

ELEKTROMANYETİK ALANA MARUZ KALAN KİŞİLERDE K-RAS ONKOGENİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

M. Emin ERDAL^{*}, Nurten ERDAL^{**}, İ. Ömer BARLAS^{***}, Şenay GÖRÜCÜ^{****}

^{*}Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin

^{**}Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin

^{***}Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gaziantep

^{****}Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gaziantep

ÖZET

İnsanda kanser oluşumuna birçok faktörün etkili olduğu ileri sürülmektedir. Bunların başında tümör süppressör genleri, protoonkogenler ve onkogenlerde meydana gelen düzensizlikler ilk sırada yer almaktadır. Ras onkogen familyasında yer alan K-ras onkogeninin 12.,13. ve 61. kodonunda meydana gelen nokta mutasyonlar tümör oluşumuna yol açmaktadır. Yapılan araştırmalarda elektromanyetik alanların hücreleri bölünmeye sevk ederek tümör gelişimini hızlandırdığı ve uzun süreli oldukça düşük frekanslı (Extremely Low-Frequency, ELF) elektromanyetik alanlara maruz kalan kişilerde kanser oluşum sıklığının arttığı bildirilmektedir. Bu konuda moleküler düzeyde çalışmalar yeterli olmayıp tartışmalar devam etmektedir. Bu çalışmada, yüksek gerilim hattı çalışanlarında kanser oluşumuna neden olan onkogenlerden, K-ras genindeki delesyon/mutasyonları belirlemek amacıyla, Gaziantep, Erzin ve Elbistan bölgesi 380 kV' luk şalt sahasında çalışan 31 kişinin ve kontrol amacıyla sağlıklı 23 kişinin kanlarından standart yöntemle DNA izole edildi. İzole edilen DNA'larda K-ras geninde, delesyonun/mutasyonun olup olmadığı Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) yöntemiyle araştırıldı. Sadece 2 bireyin SSCP bandında farklılık saptandı.

Anahtar Kelimeler : Elektromanyetik Alan, K-ras, PCR-SSCP

SUMMARY

MOLECULAR ANALYSIS OF K-RAS ONCOGENE IN HUMAN EXPOSED TO ELECTROMAGNETIC FIELDS

It is supposed that many factors are effective in human cancer progression. Among the genes

Yazışma Adresi :

Dr. M. Emin ERDAL

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.

Yenişehir Kampüsü 33160- Mersin

e-mail: merdal@mersin.edu.tr

affected tumor suppressor genes, protooncogenes and oncogenes play a key role. The point mutations that occur at the 12th, 13th and 61st codons of K-ras oncogene which is a Ras oncogene family member, cause tumorigenesis. The studies revealed that the electromagnetic fields (EMF) induce the cells to divide, which accelerate tumor progression and raises the frequency of cancer events in humans who are exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) for a long time. The molecular studies are not enough to enlighten the debate about this issue. In this study, to detect the deletions/mutations of the K-ras gene, an oncogene which causes cancer, the DNAs were isolated from the blood of the 31 workers of the Gaziantep, Erzin and Elbistan 380kV electricity substation and 23 healthy donors as a control group, using a standard method. The deletions/mutations of the K-ras gene were examined using Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). Only 2 of the workers showed a shifted SSCP band.

Key Words: Electromagnetic Fields, K-ras, PCR-SSCP

GİRİŞ

İnsanda kanser oluşumuna birçok faktörün etkili olduğu ileri sürülmektedir. Bunların başında tümör süpresör genleri, protoonkogenler ve onkogenlerde meydana gelen düzensizlikler ilk sırada yer almaktadır. Ras onkogen familyasında yer alan K-ras onkogeninin 12., 13. ve 61. kodonunda meydana gelen nokta mutasyonlar tümör oluşumuna yol açmaktadır. Yapılan araştırmalarda elektromanyetik alanların hücreleri bölünmeye sevk ederek tümör gelişimini hızlandırdığı ve uzun süreli oldukça düşük frekanslı (Extremely Low-Frequency, ELF) elektromanyetik alanlara maruz kalan kişilerde kanser oluşum sıklığının arttığı bildirilmektedir. (1-3). Bu konuda moleküler düzeyde çalışmalar yeterli olmayıp tartışmalar devam etmektedir. Enerji iletim hatlarının çevresinde yüksek gerilim ve akımlardan dolayı elektrik ve manyetik alanlar meydana gelmektedir. İnsan duyu organlarıyla algılanamayan bu alanların insan organizmasını büyük ölçüde etkilediği ve olumsuz değişimlere yol açtığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda, yüksek gerilim hatlarının çevresinde oluşan elektromanyetik alanların kanser oluşumunu

