

Povezava polimorfizma gena za citokrom P450 (CYP1A1) z dovzetnostjo za pljučnega raka pri Slovencih*

Relationship between cytochrome P450 (CYP1A1) gene polymorphism and lung cancer susceptibility in Slovene population*

Matjaž Kopač**

Ključne besede
pljučne novotvorbe – genetika
citokrom P-450 CYP1A1
polimorfizem genetični

Key words
lung neoplasms – genetics
cytochrome P-450 CYP1A1
polymorphism genetics

Izvleček. Poznamo dve polimorfni mesti gena CYP1A1, ki kodira encim citokrom P4501A1. Eno od mest se nahaja v 7. eksonu kodirajoče regije gena, ki vodi v zamenjavo aminokislino izolevcin (Ile) z aminokislino valin (Val) v vezavnem encimskem mestu za hem (polimorfizem Ile/Val). Drugo polimorfno mesto se nahaja v območju 3' za kodirajočo regijo gena, česar posledica je novo restrikcijsko mesto za encim *Msp* I (polimorfizem *Msp* I). Z raziskavo sem skušal ugotoviti stopnjo povezanosti v pojavljanju obeh oblik polimorfizma gena CYP1A1 ter določiti in primerjati frekvenco različnih vrst genotipov v populaciji bolnikov s pljučnim rakom in v populaciji zdravih preiskovancev. Proučeval sem 156 vzorcev krvi, odvzetih bolnikom s pljučnim rakom, in 102 vzorca krvi, odvzeta zdravim preiskovancem. Pomnoževal sem polimorfni del gena CYP1A1 s polimerazno verižno reakcijo. Za odkrivanje polimorfizma *Msp* I sem produkte reakcije preveril z restrikcijsko analizo in elektroforezo na agaroznem gelu. Za ugotavljanje polimorfizma Ile/Val sem uporabil alelno specifične startne verige in z elektroforezo na agaroznem gelu iskal produkt reakcije. Ugotovil sem statistično pomembno stopnjo povezanosti med pojavljanjem obeh oblik polimorfizma, kar velja za bolnike s pljučnim rakom in tudi za zdrave preiskovance. Nisem pa našel statistično pomembnih razlik v frekvenci pojavljanja posameznih oblik polimorfizma med obravnavano obolelo in zdravo populacijo, niti ne med bolniki s histološko različnimi podtipi pljučnega raka.

Abstract. Two polymorphic sites of the CYP1A1 gene, coding for cytochrome P4501A1 enzyme, have been discovered so far. One involves the 7th exon of the coding region; a nucleotide change leads to amino acid replacement in the heme binding region of cytochrome P4501A1 (polymorphism Ile/Val). Another site is in the 3'-flanking region of the gene, and results in the presence of a new restriction site for the *Msp* I enzyme (polymorphism *Msp* I). This study investigated the role of both polymorphisms in the development of lung cancer caused by chemical carcinogenesis. We analysed 156 samples obtained from patients with lung cancer, and 102 samples from healthy individuals. The method I used was based on amplification of the polymorphic part of the gene by polymerase chain reaction. To detect the polymorphism *Msp* I the products of reaction were analysed using the restriction and electrophoresis on agarose gel, while the presence of polymorphism Ile/Val was determined using specific primers. For the identification of the reaction product electrophoresis on agarose gel was employed. A statistically significant association between polymorphism *Msp* I and polymorphism Ile/Val was found in both lung cancer patients and healthy controls. There was no statistically significant difference in the incidence of both polymorphism forms between lung cancer patients and controls or between patients with different histological subtypes of lung cancer.

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1996.

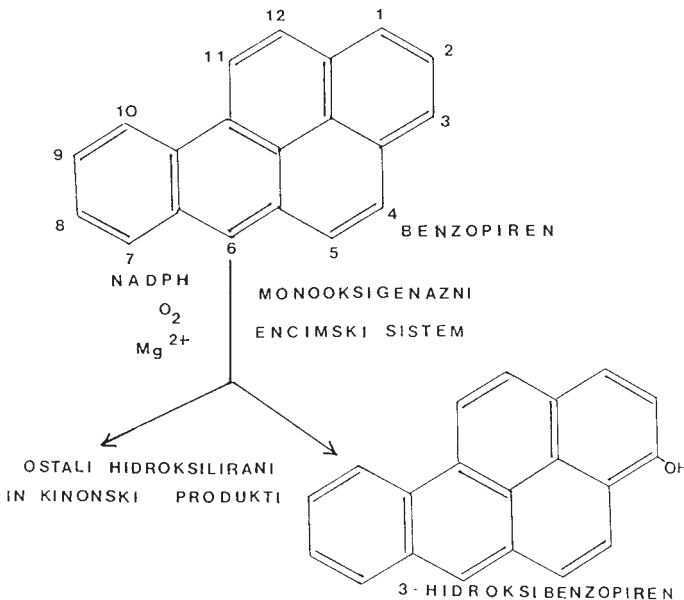
**Matjaž Kopač, štud. med., Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

Uvod

Splošno o kancerogenezi

Kancerogeneza je celosten patofiziološki proces, ki nastane zaradi spremenjenega gena. Na celični ravni gre za nebrzdano razmnoževanje celic zaradi okvarjenega nadzora celične delitve. Genske poškodbe prizadenejo dva tipa za kancerogenezo pomembnih genov: protoonkogene, ki kodirajo beljakovine za začetek celičnega razmnoževanja; ko se spremenijo v neuravnane, hiperaktivne gene, steče proces kancerogeneze; in antionkogene, ki kodirajo beljakovine za prekinitev celičnega razmnoževanja; ko mutirajo in zaradi tega ne delujejo več, steče proces kancerogeneze.

Zelo pomemben rakotvorni dejavnik so različne organske ali anorganske spojine v našem okolju. Anorganske spojine lahko delujejo na membranski ustroj in makromolekule. Pri tem lahko nastanejo prosti radikali, ki poškodujejo celico. Sem spadajo razne kovine (kadmij, kobalt, nikelj), nekovinske spojine (azbesti, silikatne spojine) in nekovine (arzen). Organske spojine lahko delujejo rakotvorno na dva načina. Lahko delujejo neposredno. V tem primeru za svoje delovanje ne potrebujejo presnovne aktivacije. So zelo reaktivni elektrofilni (pozitivno nabiti), ki reagirajo z nukleofilnimi centri drugih molekul (beljakovine, DNA). Sem spadajo številna zdravila, s katerimi lahko tudi uspešno zdravimo in obvladujemo določene tipe rakavih bolezni, lahko pa kasneje sprožijo sekundarno obliko raka (1). Določene organske spojine pa lahko delujejo rakotvorno šele po presnovni aktivaciji, ko dobijo elektrofilni center – takrat postanejo končni reaktivni kancerogeni. V to skupino spadajo



Slika 1. Aktivacija benzopirena v končno, rakotvorno obliko v reakciji z monooksigenaznim encimskim sestavom (3).

