

Epstein-Barr Virüsü ve Gastrik Kanserde DNA Metilasyonu

Epstein-Barr Virus and DNA Methylation in Gastric Cancer

Ayşe Feyda Nursal

Gastrik kanser (GK) tüm dünyada görülme sıklığı yönünden dördüncü ve kanserle ilişkili ölümlerde ikinci sırayı alan bir malignitedir. GK etyolojisinde Helikobakter pilori (H. pilori) ve Epstein-Barr virüs (EBV) gibi enfeksiyon ajanları önemli rol oynamaktadır. EBV Herpes virüs ailesinden, yaklaşık 184 kb boyutunda, çift-dallı DNA virüsüdür ve insan neoplastik hücrelerinde saptanmış olan ilk virüstür. EBV ilişkili gastrik kanser (EBViGK) tüm dünyadaki gastrik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturur. EBViGK'lerinin genetik temelinde tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgesinde DNA hipermetilasyonu sık görülmektedir. EBV enfeksiyonunun metilasyonu nasıl indüklediği tam olarak aydınlatılmamış bir konudur. Bu derlemede, EBViGK'lerdeki gen promotor bölge hipermetilasyonu hakkındaki son literatür gözden geçirilecektir.

Anahtar Kelimeler: Gastrik kanser, Epstein-Barr virüs, DNA hipermetilasyonu

Gastric cancer (GC) is the fourth most common type of malignancy and the second leading cause of cancer death worldwide. Infectious agents such as Helicobacter pylori (H.pylori) and Epstein-Barr virus (EBV) play important role in the etiology in GC. EBV is a double-stranded DNA virus, approximality 184 kb in size, included in Herpes virus family and is the first virus determined in human neoplastic cell. EBV associated gastric cancer (EBVaGC) constitutes approximately 10% of whole GC in wordlwide. DNA hypermethylation in promotor region of tumor supressor genes is seen frequently in the genetic basis of EBCaGC. It is not a clear subject how EBV infection induce the methylation. In this review, the current literature about the gene promotor region hypermethylation in EBVaGCs will be revised.

Keywords: Gastric cancer, Epstein-Barr virus, DNA hypermethylation

Giriş

Gastrik kanser (GK) tüm dünyada görülme sıklığı yönünden dördüncü, kanserle ilişkili ölümlerde ikinci sırayı alan bir malignitedir (1, 2). Multifaktöriyel etyolojiye sahip bir malignite olan GK biyolojik ve genetik yönden heterojen davranış gösterir (3). Patogeneizde esas neden kronik Helikobakter pilori (H. pilori) enfeksiyonudur. Uluslararası kanser araştırmaları ajansı 1994'te H. pilori'yi sınıf I karsinojen olarak kabul etmiştir. Bu sınıflama, güncellenmiş ve 2009'da tekrar onaylanmıştır (3). Gastrik karsinogenez ile ilişkili diğer enfeksiyöz ajan Epstein-Barr virüs (EBV)'tür.

Son dönemlerdeki erken tanı, cerrahi teknik ve perioperatif bakım şartlarındaki gelişmeler GK'nin klinik seyrini iyi yönde etkilemiş olsa da yüksek prevalansı, kötü prognozu ve limitli tedavi seçenekleri nedeniyle GK hala önemli bir sorundur (2). Tanı sırasında hastalığın ileri evrede olması nedeniyle 5 yıllık survi sadece %20-30'dur (4). GK'in fatalite oranı yaygın görülen kolon, meme, prostat kanserlerine göre daha yüksektir.

Gastrik kanser prognozu tanı sırasındaki evresine, uygun tedavi stratejilerinin seçimine bağlıdır. Kanserlerin erken tanı ve tedavi stratejisinde yeni moleküler belirteçlerin belirlenmesi hastalığın klinik seyrini olumlu yönde etkileyecektir. Bu, ancak tümör biyolojik davranışının anlaşılması ile mümkün olacaktır. Bu derlemede EBV ve GK'de görülen DNA hipermetilasyonu arasındaki ilişki hakkındaki son literatür gözden geçirilecektir.

1. DNA metilasyonu

Kanser, genetik ve epigenetik değişikliklerin uzun bir süreçte birikimi ile meydana gelmektedir. Kanserde DNA metilasyonu sık görülür ve "tüm genom hipometilasyonu" ve "bölgesel hipermetilasyon" olmak üzere iki kategoriye ayrılır (5).