arttırdığı immun sistemi baskıladığı, melatonin seviyesini azalttığı, kimyasal reaksiyonların hızlarını ve serbest radikal çiftlerinin oluşum hızlarını arttırdığı ileri sürülmektedir (1-5). Kanser hücre bölünmesi ve farklılaşması ile ilgili genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve diğer hücre fonksiyonlarda düzenleyici role sahip olan tümör süpresör genlerinde ve protoonkogen-onkogenlerde meydana gelen mutasyon/delesyonlar da kansere neden olmaktadır (6-9). Elektromanyetik alanların da hücreleri bölünmeye sevk ederek tümör gelişimini hızlandırdığı ileri sürülmektedir (1-5, 10-12). Ancak, elektromanyetik alanların hücre bölünmesini kontrol eden genlerde ve hücre proliferasyonunda rol oynayan onkogenlerde mutasyon/delesyona neden olup olmadığıyla ilgili araştırmalara rastlanamamıştır. Bu nedenle, elektromanyetik alana maruz kalan yüksek gerilim hattı çalışanlarında çevresel faktörlerin sorumlu tutulduğu kontrolsüz hücre çoğalması ile onkogenlerinden biri olan K-ras genindeki mutasyon/delesyonları belirlemek amacıyla

bu çalışma planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örnekler ve DNA ekstraksiyonu:

Bu araştırmada, Türkiye Elektrik Kurumunun Gaziantep, Erzin ve Elbistan Termik Santralinde 380 kV'luk şalt sahasındaki elektromanyetik alanda, 3-15 yıldan beri günde yaklaşık 8 saat çalışan 31 bireyden ve kontrol amacıyla sağlıklı 23 kişiden alınan 10 ml'lik EDTA'lı kanlar kullanıldı. Genomik DNA'lar standart Fenol-Kloroform ekstraksiyon yöntemine göre elde edildi (13). Elde edilen DNA'lar analiz edilinceye kadar + 4°C'de saklandı.

PCR-SSCP

Bir çift primer (K-ras F 5'-GACTGAATATAACTTGTGG-3' ve K-ras R 5'-CGAATAT-GATCCAACAATAG-3') kullanılarak 112bp'lık K-ras onkogeni amplifiye edildi (6).

PCR Ortamı:

Distile Su.....	32µ l
10X PCR Buffer (MBI Fermentas)..	5 µl
dNTPs (2mM).....	5 µl
Primer K-ras F (10 pmol).....	1µ l
Primer K-ras R (10 pmol).....	1 µl
Taq polymerase (MBI Fermentas)...	2.5 U
MgCl ₂ (25 mM).....	6µ l
Genomik DNA	1µ l

PCR Şartları:

94° C	2 dak.	1 Döngü
94° C	30 sn.	↑ 35 Döngü ↓
53° C	30 sn.	
72° C	1 dak.	
72° C	5 dak.	