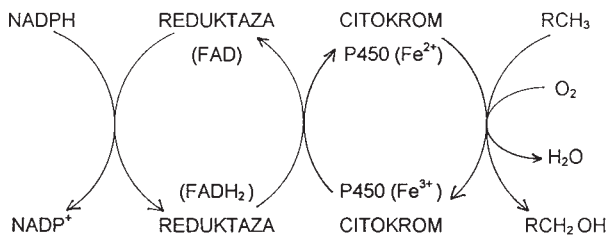
policiklični aromatski ogljikovodiki, kot je benzopiren, aromatski amini, azobarvila ter naravni rastlinski in mikrobní produkti. Njihova presnovna aktivacija nastaja s polisubstratnimi monooksigenazami (encimski sestavi s citokromom P450) (2). Pri človeku delujejo ti encimski sestavi pretežno v jetrih, a tudi v drugih tkivih. Monooksigenaze lahko oksidirajo nereaktivne snovi, npr. policiklične aromatske ogljikovodike, ki so sestavni del cigaretnega dima. Nastanejo visoko reaktivni elektrofilí, z močnim rakotvornim delovanjem, ki lahko povzročajo mutacije v molekuli DNA. Slika 1 kot primer reakcije z monooksigenaznim encimskim sestavom prikazuje aktivacijo benzopirena v končno, rakotvorno obliko (3).

Encimski sestav s citokromom P450

Citokrom P450 je končni člen encimskega zaporedja številnih hidroksilaznih sestavov. Je hemoprotein, ki ima v molekuli hema vezano železo. Tkiva sesalcev ga vsebujejo v membranah endoplazmatskega retikuluma in mitohondrijev. Hidroksilazni sestavi, ki so vezani na membrane endoplazmatskega retikuluma, so sestavljeni iz prenašalcev redukcijskih ekvivalentov in citokroma P450. Redukcijski ekvivalenti se prek flavoproteinske reduktaze in citokroma P450 z elektronskega donorja prenašajo na substrate. Slika 2 prikazuje shemo hidroksilaznega sestava, ki deluje v jetrih sesalcev (4).

Citokrom P450 kot končna oksidaza veže substrat in aktivira molekularni kisik in tako katalizira hidroksilacijo substrata. Pri človeku deluje več encimskih sestavov s citokromom P450. Njegova glavna naloga, ki se odvija v jetrih, je presnova ksenobiotikov (strupov in zdravil). Sestav lahko deluje kot dvorezen meč: medtem ko nekatere spojine inaktivira in pripravi za izločanje, lahko druge aktivira in s tem poveča njihovo strupenost. Razširjenost in evolucija citokroma P450 sta narekovala, da se ti encimi razvrstijo po dejavnosti in podobnosti genov v družine. Danes poznamo superdružino genov P450, ki jo sestavlja okoli 30 različnih genskih družin, od katerih jih 10 deluje pri sesalcih (5).

Encimski sestavi s citokromom P450, odgovorni za aktivacijo kemičnih kancerogenov, spadajo pretežno v tri družine: P450 1, 2, 3, ki so poznane kot skupine encimov za presnavljanje organizmu tujih snovi. Sklepajmo, da se je pri vretenčarjih povečano število genov za omenjene encimske sestave razvilo med filogenetskim razvojem vzporedno s prilagajanjem na kopensko življenje, zaradi česar je prišlo med oksidacijo do potrebe po razstrupitvi strupenih lipofilnih snovi, ki jih vsebuje zaužito kopensko rastlinje (6). Vendar so oksidirane kemične snovi včasih bolj strupene kot prvotne oblike učinkovin in so celo mutagene ali rakotvorne (sindrom dvoreznega meča).



Slika 2. Hidroksilazni sestav, ki deluje v jetrih sesalcev (4).

Gen za citokrom P4501A1

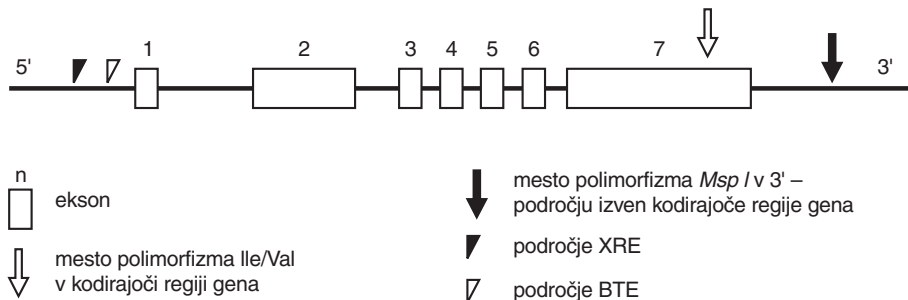
Gen, ki pri človeku kodira encim citokrom P4501A1 (CYP1A1), je precej podoben (približno 80 % glede na nukleotidno zaporedje) genu pri nekaterih glodalcih (miši, podgane). Pri poskusnih živalih zasledimo gen CYP1A1 tako v jetrih kot tudi v drugih tkivih, pri človeku pa predvsem v drugih tkivih. Odkrili so tudi znatne količine tako mRNA kot tudi beljakovin v pljučih, limfocitih in posteljici, medtem ko jih v večini pregledanih jetrnih vzorcev niso našli (6).

Vlogo gena CYP1A1 v bioaktivaciji benzpirena pri človeku so ugotovili po katalitični aktivnosti encima citokrom P4501A1 v poskusnih pogojih *in vitro*. Rezultati študij, pri katerih so uporabljali človeške limfocite v kulturi, so pokazali povezavo med aktivnostjo encimskega sestava s citokromom P4501A1 in dovzetnostjo za kemično povzročene raka. Aktivnost citokroma P4501A1 je po eni strani odvisna od lastnosti samega encima, po drugi pa od zmožnosti indukcije encima (7).