Genom hipometilasyonu tüm genomdaki 5-metilsitozin içeriğinin azalması olarak değerlendirilir (5). Bu, özellikle, genomun %40'ından fazlasını oluşturan ve normalde oldukça metile olan tekrar dizilerinde görülür. Hemen hemen tüm kanserlerde görülen genom hipometilasyonu genomik instabiliteye yol açarak kanserin ilerlemesini artırır (5).

DNA metilasyonu CpG adacıklarındaki sitozin rezidularının beşinci karbonuna metil (CH₃) grubunun eklenmesi ile meydana gelir (2, 6). Genomdaki tüm genlerin yaklaşık yarısının promotor

Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik
Anabilim Dalı, Giresun, Türkiye

Address for Correspondence

Yazışma Adresi:

Ayşe Feyda Nursal
E-posta: feydanursal@hotmail.com

Received/Geliş Tarihi:
02.05.2015

Accepted/Kabul Tarihi:
05.10.2015

© Copyright 2016 by Available online at
www.istanbulmedicaljournal.org

© Telif Hakkı 2016 Makale metnine
www.istanbulmedicaljournal.org web sayfasından ulaşılabilir.

bölgelerinde yer alan CpG adacıkları guanin ve sitozinden zengin bölgelerdir. DNA metilasyonu fizyolojik olarak, X kromozom inaktivasyonu, embriyogenez evresinde farklılaşma, genomik imprinting gibi olaylarda görülmektedir (6).

DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar (DNMT) adı verilen enzimler ile katalize edilir (6). DNA metilasyonun devamlılığı DNMT1 enzimi ile gerçekleşirken, DNMT3a ve DNMT3b enzimleri de novo DNA metilasyonunda görev yaparlar (7). Gen promotor bölgenin hipermetilasyonu ile transkripsiyon baskılanır. Bu, tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybına yol açan major nedenlerden birisidir (5). Promotor bölge hipermetilasyonu kanserin erken evrelerinde, yaygın olarak görülür (4). Tümör DNA'sının metilasyon özelliği kanserde tarama, tanı, prognoz ve tedavi biobelirteci olarak kullanılabilir. Gastrik karsinogenezde kanserle ilişkili bazı genlerde promotor bölge hipermetilasyonu sık görülen genetik değişikliklerdendir.

2. EBV

Epstein-Barr virüs yaklaşık 184 kbp boyutunda, çift-dallı, gama-herpes virüs ailesinden bir DNA virüsüdür (7). EBV ilk olarak 1964'te in vitro olarak insan Burkitt lenfoma hücre hatlarından derivate hücrelerde saptanmıştır. EBV genomu 1990 yılında, EBV'nin kodladığı küçük ribonükleik asit 1 (EBER1) için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve in situ hibridizasyon (ISH) metodu kullanılarak saptanmıştır (8).

Epstein-Barr virüs dünya popülasyonunun %95'ini enfekte etmektedir. EBV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu asemptomatik kalırken, enfekte kişilerin küçük bir kısmında hematopoetik, mezenseyal ve epitelial tümörler gelişir. Tümör oluşumu EBV viral proteinleri ve mikroRNA'lar (miRNAs) vasıtasıyla olmaktadır (9). EBV ile ilişkili maligniteler üç kategoride sınıflandırılabilir (10). Bu sınıflama ve bazı malignite örnekleri şöyledir;

- Lenfoproliferatif hastalıklar:
Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, post-transplantasyon lenfoproliferatif bozukluklar, plazmablastik lenfoma, Hodgkin lenfoma, Burkitt lenfoma, HIV enfeksiyonu ile ilişkili lenfomalar.
- Epitelial kanserler:
Nazofaringeal kanser, lenfoepitelial benzeri karsinom, gastrik karsinom
- Sarkomlar ve diğer yumuşak doku tümörleri:
Foliküler dendritik hücreli sarkomun enflamatuvar pseudotümör varyantı, post-transplantasyon düz kas tümörü

Epstein-Barr virüs primer olarak tükrük ile orofaringeal epitelial hücrelerden girer (10). İmmün sistemi normal sağlıklı kişileri enfekte eder ve bellek B lenfositlerinde ömür boyunca latent şekilde yaşamını sürdürür. Konakçı immün gözetiminden kaçabilmesi için bu hücrelerde 1-2 viral protein eksprese ederek kendini sınırlar. Bu durum latent 0/1 evresi olarak tanımlanır.