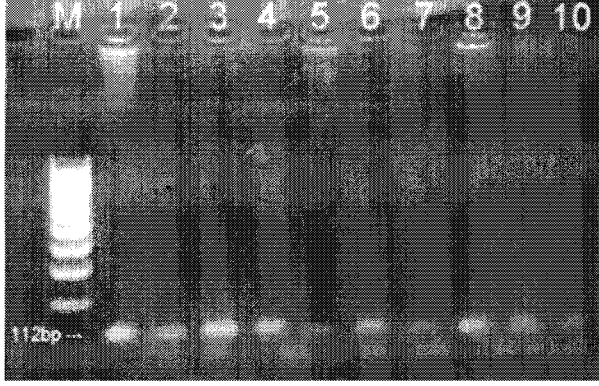
PCR işlemi otomatik bir Termal Cycler (Techne Genius) kullanılarak gerçekleştirildi. PCR ürünleri ve DNA Molecular Weight-Marker

100bp (MBI Fermentas) , 0.5 µg/ml Ethidium Bromide içeren % 1.7 agarose-TBE jellde ilk 5 dakikada 70 V, daha sonra 90V'da yaklaşık 45 dakikada elektroforez yapılarak yürütüldü. 112bp'lık K-ras geninin analizi bir jel elektroforez görüntüleme sistemiyle (Gel Electrophoresis Visualing System Vilber Lourmat) yapıldı. K-ras genindeki mutasyonları gözlemede, daha önceden kullanılan yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak SSCP yöntemi kullanıldı (14). PCR ürününün 3 µl' si Loading Buffer'ın (% 95 deionized Formamide, 20 mmol/L EDTA, % 0.05 Bromophenol Blue, % 0.05 Xylene Cyanol FF) 3 µl' siyle karıştırıldı. Karışım 5 dak. 95° C'de denatüre edildi ve DNA zincirlerinin yeniden bağlanmalarını önlemek için hemen buz içersine konuldu. Daha sonra karışım; % 10 gliserol içeren ve içermeyen % 10 nondenetüre poliakrilamid jelde (49:1 oranında acrylamide:bis-acrylamide) oda sıcaklığında, 0.6xTBE buffer kullanılarak 220 Voltta 16 saat elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Jeller silver staining yöntemine göre geliştirildi (15).

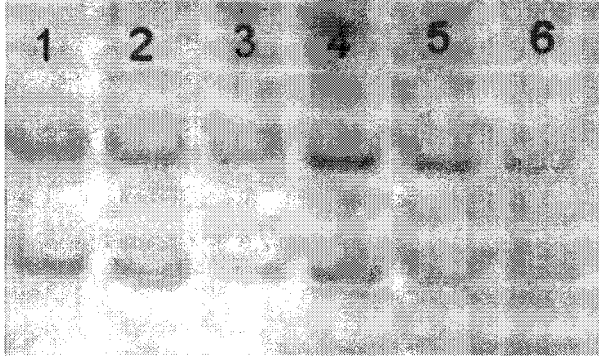
BULGULAR

Türkiye Elektrik Kurumunun Gaziantep, Erzin ve Elbistan Termik Santralinde 380 kV'luk şalt sahasında 3-15 yıldan beri günde yaklaşık 8 saat çalışan 31 bireyden ve kontrol amacıyla sağlıklı 23 kişiden DNA'lar elde edildi. İzole edilen DNA'ların K-ras onkogeninde delesyonun/mutasyonun olup olmadığı PCR-SSCP yöntemiyle araştırıldı. K-ras onkogeninin 112 bp'lık görüntüleri Şekil 1'de görülmektedir. Çalışma grubumuzu oluşturan bireylerde K-ras onkogeninde delesyon/mutasyon bulunamadı. Bununla birlikte, iki bireyin SSCP alanizinde DNA bantlarının dağılımında farklılık gözlemlendi (Şekil 2). Bu farklılığın ne türlü bir düzensizlik olduğunun belirlenmesi ileri araştırmaları gerektirmektedir.

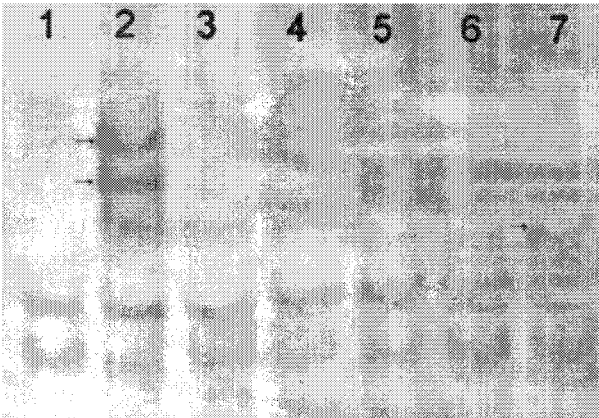
Şekil 1. Yüksek gerilim hattı çalışanlarına ait K-ras onkogeninin PCR ürününün jeldeki görünümü (M, Marker 100bp, diğerleri bireylere ait örnekler).