Urnvananje genske ekspresije citokroma P4501A1 so proučevali na poskusnih živalih (8). Dokazali so, da sta za visoko raven inducibilne ekspresije gena kot odgovor na ksenobiotike (tetrakloro-dibenzo-p-dioksin, 3-metilholantren) potrebni vsaj dve območji na DNA. Eno od njih je območje XRE (angl. *xenobiotics responsive element*), ki je odgovorno za indukcijo. Leži precej pred začetkom gena ter deluje pospeševalno kot odziv na dodane induktorje. Drugo je območje BTE (angl. *basic transcription element*) v vlogi promotorja pri uravnavanju osnovne transkripcijske aktivnosti. Homologna zaporedja so našli tudi v človeškem genu, kar kaže na to, da se omenjeni gen pri človeku izraža podobno kot pri poskusnih živalih. Mehanizem genskega izražanja zunaj jeter ostaja pomemben izziv za prihodnje študije.

Polimorfizem gena CYP1A1 in njegov pomen pri zbolevanju za pljučnim rakom

Gen CYP1A1 pri človeku z regulacijskim območjem ponazarja slika 3. Gen sestavlja sedem eksonov in šest intronov (9). Do sedaj sta znani dve polimorfni območji gena, ki so ju v nekaterih študijah lahko povezali z dovzetnostjo za pljučnega raka, povzročene kemično. Eno se nahaja v območju 3' za kodirajočo regijo gena. Polimorfizem je posledica točkovne mutacije, zaradi česar nastane novo restriksijsko mesto za encim



Slika 3. Strukturna shema gena *CYP1A1* (9).

Msp I. Drugo tako območje leži v 7. eksonu v kodirajoči regiji gena. Za polimorfizem je ključna točkovna mutacija, ki vodi v zamenjavo aminokislina izolevcin (Ile) v vezavnem mestu za hem z aminokislino valin (Val).

Polimorfizem omenjenega gena je v tesni povezavi z lastnostmi encimskega sestava s citokromom P4501A1, hidroksilaze arilnih ogljikovodikov (AHH). Aktivnost tega encima pri človeku je odvisna od zmožnosti indukcije gena in njegovih katalitičnih lastnosti. Študije genovega polimorfizma pri Japoncih (7) so pokazale, da je njegova močnejša inducibilnost za AHH povezana s pojavnostjo genotipa, ki ima v obeh alelih prisotno restriksijsko mesto za *Msp* I. Višja bazalna aktivnost encima AHH pa je povezana s pojavnostjo genotipa, ki ima v obeh alelih točkovno mutacijo v 7. eksonu (zamenjava Ile z Val). Oba omenjena genotipa sta pri Japoncih povezana z večjo pojavnostjo pljučnega raka (7). Zaenkrat pa te povezanosti še niso mogli potrditi pri belcih.

Glede na to, da je kancerogeneza pri človeku posledica več bioloških reakcijskih dogajanj, je težko dokazati delež vpletenosti gena CYP1A1 v tem procesu. Kljub temu da poznamo pomen presnovne aktivacije prokancerogenov, je treba še dokazati, ali je ta proces splošni in odločujoči dejavnik v kemični kancerogenezi. Tečeje raziskave, ki skušajo dognati, ali so razlike v genotipu ali na ravni ekspresije gena pomembne za posameznikovo dovzetnost za raka. Odgovori na ta vprašanja bi veliko prispevali k našemu razumevanju odnosa med genotipom encimskega sestava s citokromom P450 in kemično kancerogenezo pri človeku.

Namen dela

Z raziskavo sem skušal ugotoviti, ali se oba doslej poznana polimorfizma gena CYP1A1 pri Slovencih pojavljata povezano ali pa je morda njuna pojavnost neodvisna druga od druge. Namen dela je bil določiti in primerjati frekvenco genotipov v populaciji bolnikov s pljučnim rakom in v populaciji zdravih preiskovancev. Rezultate sem primerjal z izsledki podobnih študij, ki so jih do sedaj že opravili Japonci, Norvežani in Finci.

Metode

Preiskovanci

Raziskava je obravnavala 2 skupini preiskovancev: v prvi je bilo 156 bolnikov s histološko opredeljeno diagnozo pljučnega raka, v drugi, kontrolni skupini, pa 102 zdravi nesorodni osebi. Raziskavo je odobrila slovenska Komisija za medicinsko etiko.

Krvne vzorce zdravih preiskovancev smo dobili na Centru za tipizacijo tkiv. Referenčne skupine zdravih posameznikov, katerih izsledke smo uporabili za kontrolo, nismo izbrali po merilih, kot so starost, spol ali kadilske navade, ker nimajo vpliva na nukleotidno zaporedje preiskovanega gena.

Vzorce krvi bolnikov z rakom na pljučih smo dobili na Onkološkem inštitutu v Ljubljani. Tabela 1 prikazuje nekatere značilnosti teh bolnikov, kot so frekvenčna porazdelitev glede na histološki tip pljučnega raka in kadilski status (če je znan), ki smo jih dobili iz bolniških kartotek.

Tabela 1. Značilnosti bolnikov s pljučnim rakom in zdravih preiskovancev.

Histološki tip	Preiskovanci število (%)	Kadilski status		
		Ne	Da	Neznano
Pljučni rak	156 (100)	96	12	48
Kreyberg I	129 (82,7)	81	7	41
Planocelularni karcinom	65 (41,7)	42	3	20
Mikrocelularni karcinom	37 (23,7)	22	2	13
Makrocelularni karcinom	27 (17,3)	17	2	8
Kreyberg II (adenokarcinom)	27 (17,3)	15	5	7
Zdravi preiskovanci	102	–	–	102

Izolacija DNA s postopkom izsoljevanja na majhni skali

500 µl krvi sem dodal 1 ml puфра za lizo eritrocitov (sestava 5-krat koncentriranega puфра: 274 g saharoze, 25 ml Triton x-100, 12,5 ml MgCl₂ (1 M), 30 ml Tris/HCl (11 M, pH = 7,5), vode do 500 ml), premešal in centrifugiral. Oborino sem spral z 1 ml destilirane vode (dH₂O), ponovno centrifugiral, nato pa jo resuspendiral v 80 µl puфра za proteinazo K (sestava 5 × koncentriranega puфра: 750 µl 5 M NaCl, 2,4 ml 0,5 M etilendiaminotetraacetat (EDTA) (pH = 8,0), vode do 100 ml), 30 µl raztopine proteinaze K (10 mg/ml), 20 µl 20 % SDS (natrijev dodecil sulfat) in 240 µl dH₂O. Vzorec sem 30 minut inkubiral pri 55°C, nato pa oboril beljakovine s 100 µl 6 M NaCl ter jih centrifugiral. Supernatantu sem dodal 1 ml hladnega absolutnega etanola. Oborjeno DNA sem centrifugiral, jo spral z 1 ml 70 % etanola in ponovno centrifugiral. Glede na velikost oborine sem DNA raztopil v 50–200 µl dH₂O. Za pomnoževanje DNA v reakciji PCR sem uporabil po 2 µl tako pripravljene DNA in ustrezno količino reakcijske zmesi (10, 11).