Nazofaringeal kanserlerin (NFK) ve Hodgkin lenfoma gibi EBV ilişkili bazı malignitelerde latent membran protein 1 (LMP-1) dahil en az 3 viral eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu tip 2 latent evre olarak adlandırılır. Viral enfeksiyonu olan bu malignitelerin immün sistemden nasıl kaçabildiği tam olarak belli değildir. B lenfositlerin in vitro enfeksiyonu immortalizasyon ve lenfoblastoid hücre hatlarının devamı ile sonuçlanır. Bu hücrelerde, en azından 6 EBV nükleer antijen (EBNAs), 3 latent membran proteini (LMPs) ve 2 protein kodlamayan küçük RNA (EBER) dahil çok sayıda farklı EBV latent

ürün eksprese edilmektedir. Ayrıca birkaç mikroRNA'nın eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu, tip 3 latent veya büyüme programı olarak isimlendirilir (11).

Onkogeneze oldukça kabul gören teori, transformasyon olduğunda, neoplastik hücrelerin hücresel gelişim veya maturasyon evresinde kaldığı şeklindedir (10).

3. EBV ve Gastrik kanser

Epstein-Barr virüs'ün farklı malignitelerdeki onkogenik rolü konakçının genel immün sistemi ve hücre tipine göre değişmektedir (12). Nazofaringeal kanserlerin (NFK) neredeyse tamamı EBV ile ilişkilidir, Güney Çin ve Güney Asya'da yaygın görülmektedir.

Epstein-Barr virüs ilişkili GK'lerde (EBViGK) ise bölgesel ve ırk farkı görülmemektedir. EBViGK'ler herhangi bir bölgesel yığılım göstermeden tüm dünyada uniform şekilde dağılım göstermektedir. EBViGK'ler tüm gastrik kanser olgularının %10'unu teşkil eder, ancak endemik bir hastalık değildir (13). EBV enfeksiyonu gastrik adenokarsinomların %16'sı ve lenfoepitelioma benzeri gastrik karsinomların %89'ı olmak üzere iki tip GK'de saptanır (13). EBViGK'ler EBV taşıyan tümör hücrelerinin monoklonal proliferasyonu özelliğini gösterir (8).

Epstein-Barr virüs ilişkili GK'ler EBV negatif GK'lere göre bazı farklı klinikopatolojik özelliklere sahiptir. EBViGK'lerin özellikleri şöyle sıralanabilir (9).

- Yaş → genç yaş
- Cinsiyet → çoğunlukla erkek
- Prevalans → GK'lerin %10'u
- Eşlik eden bulgu → sigara
- Yerleşim → mide proksimal kısmı
- Klinik → mide duvarının kalınlaşması, ülser, lenf nodu tutulumu az
- Histoloji → atrofik gastrit, mukozada dantel görünümü, orta dereceden kötüye dek değişen adenokarsinom
- Prognoz → uzun yaşam süresi

Epstein-Barr virus konakçı gastrik epitel hücreleri direk veya indirek olarak enfekte eder. Direk enfeksiyonda, viral zarf glikoprotein BMRF-2 hücresel β 1 integrinlerle etkileşime girer. Takiben, viral protein gH/gL hücresel α v β 6/8 integrinlere bağlanır ve epitelial hücre membranlarının viral zarf ile füzyonunu hedefler (9).

Epstein-Barr virüs tercihen B lenfositleri enfekte eder. B hücre invazyonunda, EBV zarf glikoproteinleri gp350/220 B hücre reseptörü CD21 ve/veya CD35'e bağlanır. Eş zamanlı olarak, viral glikoprotein gp24, EBV'nin B hücreleri içine girmesini sağlayan, B hücre membranı üzerindeki insan lökosit antijen (HLA) sınıf II molekülleri ile etkileşir (9). Epitelial hücre invazyonunun mekanizması tam olarak açıklanmış değildir.

Epstein-Barr virüs ilişkili GK'lerde EBER, EBNA1, BARTs, LMP2A ve BARF1 genleri eksprese olur. LMP1 ve LMP2 epitelial ve lenfoid hücrelerin tümör transformasyonunda önemli rol oynayan onkogenik EBV proteinleridir. LMP1 EBViGK'lerde sıklıkla eksprese olmaz veya düşük seviyede eksprese olur (14). EBViGK'lerin yarısı LMP2A eksprese eder. LMP2A EBViGK'lerin onkogenik sürecinde önemli rol oynar. LMP2A JAK/STAT3 ve PI3K/AKT sinyal yolağı dahil çeşitli hücresel sinyallerini aktive eder. LMP2A protein seviyesinde transkripsiyonel DNMT1, DNMT3b ve BMI1 ekspresyonunu düzenler (14).