Şekil 2. A) Kontrol bireylere ait K-ras onkogeninin SSCP örnekleri,



Şekil 2.B) Yüksek gerilim hattı çalışanlarına ait K-ras onkogeninin SSCP analiz örnekleri (Farklılık gösteren örnekler ok işaretiyle gösterilmiştir).



TARTIŞMA

Elektromanyetik alana maruz kalan bireylerde K-ras onkogeninde delesyon/mutasyon saptanamadı. Fakat, iki bireyde, SSCP analizinde farklı fraksiyon dağılımı saptanmış olmakla beraber, bu durumun ne tür bir düzensizlik olduğu konusunda daha ayrıntılı (DNA Sequencing v.s) çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu düzensizliğin elektromanyetik alana maruz kalmayla mı? yoksa sigara, alkol, ilaç kullanımı vs. gibi diğer faktörlere mi? bağlı olduğunun ayırt edilmesi gerekir. İnsan ve hayvanlarla yapılan in vitro ve in vivo deneylerde elektrik ve elektromanyetik alanlarının karbohidrat, nükleik asit ve protein metabolizmalarını değiştirdiği, hormonal ve immun cevapları etkilediği, dokularda yapısal değişiklikler yarattığı, hücre bölünmesini ve gelişimini etkilediği, hücre solunumu azalttığı ve hematolojik parametreleri etkilediği gözlenmiştir (3,12,16,17). Birçok araştırmacı elektromanyetik alanın hücre ve tümör gelişimi üzerine etkilerini araştırmıştır (1,2,10,11,17). Ayrıca, elektromanyetik alanın DNA'da kırılmalar sonucu yapı ve fonksiyon değişikliğine bağlı düzensizlikler meydana getirdiği ileri sürülmektedir (18,19). Elektromanyetik alan hücreleri bölünmeye sevk ederek tümör gelişimini hızlandırmaktadır. 60 Hz frekansdaki ELF alanlara, çocukluk dönemindeki uzun süreli maruz kalma sonucunda, lösemi ve beyin tümörleri oluşum sıklığı artmaktadır (3,4). 80 T ve üzerindeki değerlerde memeli hücrelerinde gelişim hızının arttığı, bölünmenin aktif halde devam ettiği gözlenmiştir. Statik manyetik ve elektrik alanın organizmada anti-kanserojen olarak görev yapan melatonin üretimini etkileyerek, melatonin seviyesinin düşmesine neden olarak, kanser riskini arttırdığı bildirilmektedir (4). K-ras onkogeni birçok kanser tipinde araştırılmıştır (6-9). Ras onkogen ailesi (N-ras, H-ras ve K-

ras) 21-kd proteini kodlar (p21). Ras p21 plazma membranının iç yüzeyinde sinyal iletmeye sistemi olarak lokalize olmuştur. K-ras onkogeninde, kodon 12,13 ve 61'de meydana gelen nokta mutasyonlar, Ras p21'in inaktivasyonunu önleyerek, aşırı çalışma sonucu büyümeyi ve hücre transformasyonunu arttırdığı ileri sürülmektedir. Bu mutasyonun sıklıkla, K-ras'ın 12. kodundaki G den T ye değişim şeklinde olduğu bildirilmektedir (20-22). Yüksek gerilim hattı çalışanlarından iki bireyde, SSCP analizinde farklı fraksiyon dağılımı olması, belki de bu bireylerde kodon 12,13 veya 61'de bir mutasyona karşılık gelmektedir. Araştırmanın K-ras onkogeni dışındaki diğer onkogenlerde ve tümör süpressör genlerinin de araştırılması ve örnek sayısının artırılması daha ilginç sonuçlar ortaya çıkaracağı ileri sürülebilir. Bu araştırmalar sonucunda elektrik ve elektromanyetik alanın kanser oluşumuna etkileri konusundaki tartışmalara moleküler düzeyde yanıt bulunabileceği kanısındayız.