Pomnoževanje DNA s postopkom verižne reakcije s polimerazo

V sterilni komori sem pripravil reakcijsko zmes za verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Za analizo polimorfizma *Msp I* sem pripravil 50 µl reakcijske zmesi, ki je vsebovala:

5 µl 10 × pufer PCR – P. E. Cetus (100 mM Tris - HCl, pH = 8,3, 500 mM KCl, 15 mM Mg-Cl₂, 0,01 % (w/v) gelatin), 5 µl dNTP (2 mM vsak dNTP, P. E. Cetus), 1 µl ON. DEL 1 (10 pmol/µl) – startna veriga 5', 1 µl ON. DEL 2 (10 pmol/µl) – startna veriga 3', 0,2 µl polimeraza A Taq (5 enot/µl, P. E. Cetus), 3 µl DNA, 34,8 µl H₂O in 2 kapljici mineralnega olja. Epruvetke z reakcijsko zmesjo sem vstavil v aparat PCR in pognal ustrezní program: 94°C 3 min; 10 ciklov: 95°C 1 min, 68°C 1 min, 72°C 1 min in 20 ciklov: 95°C 1 min, 62°C 1 min, 72°C 1 min.

Za analizo polimorfizma Ile/Val sem za vsak vzorec pripravil 2 reakcijski zmesi, ki sta vsebovali: 5 µl 10 × pufer PCR (P. E. Cetus), 5 µl dNTP (2 mM vsak dNTP), 1 µl ON. IVP 1 (10 pmol/µl) – startna veriga 5', 1 µl ON. IVP 2 (10 pmol/µl) – startna veriga 3' (ali 1 µl ON. IVP 3 (10 pmol/µl) – startna veriga 3'), 0,2 µl polimeraza A Taq (5 enot/µl), 3 µl DNA, destilirana voda do 20 µl. Pogoji reakcije PCR pri analizi polimorfizma Ile/Val: 95°C 2 min in 30 ciklov: 95°C 1 min, 69°C 1 min, 72°C 1 min (9, 12).

Analiza produkta verižne reakcije s polimerazo

Pripravil sem 80 ml 2 % agaroznega gela v pufru TBE (0,098 M Tris-borat, 0,089 M boro-va kislina, 0,002 M EDTA). Nato sem dodal 4 μ l EtBr (etidijev bromid). Nosilec z agaroznim gelom sem vstavil v elektroforezno kadičko s pufram TBE in nanesel vzorce (sestava pufra za nanos vzorcev: 0,1 % ksilen cianol, 0,1 % bromfenol modro, 50 % glicerol) in negativno kontrolo ter dolžinski standard DNA v žepke. Elektroforeza je tekla sprva pri 90 V, nato pri 110–115 V. Količino produkta sem ocenil na UV-transiluminatorju. Za natančnejšo oceno produkta in dokumentacijo sem napravil posnetek s polaroidno kamero (13).

Restriksijska analiza produkta verižne reakcije s polimerazo pri vzorcih za analizo polimorfnege mesta na 3'-koncu gena

Iz vsakega vzorca produkta reakcije PCR sem odpipetiral po 35,7 μ l raztopine, dodal po 4 μ l pufra L (Tris-HCl 10 mmol/l, MgCl₂ 10 mmol/l, ditioeritritol (DTE) 1 mmol/l, pH=7,5 (pri 370°C)) in 0,3 μ l restriksijskega encima *Msp* I. Reakcijsko zmes sem inkubiral pri 370°C 2 uri. Po končanem procesu restrikcije sem vzorcem dodal pufer za nanos ter jih nanesel na agarozni gel. Elektroforeza je tekla 40 minut pri 90–95 V. Za analizo rezultatov in dokumentacijo sem z UV-svetlobo osvetljeni gel slikal s polaroidno kamero (9).

Statistična analiza

S statistično analizo sem proučeval povezanost med pojavljanjem polimorfizma *Msp* I in Ile/Val pri slovenskih posameznikih. Proučeval sem tudi povezanost polimorfizma *Msp* I in Ile/Val s povečanim tveganjem zbolevanja za pljučnim rakom glede na zdravo populacijo. Pri statistični obdelavi rezultatov sem se posluževal testa hi-kvadrat po formuli (14):

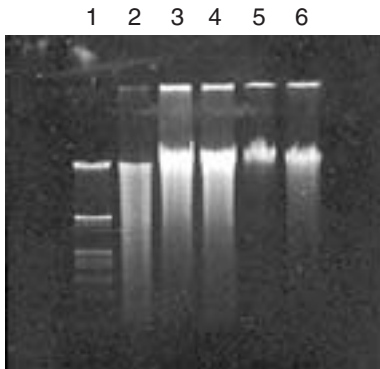
$$\chi^2 = \frac{(f_o - f_p)^2}{f_p}$$

Pri računanju statistične pomembnosti sem uporabljal tabelo 3 \times 2 z dvema stopinjama prostosti in 5 % stopnjo tveganja. Če je bila dobljena vrednost večja od kritične, sem zavrnil ničelno hipotezo, ki trdi, da med spremenljivkami ni pomembne povezanosti, in sprejel osnovno hipotezo, da med spremenljivkami obstaja pomembna povezanost. Pri raziskovanju povezanosti med pojavljanjem polimorfizma *Msp* I in Ile/Val pa sem uporabljal tabelo 3 \times 3 s štirimi stopinjami prostosti in 5 % tveganjem ter preverjal pravilnost ničelne hipoteze, ki trdi, da se obe vrsti polimorfizma pojavljata neodvisno druga od druge.

Izsledki

Izolacija in analiza DNA

DNA sem izoliral iz krvnih limfocitov s postopkom izsoljevanja na majhni skali. Postopek je hiter, izolirana DNA pa uporabna za poizkuse, če le ni preveč razgrajena. Koncentracije tako izolirane DNA znašajo od 100 do 750 ng/ μ l. Izolirano DNA sem analiziral z merjenjem absorpcije v UV-svetlobi in z elektroforezo na 0,4 % agaroznem gelu in jo



Slika 4. Analiza nekaj vzorcev izolirane človeške DNA. Elektroforeza je tekla na 0,4 % agaroznem gelu 1: dolžinski standard DNA, 2–6: vzorci izolirane DNA.