Epstein-Barr virüs enfeksiyonunu tanımlamak için en hassas metot EBER1-ISH metodudur. Üst gastrointestinal sistem endoskopisi geçiren hastaların gastrik mukozal biopsi örneklerine EBER1-ISH uygulanması EBViGK tanısında çok faydalıdır. EBViGK'li hastalarda EBV erken antijen ve EBV kapsid antijenine karşı serum antikor değeri yüksektir. Ancak, EBNA1 antikor titresi sağlıklı ve hasta kişiler arasında belirgin bir fark göstermez (8).

4. EBViGK'de genetik ve DNA hipermetilasyonu

Gastrik kanser genetik açıdan oldukça kompleks ve heterogen bir yapı sergiler. Solid tümörlerde fazla görülen kromozomal değişiklikler ve mikrosatellit instabilitesi EBViGK'lerde sık görülen genetik değişikliklerden değildir (1). Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (KGH) yöntemi ile yapılan analizlerde kromozomal kayıp veya kazancın çok az olduğu gösterilmiştir.

Epstein-Barr virüs ile enfekte ve non-enfekte GK hücre hatları arasında promotör metilasyonunu kıyaslayan tüm genom çalışmalarında hücre adezyon molekülleri, wnt ve mitogen-aktive protein kinaz yolağı gibi incelenen yüzlerce genin EBV enfeksiyonunu takiben hipermetile olduğu gözlenmiştir (9).

Geddert ve ark. (15) çalışmasında EBViGK'lerde p16, p14 ve APC genlerinin EBV negatif GK'lere göre daha fazla metilasyon özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Ushiku ve ark. (16) TP73 geninin, Zhao ve ark. (17) somatostatin reseptör 1 geninin, Okada ve ark. (18) TP73, BLU, FSD1, BCL7A, MARK1, SCR1 ve NKX3.1 genlerinde metilasyon sıklığının EBViGK'de daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Zhao ve ark.'nın (19) çalışmasında EBV pozitif ve EBV negatif GK hücre hatları (EBER ISH ile konfirme edilerek) karşılaştırıldığında EBV pozitif GK hücre hatlarında EBV negatif hücre hatlarına kıyasla DNMT3b mRNA ve protein ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir.

Epstein-Barr virüs latent genleri sinyal yollarındaki düzenlenmeyi bozar ve genlerin eksprese olmaları tümör oluşumunu başlatır, DNA metilasyonu etkilenebilir. LMP1 latent I/II evresinde eksprese edilen transmembran proteindir ve çeşitli yolları aktive eder (7). Tsai ve ark. (20) NFK hücre hattında LMP1'in DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b'i upregüle etmesi ile CDH1 genini regülasyonunu bozduğunu bildirmişlerdir. Hino ve ark. (21) ise GK'de LMP2'nin DNMT1 ekspresyonunu STAT3 fosforilasyonu yoluyla 5 kat arttırdığını ve PTEN gen metilasyonunun 96 saatte 5 kat arttığını rapor etmişlerdir.

Bu sonuçlar EBV latent genlerinin DNMT enzimlerini aktive edebileceğini ve gen promotör bölge metilasyonuna neden olabileceğini düşündürmektedir.

LMP2A'nın EBViGK'lerde eksprese edilmesine rağmen, EBViGK hastalarında LMP2A antikorunun genellikle negatif bulunması da ilginç bir konudur (8).

5. EBV ilişkili metilasyonun klinik uygulaması

Epstein-Barr virüs ile ilişkili metilasyon klinik yönden önem taşımaktadır. Çünkü EBV pozitif olan tümörlerin farklı metilasyon özelliğine sahip olması erken tanıda hassas bir ölçüm metodu olarak değerlendirilmelidir. DNA metilasyonu karsinogenezin erken evrelerinde meydana geldiği için prekanseröz lezyonlar önemlidir. GK'ın erken tanısında gastrik yıkama sıvısında kansere spesifik me-

tilasyon özelliği incelenebilir. Ayrıca erken tanı için serum örnekleri de kullanılabilir (2).