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TF. 97.09 kodlu proje).

KAYNAKLAR

1. Misakian M., Sheppard AK, Krause D, Frazier ME and Miller DL: Biological, Physical and Electrical Parameters for in vitro studies with ELF Magnetic and Electric Fields A Primer. Bioelectromagnetics, 1993,2:1-73.
2. Murphy JC, Kaden DA, Warren J and Sivak A: International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Power frequency electric and magnetic fields: A review of genetic toxicology. Mutation Res., 1993, 296:221-240.
3. Foster KR: Electromagnetic Field Effects and Mechanism. IEEE Engineering in Medicine and

Biology, 1996,50-56.

4. Moulder JE: Biological Studies of Power-Frequency Fields and Carcinogenesis. IEEE Engineering in Medicine and Biology, 1996,31-40.
5. Moulder JE: Power-frequency fields and cancer. Crit.Rev.Biomed.Eng., 1998, 26:1-116.
6. Kanamaru R and Ishioka C: Mutations of the p53 gene and other genes involving in human colorectal carcinogenesis. Tohoku. J. Exp. Med., 1992, 168:159-166.
7. Beaupre DM and Kurzrock R: RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. J Clin Oncol, 1999, 17(3): 1071-9.
8. Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, Lamb ML, Kohman LJ and Poesz BJ: Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 1999,17(2): 668-75.
9. Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, Sancho FJ, Peinado MA and Capella G: p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. J Clin Oncol 1999, 17(5):1375-81.
10. Poole C and Ozonoff D: Magnetic Fields and Childhood Cancers, IEEE Engineering in Medicine and Biology, 1996, 41-49.
11. Stephan P and Bren A: Historical Introduction to EMF Health Effects, IEEE Engineering in Medicine and Biology, 1996, 24-30.
12. Stephan P and Bren A: Risk Assessment of EMF on Health, IEEE Engineering in Medicine and Biology, 1996, 77-86.
13. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 1989.

14. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, 86:2766-2770.
15. Oto M, Miyake S and Yuasa Y: Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislab gel electrophoresis apparatus. *Anal. Biochem.*, 1993, 213:19-22.
16. Dacha M, Accorsi A, Pierotti C, Vetrano F, Mantovani R, Guidi G, Conti R and Nicolini P: Studies on the Possible Biological Effects of 50 Hz Electric and/or Magnetic Fields: Evaluation of Some Glycolytic Enzymes, Glycolytic Flux, Energy and Oxido-Reductive Potentials in Human Eritrocytes Exposed in Vitro to Power Frequency Fields. *Bioelectromagnetic*, 1993, 14:383-391.
17. Salvatore JR, Weitberg AB and Mehta S: Nonionizing electromagnetic fields and cancer: a review. *Oncology (Huntingt)*, 1996, 10:563-570, discussion 573-574, 577-578.
18. Fairbairn DW and O'Neill KL: The effect of electromagnetic field exposure on the formation of DNA single strand breaks in human cells. *Cell Mol. Biol.*, 1994, 4:561-567.
19. Fiorani M, Cantoni O, Sestili P, Conti R, Nicolini P, Vetrano F and Dacha M: Electric and/or magnetic field effects on DNA structure and function in cultured human cells. *Mutation Res.*, 1992, 282:25-29.
20. Korn SH, Moerkerk PTM and deGoeij AFPM: K-ras point mutations in routinely processed tissues: Non-radioactive screening by single strand conformational polymorphism analysis. *J. Clin Pathol*, 1993, 46:621-623.
21. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J and Sidransky D: Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 1999, 91(4):332-9.
22. Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Sole M, Capella G, Lluís F, Fernandez-Cruz L, Navarro S and Farre A: K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol*, 1999, 17(2):578-84.