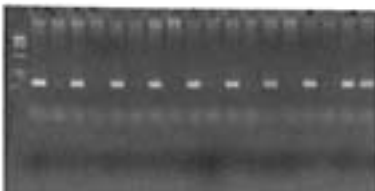
preizkusil v reakciji PCR. Elektroforezno analizo nekaj vzorcev tako izolirane človeške DNA prikazuje slika 4. Izolirana DNA je primerno očiščena beljakovin, velikosti delcev pa so v območju, ki zagotavlja uspešno analizo z reakcijo PCR.

Analiza polimorfizma gena CYP1A1 z verižno reakcijo s polimerazo

S PCR sem analiziral dve polimorfni mesti gena CYP1A1. Polimorfizem v 7. genskem eksonu, česar posledica je zamenjava aminokislina izolevcin (Ile) z aminokislino valin (Val) v encimskem vezavnem mestu za hem, sem analiziral z alelno specifično PCR z dvema paroma startnih verig (9). Slika 5 prikazuje analizo produkta alelno specifične PCR z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu.

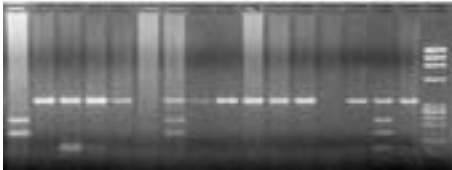
Iz prikazane slike je razvidno, da vzorec št. 9 vsebuje produkt PCR pri obeh alelno specifičnih reakcijah, iz česar sledi, da je ta oseba heterozigot glede na polimorfizem Ile/Val. Pri vzorcih od 1 do 8 je produkt le v reakcijski zmesi s parom startnih verig ON. IVP 1 in ON. IVP 2, ki sta specifično pomnožila le alel Ile. Homozigot za alel Val pa bi imel prisoten produkt PCR samo v reakcijski zmesi s startnima verigama ON. IVP 1 in ON. IVP 3, ki specifično pomnožita le alel Val.

S 1 2 3 4 5 6 7 8 9
IV IV IV IV IV IV IV IV IV



Slika 5. Analiza produkta alelno specifične reakcije PCR za odkrivanje polimorfizma Ile/Val. Produkt reakcije PCR sem analiziral z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu. S – standard DNA, 1–9: vzorci PCR z alelno specifičnimi startnimi verigami. I: v reakcijski zmesi je startna veriga, ki pomnoži alel Ile, V: v reakcijski zmesi je startna veriga, ki pomnoži alel Val.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Slika 6. Analiza restrikcijske zmesi za odkrivanje polimorfizma *Msp I*. Produkta PCR sem analiziral z elektroforezo na 2% agaroznem gelu. 17: standard DNA, 1–16: vzorci restrikcijske zmesi, ki sem jih pripravil po postopku opisanem v poglavju Metode dela.

Polimorfizem v območju 3' za kodirajočo regijo gena CYP1A1 sem analiziral s PCR in cepljenjem produkta PCR z restrikcijsko endonukleazo *Msp I* (9). Slika 6 prikazuje analizo restrikcijske zmesi na 2% agaroznem gelu.

Pri homozigotih za alel m_1 (genotip A), ki nima restrikcijskega mesta za *Msp I*, je po cepljenju produkta PCR z *Msp I* prisoten samo en fragment dolžine 340 bp, enak kot je velik necepljen produkt PCR. Na sliki 6 so to vzorci št. 2–5, 8–12, 14 in 16. Pri heterozigotih z aleloma m_1 in m_2 (genotip B) so prisotni fragmenti dolžine 340, 200 in 140 bp. Na sliki 6 sta to vzorca št. 7 in 15. Pri homozigotih za alel m_2 (genotip C) pa sta prisotna dva fragmenta velikosti 200 in 140 bp. Na sliki 6 je tak vzorec št. 1.

Analiza polimorfizma gena CYP1A1 pri zdravi populaciji

Polimorfizem Ile/Val sem analiziral pri 102 zdravih osebah iz slovenske populacije (5 vzorcev se na PCR ni odzvalo). Polimorfizem *Msp I* sem prav tako analiziral pri 102 zdravih osebah iz slovenske populacije (9 vzorcev se na PCR ni odzvalo).

Raziskoval sem povezanost med pojavljanjem obeh analiziranih polimorfizmov gena CYP1A1 v zdravi populaciji. Primerjal sem opazovane frekvence Ile/Ile, Ile/Val in Val/Val v skupini genotipov A (m_1/m_1), B (m_1/m_2) in C (m_2/m_2) pri zdravih osebah. V tabeli 2 so prikazane opazovane frekvence posameznih genotipov, urejene v tabelo 3×3 , ki smo jo uporabili za statističen izračun stopnje povezanosti med pojavljanjem obeh vrst polimorfizma, in sicer po metodi χ_2 .

Tabela 2. Povezava med polimorfizmoma Ile/Val in *Msp I* pri zdravi populaciji. Genotip A: homozigoti za alel m_1 (ni restrikcijskega mesta za *Msp I*); genotip B: heterozigoti z aleloma m_1 in m_2 (na eni DNA je prisotno restrikcijsko mesto za *Msp I*, na drugi pa ne); genotip C: homozigoti za alel m_2 (na obeh DNA je prisotno restrikcijsko mesto za *Msp I*). Ile pomeni prisotnost aminokisljine izolevcin, Val pomeni prisotnost aminokisljine valin. Prikazani so deleži genotipov, števila v oklepajih predstavljajo število preiskovancev.

GENOTIP	A (m_1/m_1)	B (m_1/m_2)	C (m_2/m_2)	Skupaj
Ile/Ile	0,807 (71)	0,091 (8)	0,011 (1)	0,909 (80)
Ile/Val	0,0 (0)	0,091 (8)	0,0 (0)	0,091 (8)
Val/Val	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Skupaj	0,807 (71)	0,182 (16)	0,011 (1)	1,0 (88)

Rezultati, prikazani v tabeli, kažejo na to, da je alel Val v slovenski populaciji redke in zastopan le pri 9,1 % genotipov (pri 8 zdravih preiskovancih), frekvenca alela znaša 4,5 % (8 alelov izmed 176). Podobno je redko zastopan alel m_2 , in sicer pri 19,3 % genotipov (pri 17 zdravih preiskovancih), frekvenca alela pa znaša 10,2 % (18 alelov izmed 176).