Kanserdeki bozulmuş olan DNA metilasyonu geri dönüşümlü bir olaydır. Günümüzde epigenetik modifikasyonları katalize eden enzimler önemli farmakolojik hedef haline gelmiştir. Özellikle, DNA metiltransferaz enzimlerini inhibe eden ve tümör baskılayıcı gen sessizleşmesini tersine çeviren demetile edici ajanlar GK'de anti-neoplastik tedavi için potansiyel bir strateji oluşturmaktadır (9).

Sonuç

Dünyanın her tarafında görülen bir malignite olan EBViGK'lerin EBV negatif olanlara göre farklı klinikopatolojik özellikler sergilemesi karsinogenezinde farklı moleküler mekanizmaların rol aldığını düşündürmektedir. EBViGK'de görülen DNA hipermetilasyonun biyolojik temeli tam anlaşılamamıştır. Konunun aydınlatılması için çalışmaların devamı gerekmektedir. Diğer malignitelerde olduğu gibi GK'de tümör moleküler yapısının anlaşılması de erken tanı ve tedavi için yeni biobelirteçlerin gündeme gelmesini sağlayacaktır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadığını belirtmiştir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

1. Ryan JL, Jones RJ, Kenney SC, Rivenbark AG, Tang W, Knight ER, et al. Epstein-Barr virus-specific methylation of human genes in gastric cancer cells. *Infect Agent Cancer* 2010; 5: 27. [\[CrossRef\]](#)
2. Nakamura J, Tanaka T, Kitajima Y, Noshiro H, Miyazaki K. Methylation-mediated gene silencing as biomarkers of gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 11991-2006. [\[CrossRef\]](#)
3. Park JY, von Karsa L, Herrero R. Prevention strategies for gastric cancer: a global perspective. *Clin Endosc* 2014; 47: 478-89. [\[CrossRef\]](#)
4. Shi J, Qu YP, Hou P. Pathogenetic mechanisms in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 13804-19. [\[CrossRef\]](#)
5. Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, Kaneda A. DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 3916-26. [\[CrossRef\]](#)
6. Qu Y, Dang S, Hou P. Gene methylation in gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2013; 424: 53-65. [\[CrossRef\]](#)
7. Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res* 2012; 72: 3445-50. [\[CrossRef\]](#)
8. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M, Yoshiyama H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses* 2012; 4: 3420-39. [\[CrossRef\]](#)
9. Yau TO, Tang CM, Yu J. Epigenetic dysregulation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: disease and treatments. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6448-56. [\[CrossRef\]](#)

10. Tse E, Kwong YL. Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp Mol Med* 2015; 47: 136. [\[CrossRef\]](#)
11. Khan G, Hashim MJ. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. *Infect Agent Cancer* 2014; 9: 38. [\[CrossRef\]](#)
12. Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int* 2010; 60: 337-50. [\[CrossRef\]](#)
13. Tsao SW, Tsang CM, To KF, Lo KW. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 2015; 235: 323-33. [\[CrossRef\]](#)
14. Li L, Zhang Y, Guo BB, Chan FK, Tao Q. Oncogenic induction of cellular high CpG methylation by Epstein-Barr virus in malignant epithelial cells. *Chin J Cancer* 2014; 33: 604-8. [\[CrossRef\]](#)
15. Gedder H, Zur Hausen A, Gabbert HE, Sarbia M. BV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2010; 33: 143-9. [\[CrossRef\]](#)
16. Ushiku T, Chong JM, Uozaki H, Hino R, Chang MS, Sudo M, et al. p73 gene promoter methylation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2007; 120: 60-6. [\[CrossRef\]](#)
17. Zhao J, Liang Q, Cheung KF, Kang W, Dong Y, Lung RW, et al. Somatostatin receptor 1, a novel EBV-associated CpG hypermethylated gene, contributes to the pathogenesis of EBV-associated gastric cancer. *Br J Cancer* 2013; 108: 2557-64. [\[CrossRef\]](#)
18. Okada T, Nakamura M, Nishikawa J, Sakai K, Zhang Y, Saito M, et al. Identification of genes specifically methylated in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Cancer Sci* 2013; 104: 1309-14. [\[CrossRef\]](#)
19. Zhao J, Liang Q, Cheung KF, Kang W, Lung RW, Tong JH, et al. Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells. *Cancer* 2013; 119: 304-12. [\[CrossRef\]](#)
20. Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, Chang HY, Chang YS. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the down-regulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10084-9. [\[CrossRef\]](#)
21. Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 2766-74. [\[CrossRef\]](#)