örneğin, baz kesip-çıkarma tamiri, nükleotit kesip-çıkarma tamiri, yanlış eşleşme tamiri ve çift iplikli kırılma tamiri ile onarılabilir (13). Tamir edilmemiş DNA hasarı olan hücreler apoptosize yada kontrolsüz büyüme yoluna yani kötü huylu tümör (malignansi) olma yoluna giderler. DNA hasar tamirinde bir deformasyon yada etkinlik düşüşü kanser gelişiminde önemli rol oynar. Son on yıl içinde çeşitli DNA tamir genlerindeki bazı yaygın polimorfizimlerin DNA tamir kapasitesi ile, bir kişinin karsinojenlere karşı hassasiyetini belirlediği öne sürülmüştür (13-14).

Tablo 2. Farklı Sağlıklı Populasyonlarda, XRCC1 Genindeki A399G Polimorfizminin Sıklığı.

Genotip	Amerika Populasyonu ¹⁹ (%)	Kore Populasyonu ²⁰ (%)	Çin Populasyonu ²¹ (%)	Kafkasya Populasyonu ²² (%)
A/A	44.5	51.9	51.6	48.0
A/G	44.8	37	42.1	40
G/G	9.8	11.1	6.3	12

XRCC1 proteini baz çifti kesip çıkarma tamerinde oksidasyonlanmış yada parçalanmış lezyonlar ve önemli olmayan addüktler gibi küçük DNA hasarlarının tamerinde önemli bir role sahiptir (13). Bu genin kodon 399'daki polimorfizminin pek çok epidemiyolojik çalışmalarda çeşitli kanserlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Değişken Gln (G) aleli varlığı; akciğer, beyin, gırtlak ve mide kanserinde riskin artmasıyla ilişkilendirilmiştir(15-18).

Elde ettiğimiz sonuçlar farklı populasyonlarla karşılaştırıldığında; A alleli ve G alleli için homozigotluk oranının Kafkasya, Amerika, İngiltere, Kore ve Çin populasyonlarına benzer değerde olduğu belirlenmiştir (Tablo 2)(19-22).

Bu veriler ışığında farklı hastalık grupları (kanser vb.) için kullanılmak üzere sağlıklı Batı Anadolu populasyonuna ait değerler belirlenmiş ve literatüre katkıda bulunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, and Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly(ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular "nick sensor" *in vitro*. Nucleic Acid Res, 1996;24:4387-4397.
- Tebbs RS, Flannery ML, Meneses JJ. Requirement for the XRCC1 DNA base excision repair gene during early mouse development. Dev Biol 1999;208:513-529.
- Shen MR, Zdzienicka MZ, Mohrenweiser H, et al. Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA. Nucleic Acid Res 1998;26:1032-1037.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. Cancer Res 1998;58:604-608.
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, et al. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycoprotein A variant frequency. Cancer Res 1999;59:2557-2561.
- Matullo G, Guarrera S, Carturan S, et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. Int J Cancer 2001;92:562-567.
- Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, et al. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. Cancer Lett 2000;159:79-86.
- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. Carcinogenesis (Lond.) 2000;21:965-971.
- Hu JJ, Smith TR, Miller MS, et al. Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer Risk. Environ Mol Mutagen 2002;39:208-215.
- Matullo G, Palli D, Peluso M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. Carcinogenesis (Lond.) 2001;22:1437-1445.
- Hong-Ping Yu, Xiao-Yong Zhang, Xiao-Li Wang. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking and esophageal cancer risk. Cancer Detect Prev 2004;28:194-199.
- Sambrook J, et al., Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Laboratory Pres, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989.
- Goode EL, Ulrich CM, and Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2002;11:1513-1530.
- Patel RK, Trivedi AH, Arora DC, et al. DNA repair proficiency in breast cancer patients and their first-degree relatives. Int J Cancer 1997;73:20-24.
- Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. Mutat Res 2001;461:273-278.
- Zhou W, Liu G, Miller DP, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2003;12:359-365.

17. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis (Lond.)* 1999;20:2125-2129.
18. Shen H, Xu Y, Qian Y, et al. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2000;88:601-606.
19. Kevin K. Divine, Frank D. Gilliland, Richard E. Crowell, et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutation Research* 2001;461: 273-278.
20. Jae Yong Park, Su Yeon Lee, Hyo-Sung Jeon, et al. Polymorphism of the DNA Repair Gene XRCC1 and Risk of Primary Lung Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002;11:23-27.
21. Xiao-Ou Shu, Qiuyin Cai, Yu-Tang Gao, et al. A Population-Based Case-Control Study of the Arg399Gln Polymorphism in DNA Repair Gene XRCC1 and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2003;12:1462-1467.
22. Eric J. Duell, Elizabeth A. Holly, Paige M. Bracci, et al. A Population-based Study of the Arg399Gln Polymorphism in X-Ray Repair Cross-Complementing Group 1 (XRCC1) and Risk of Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4630-4636.