Iz tabele je razvidno, da imajo genotipi A v vezavnem mestu za hem le aminokislino Ile, osebe z genotipom B Ile in Val v razmerju 3 : 1, osebe z genotipom C pa le Ile, vendar je takih oseb premalo, da bi to lahko bilo statistično pomembno. Izračunana vrednost statistične pomembnosti χ_2 je znašala 39,75, medtem ko kritična vrednost χ_2 za tovrstno tabelo s 4 stopinjami prostosti in 5 % stopnjo tveganja znaša 9,49. Zato sem lahko zavrnil ničelno hipotezo, ki trdi, da med pojavljanjem obeh vrst polimorfizma ni statistično pomembne povezanosti. Namesto tega sem sprejel osnovno hipotezo, ki trdi, da takšna povezanost obstaja.

Povezanost med polimorfizmoma Ile/Val in Msp I pri bolnikih s pljučnim rakom

Povezanost med polimorfizmoma Ile/Val in Msp I sem proučeval pri 156 bolnikih s pljučnim rakom. Tabela 3 prikazuje opazovane frekvence posameznih genotipov.

Tabela 3. Povezava med polimorfizmoma Ile/Val in Msp I pri bolnikih s pljučnim rakom. Pomen okrajšav – glej tabelo 2.

GENOTIP	A (m_1/m_1)	B (m_1/m_2)	C (m_2/m_2)	skupaj
Ile/Ile	0,872 (136)	0,051 (8)	0,006 (1)	0,929 (145)
Ile/Val	0,0 (0)	0,051 (8)	0,006 (1)	0,058 (9)
Val/Val	0,0 (0)	0,006 (1)	0,006 (1)	0,013 (2)
skupaj	0,872 (136)	0,109 (17)	0,019 (3)	1,0 (156)

Iz tabele je razvidno, da je tudi v populaciji bolnikov s pljučnim rakom alel Val zastopan v majhni meri, in sicer se pojavlja le pri 7,1 % genotipov (pri 11 preiskovancih), frekvenca alela pa znaša 4,2 % (13 alelov izmed 312). Prav tako je redke alel m_2 , in sicer se pojavlja pri 12,8 % genotipov (pri 20 preiskovancih), frekvenca alela znaša 7,4 % (23 alelov izmed 312). Prav tako je razvidno, da imajo osebe z genotipom A v encimskem vezavnem mestu za hem le aminokislino Ile, osebe z genotipom B in C imajo v večji meri zastopano Ile, vendar je oseb z genotipom C premalo, da bi to lahko bilo statistično pomembno. Izračunana vrednost χ_2 je bila 60,36, medtem ko kritična vrednost χ_2 za tovrstno tabelo s 4 stopinjami prostosti in 5 % stopnjo tveganja znaša 9,49. Zato sem zavrnil ničelno hipotezo, ki trdi, da pri bolnikih s pljučnim rakom ni statistično pomembne povezanosti med pojavljanjem obeh vrst polimorfizma. Sprejel sem osnovno hipotezo, ki trdi, da takšna povezanost obstaja.

Genotipi CYP1A1 pri različnih histoloških podtipih pljučnega raka

Tabeli 4 in 5 prikazujeta frekvence posameznih genotipov pri različnih histoloških podtipih pljučnega raka. Med seboj sem primerjal posamezne histološke podtype pljučnega

raka z zdravimi preiskovanci in ob uporabi tabele 3×2 računal statistično pomembnost za razlike v genotipu. Kritična vrednost χ_2 za tovrstno tabelo z 2 stopinjama prostosti in 5% stopnjo tveganja je znašala 5,99.

Tabela 4. Genotipi *CYP1A1* pri različnih histoloških podtipih pljučnega raka pri polimorfizmu *Ile/Val*. Številke v oklepajih predstavljajo odstotke.

	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Skupaj	χ_2
PLJUČNI RAK	145 (92,9)	9 (5,8)	2 (1,3)	156 (100)	2,76
Kreyberg I	120 (93,0)	8 (6,2)	1 (0,8)	129 (100)	2,36
Ploščatocelični karcinom	59 (90,8)	5 (7,7)	1 (1,5)	65 (100)	2,06
Mikrocelularni karcinom	36 (97,3)	1 (2,7)	0 (0)	37 (100)	2,04
Makrocelularni karcinom	25 (92,6)	2 (7,4)	0 (0)	27 (100)	0,23
Kreyberg II (adenokarcinom)	25 (92,6)	1 (3,7)	1 (3,7)	27 (100)	3,83
ZDRAVI PREISKOVANCI	89 (91,8)	8 (8,2)	0 (0)	97 (100)	

Tabela 5. Genotipi *CYP1A1* pri različnih histoloških podtipih pljučnega raka pri polimorfizmu *Msp I*. Številke v oklepajih predstavljajo odstotke.

	A (m_1/m_1)	B (m_1/m_2)	C (m_2/m_2)	Skupaj	χ_2
PLJUČNI RAK	136 (87,2)	17 (10,9)	3 (1,9)	156 (100)	2,65
Kreyberg I	114 (88,4)	13 (10,1)	2 (1,5)	129 (100)	2,95
Ploščatocelični karcinom	56 (86,2)	7 (10,8)	2 (3,0)	65 (100)	2,23
Mikrocelularni karcinom	34 (91,9)	3 (8,1)	0 (0)	37 (100)	4,01
Makrocelularni karcinom	24 (88,9)	3 (11,1)	0 (0)	27 (100)	3,56
Kreyberg II (adenokarcinom)	22 (81,5)	4 (14,8)	1 (3,7)	27 (100)	0,91
ZDRAVI PREISKOVANCI	76 (81,7)	16 (17,2)	1 (1,1)	93 (100)	

Iz tabel 4 in 5 je razvidno, da kritična vrednost nikjer ni bila presežena. Torej sem moral pri vseh histoloških podtipih pljučnega raka sprejeti ničelno hipotezo, ki trdi, da ni statistično pomembnih razlik v genotipu med zdravo populacijo in bolniki z različnimi histološkimi podtipi pljučnega raka, tako glede polimorfizma *Ile/Val* kot tudi glede polimorfizma *Msp I*.

Povezanost med polimorfizmoma *Msp I* in *Ile/Val* glede na predvidevan fenotip

Genotip C (m_2/m_2) je v japonski populaciji tesno (statistično pomembno) povezan z visoko inducibilnostjo AHH, medtem ko je genotip *Val/Val* povezan z visoko bazalno aktivnostjo AHH (7). S statistično analizo sem hotel ugotoviti, ali takšna povezanost velja tudi pri slovenskih bolnikih s pljučnim rakom. V tabelah 6 in 7 sem zato združil tiste genotipe, ki vodijo v isti fenotip, to sta *Ile/Ile* in *Ile/Val* oziroma genotipa A in B. Preverjal sem pravilnost ničelne hipoteze po metodi χ_2 in ugotovil, da tudi v primeru združevanja

genotipov glede na predviden fenotip ni pomembnih razlik med bolniki z različnimi histološkimi podtipi pljučnega raka in zdravimi preiskovanci.

Tabela 6. Povezava med obema vrstama polimorfizmov glede na aktivnost encima (fenotip) pri polimorfizmu *Ile/Val*. Številke v oklepajih predstavljajo odstotke.

	Ile/Ile + Ile/Val	Val/Val	Skupaj	χ_2
PLJUČNI RAK	154 (98,7)	2 (1,3)	156 (100)	2,20
Kreyberg I	128 (99,2)	1 (0,8)	129 (100)	2,04
Ploščatocelični karcinom	64 (98,5)	1 (1,5)	65 (100)	2,05
Mikrocelularni karcinom	37 (100)	0 (0)	37 (100)	0,00
Makrocelularni karcinom	27 (100)	0 (0)	27 (100)	0,00
Kreyberg II (adenokarcinom)	26 (96,3)	1 (3,7)	27 (100)	2,59
ZDRAVI PREISKOVANCI	97 (100)	0 (0)	97 (100)	

Tabela 7. Povezava med obema vrstama polimorfizmov glede na aktivnost encima (fenotip) pri polimorfizmu *Msp I*. Številke v oklepajih predstavljajo odstotke.

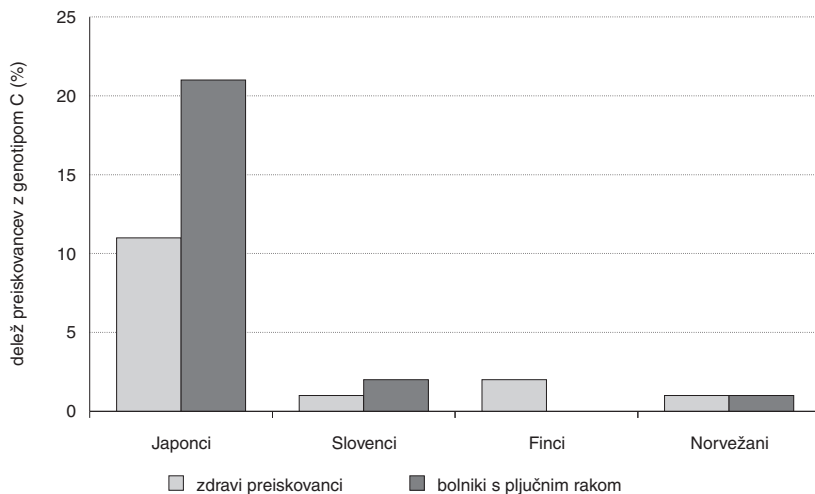
	Genotip A + B	Genotip C	Skupaj	χ_2
PLJUČNI RAK	153 (98,1)	3 (1,9)	156 (100)	0,67
Kreyberg I	127 (98,4)	2 (1,6)	129 (100)	0,52
Ploščatocelični karcinom	63 (96,9)	2 (3,1)	65 (100)	1,03
Mikrocelularni karcinom	37 (100)	0 (0)	37 (100)	2,19
Makrocelularni karcinom	27 (100)	0 (0)	27 (100)	2,56
Kreyberg II (adenokarcinom)	26 (96,3)	1 (3,7)	27 (100)	0,68
ZDRAVI PREISKOVANCI	92 (98,9)	1 (1,1)	93 (100)	

Kritična vrednost χ_2 za tovrstni tabeli 2×2 z eno stopinjo prostosti in 5 % stopnjo tveganja znaša 3,84. Ker le-ta ni bila nikjer presežena, sem ničelno hipotezo v celoti sprejel za pravilno.

Primerjava frekvence genotipa C (polimorfizma *Msp I*) med slovensko populacijo in nekaterimi drugimi populacijami

Slika 7 prikazuje histogram, ki ponazarja razširjenost genotipa C (polimorfizma *Msp I*), ki se je pri študiju polimorfizma gena CYP1A1 pri Japoncih izkazal kot pomemben pri nastanku pljučnega raka, povzročenege kemično (9).

V histogramu prikazani rezultati kažejo na to, da je razširjenost genotipa C v japonski populaciji znatno večja kot v katerikoli evropski populaciji, ki so bile analizirane do danes. Iz prikaza se tudi vidi, da je delež tega genotipa znatno povečan pri bolnikih s pljučnim rakom le pri Japoncih.



Slika 7. Razširjenost genotipa C pri Slovencih in nekaterih drugih narodih (17).

Razpravljanje

Pogostnost genotipov CYP1A1 v tabelah 2 in 3 kaže na to, da imamo Slovenci visoko stopnjo povezanosti pojavljanja obeh vrst polimorfizma. Gre za točkovno mutacijo v 7. eksonu kodirajoče regije gena CYP1A1, ki vodi v zamenjavo aminokislina Ile z aminokislino Val v encimskem vezavnem mestu za hem, in točkovno mutacijo v območju 3' za kodirajočo regijo gena, česar posledica je novo restriktivno mesto za encim *Msp I*. Takšna povezanost se pojavlja tako pri zdravi populaciji kot pri bolnikih s pljučnim rakom, pri slednjih še z večjo statistično pomembnostjo. Glede tega so izsledki naše raziskave podobni tistim iz Skandinavije in Japonske (9, 15, 17). Kaže, da se obe točkovni mutaciji pri vseh do sedaj proučevanih populacijah dedujeta v vezavnem neravnovesju.

Ugotovil sem tudi, da ni statistično pomembne povezanosti med pojavljanjem ene ali druge vrste polimorfizma in zbolevanjem za pljučnim rakom. Oba redko zastopana alela, Val in m_2 , sta pri Slovencih približno enakomerno razporejena med zdravo in obolelo populacijo (tabela 2 in tabela 3). Vendar je treba poudariti, da je pojavnost obeh alelov tako nizka, da tega ni možno statistično zanesljivo potrditi. Podobno stanje so ugotovile podobne študije v nekaterih skandinavskih deželah. Toda na Japonskem je drugače. Pojavnost genotipa C (m_2/m_2) znaša 21,2% med bolniki s pljučnim rakom oziroma 10,6% med zdravimi preiskovanci (9, 16, 17). Genotip C je torej pri Japoncih povezan z večjo dovzetnostjo zbolevanja za pljučnim rakom. Vzrok tega pojava še ni raziskan, domnevajo pa, da gre za uravnavanje gena CYP1A1. Znano je namreč, da je polimorfizem *Msp I*, ki se pojavlja v območju 3' za kodirajočo regijo gena, pri Japoncih značilno povezan s povečano izraznostjo gena (7). Pri Slovencih smemo tako nizko frekvenco dovzetnih genotipov C in Val/Val šteti za ugodno okoliščino, saj bi bilo sicer verjetno še

več tovrstne zbolewnosti, ki bi se pojavljala pri še nekoliko mlajših bolnikih. Ugotovil sem tudi, da med bolniki z različnimi histološkimi podtipi pljučnega raka ni statistično pomembnih razlik.

Kancerogeneza je celosten proces, v katerem zanesljivo sodelujejo še druge encimske reakcije. Nekatere raziskave so npr. razkrile, da igra pomembno vlogo pri dovzetnosti za pljučnega raka poleg citokroma P4501A1 tudi glutation S-transferaza M1 (GSTM1) oziroma presnovno ravnovesje med njima (18). GSTM1 je sicer zelo pomemben člen v drugi fazi biotransformacije, ki sodeluje pri razstrupljanju elektrofilnih molekul, a tudi pri vezavi endogenih spojin, s čimer jih pripravi za izločanje. Možno je, da igrajo pomembnejšo vlogo pri kemični kancerogenezi tudi drugi encimi iz družine citokromov P450. Pri Slovencih so že potrdili važno vlogo polimorfizma gena CYP2D6, ki sicer kodira encim debrizokinsko-4-hidroksilazo, ki sodeluje pri presnovi nekaterih zdravil (19). Zelo verjetno imajo pri kemični kancerogenezi pomembno vlogo tudi drugi encimi, med katerimi lahko omenimo tiste, ki so odgovorni za popraviljanje napak na DNA.

Pri Slovencih torej nismo našli statistično pomembne povezave med obema vrstama polimorfizma gena za citokrom P450 (CYP1A1) in dovzetnostjo za pljučnega raka. V okviru preprečevanja pljučnega raka v Sloveniji bi se morali pri iskanju skupin s tveganjem usmeriti na zgoraj omenjene ali še kakšne druge možnosti.

Sklepi

Tema pričujoče naloge je bila raziskati vpliv obeh opisanih polimorfizmov pri nastanku kemično povzročene pljučnega raka pri Slovencih. Zanimala me je njuna vloga na izbranem vzorcu slovenske populacije s pljučnim rakom. Dobljene rezultate sem primerjal s skupino zdravih preiskovancev in z izsledki tujih raziskav.

Izkazalo se je, da se oba polimorfizma pojavljata povezano pri bolnikih s pljučnim rakom kot tudi pri zdravih preiskovancih. To je bilo tudi statistično pomembno potrjeno. Ni pa statistično pomembne razlike v pojavnosti obeh polimorfizmov med bolniki s pljučnim rakom in zdravimi preiskovanci. Iz tega sklepamo, da pri Slovencih zbolevanje za pljučnim rakom ni odvisno od genske dovzetnosti na ravni preiskovanega gena CYP1A1.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Katji Breskvar, za številne dragocene nasvete in usmerjanje k zastavljenemu cilju. Zahvaljujem se dr. Viti Dolžan, dr. med., za požrtvovalno pomoč pri praktični izvedbi naloge. Hvala prof. dr. Zvonimirju Rudolfu z Onkološkega inštituta za vzorce krvi bolnikov s pljučnim rakom. Hvala tudi vsem drugim z Inštituta za biokemijo, ki so mi kakorkoli priskočili na pomoč.

Literatura

1. Caporaso NE, Landi MT. Molecular epidemiology: a new perspective for the study of toxic exposures in man. A consideration of the influence of genetic susceptibility factors on risk in different lung cancer histologies. *Med Lav* 1994; 1: 68-77.

2. Nakachi K, Hayashi S, Kawajiri K, Imai K. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2209–13.
3. Breskvar K. Biokemična vloga jeter v detoksifikaciji endogenih metabolitov in ksenobiotikov. *Med Razgl* 1982; 21: 443–59.
4. Kržan M, Meglič B. Določanje spektroskopskih lastnosti citokroma P450, ki se v tankeem črevesu inducira z estrogeni. *Med Razgl* 1984; 23: 491–503.
5. Nebert DW. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutation Res* 1991; 247: 267–81.
6. Kawajiri K, Kuriyama YF. P450 and human cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 1325–35.
7. Kiyohara C, Hirohata T, Inutsuka S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 18–24.
8. Fujii - Kuriyama Y, Inataka H, Sogawa K, Yasumoto K, Kikuchi Y. Regulation of CYP1A1 expression. *Faseb J* 1992; 6: 706–9.
9. Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer associated *Msp* I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem* 1991; 110: 407–11.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acid Res* 1988; 16: 1215.
12. Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunol today* 1989; 10: 351–5.
13. Giphart MJ, Verduijn W. The Eurotransplant HLA – DRB oligonucleotide typing set. *J immunol* 1991; 18: 57–68.
14. Adamič Š. *Temelji biostatistike*. Ljubljana: Medicinska fakulteta v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko; 1989: 103–10.
15. Hirvonen A, Husgafvel - Pursiainen K, Antilla S, Karjalainen A, Sorsa M, Vainio H. Metabolic cytochrome P450 genotypes and assesment of individual susceptibility to lung cancer. *Pharmacogenetics* 1992; 2: 259–63.
16. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res* 1991; 51: 5177–80.
17. Raunio H, Husgafvel - Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility – a review. *Gene* 1995; 159: 113–21.
18. Vaury C, Laine R, Noguiez P, et al. Human glutathione S – transferase M1 null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P4501A1 gene transcription. *Cancer Res* 1995; 55: 5520–23.
19. Dolžan V, Rudolf Z, Breskvar K. Human CYP2D6 gene polymorphism in Slovene cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2675–78.