مقاله پژوهشی

بررسی جهش در اگزون ۷ ژن اکسین ۲ در سرطان کولورکتال (مطالعات آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی)

عطیه جلالی‌فر[۱]، شهلا محمدگنجی*[۲]، زرین مینوچهر[۳]، محمود خانیکی[۴]، بهروز عباس‌زاده مؤخر[۵]

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۲/۰۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان کولون و رکتوم (Colorectal cancer)در ایران سومین سرطان شایع محسوب می‌شود. تغییر در مسیر پیام‌رسانی WNT به‌صورت رایج در این سرطان گزارش شده است. از فعالیت‌های مهم این مسیر می‌توان به نقش در سرطان‌زایی، تکثیر سلولی، مهاجرت سلولی و... اشاره کرد. اکسین۲ (axin2) به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی (Negative regulator) در مسیر پیام‌رسانی WNT/TCF فعالیت کرده و در شکل‌گیری کمپلکس تخریب بتاکاتنین کمک می‌کند؛ تحقیقات انجام‌گرفته نشان داده است که این پروتئین در بسیاری از موارد ابتلا به سرطان CRC دچار جهش شده است. هدف این پروژه مطالعه روی SNP با شناسه rs370618491 نوکلئوتید C۲۱۴۰T در اگزون۷ ژن اکسین۲ و بررسی نقش احتمالی جهش در این SNP در سرطان کلورکتال است.

مواد و روش کار: در این پروژه ۱۴۷نمونه خون و بافت توموری فریز شده و ۲۵ نمونه شاهد و همچنین ۳ رده‌سلولی سرطان کولورکتال HT۲۹، SW ۴۸۰ و CACO-۲ استفاده شده است. انتخاب SNP به‌کمک روش‌های بیوانفورماتیکی ازجمله استفاده از پایگاه اطلاعات NCBI و Ensembl و ابزار polyphen انجام شده است، استخراج DNA به روش فنول-کلروفرم انجام‌شده و روش آزمایشگاهی PCR-RFLP استفاده شده است؛ آنالیز آماری اطلاعات دموگرافی و کلینیکی بیماران نیز به کمک نرم‌افزار SPSS موردبررسی قرار گرفته است .

یافته‌ها: در ۱ نمونه از ۱۴۷ نمونه بیمار (۰،۶۸ درصد)، جهش در جایگاه SNP موردنظر مشاهده شد و در سایر نمونه‌ها ازجمله رده‌های سلولی موردبررسی جهشی مشاهده نشد. نتایج تحلیل SPSS نشان داد که در این مطالعه سایز تومور(T) با P= ۰،۰۱۶ و درجه انتشار تومور به غدد لنفاوی (N) با P= ۰،۰۰۱ با درجه پیشرفت بیماری(grade) ارتباط معنی‌دار دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: فراوانی این SNP در جمعیت ایرانی پایین است؛ بنابراین علی‌رغم اهمیت اگزون۷ ژن اکسین۲ در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، نتایج آزمایشگاهی هم‌سو با نتایج مطالعاتی نبود. برخی عوامل ازجمله تنوع بالا در عوامل مؤثر در ابتلا به سرطان کولورکتال و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت ایرانی می‌تواند در این زمینه تأثیرگذار باشد. با توجه به اهمیت اکسین۲ در مسیر WNT و میزان بالای جهش‌های مشاهده‌شده در مطالعات گذشته، بررسی میزان بیان ژن اکسین۲ و همچنین کیفیت عملکرد پروتئین آن می‌تواند در مطالعات آینده حائز اهمیت بوده و موردتوجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: اکسین۲، اگزون۷، SNP، سرطان کولون و رکتوم، RFLP

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره چهارم، ص ۲۶۹-۲۶۴، تیر ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: تهران، کیلومتر ۱۷ اتوبان تهران کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۶۶

Email: shahlamg@yahoo.com

مقدمه

سرطان کولون و رکتوم[1] به رشد سلول‌های سرطانی در کولون یا رکتوم (بخشی از روده بزرگ) گفته می‌شود(۱). این بیماری به دلیل رشد غیرطبیعی سلول‌ها اتفاق می‌افتد که می‌توانند به بافت‌های دیگر بدن حمله کنند یا در آن‌ها تکثیر یابند (۲). در جهان

[۱] کارشناسی ارشد زیست سلولی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۲ استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار بیوفیزیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۴] استادیار آسیب‌شناسی بالینی و تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵ کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر واحد تهران

[1] colorectal cancer (CRC)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-08-10]

سالانه ۱/۵ میلیون مورد جدید از این بیماری گزارش می‌شود و بعد از سرطان پوست، پستان و معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌هاست(۳). در ایران نیز سالانه ۳۸۰۰-۴۰۰۰ مورد ابتلا به این بیماری گزارش شده است. در ایران شایع‌ترین سرطان در میان مردان سرطان معده و پس‌ازآن سرطان مثانه و سرطان روده بزرگ است. در میان زن‌ها شایع‌ترین سرطان‌ها، سرطان‌های سینه، پوست و سپس معده است. ولی شایع‌ترین سرطانی که باعث مرگ در هر دو جنس می‌شود، سرطان معده است(۴). این بیماری علی‌رغم کشنده بودن قابل‌پیشگیری است و به دلیل افزایش میزان ابتلا به CRC در سال-های اخیر از اهمیت خاصی برخوردار است(۵). غربالگری در کاهش احتمال مرگ ناشی از سرطان روده بزرگ مؤثر بوده و با شروع سن ۵۰ سالگی و بعدازآن به‌صورت مداوم تا سن ۷۵ سالگی توصیه می‌شود (۶).

در سطح مولکولی، فعالیت‌های زیستی متفاوت از طریق مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی مختلف روی می‌دهد؛ ازجمله مسیر متعارف WNT که یک مسیر پیام‌رسانی خارج سلولی برای فعال شدن بتاکاتنین است. بتاکاتنین یک پروتئین با چندین عملکرد است و برای تعدیل رونویسی از ژن‌های هدف مسیر WNT فعالیت می‌کند (۷). اکسین ۲ یک تنظیم‌کننده منفی در مسیر پیام‌رسانی WNT / TCFاست و در شکل‌گیری کمپلکس تخریب بتاکاتنین کمک کرده؛ بنابراین یک بازخورد منفی در مسیر WNT ایجاد می-کند (۹,۸). در سرطان‌های کولونی که سیستم تعمیر عدم تطابق[2] آن‌ها ناکارآمد است جهش در ژن اکسین ۲ منجر به افزایش غلظت بتاکاتنین می‌شود (۱۰). آنالیزهای هیبریداسیون فلوئورسنس در محل نیز نشان می‌دهد اکسین۲ در سرطان‌های پستان و نوروبلاستوما و سایر تومورها به‌تکرار هتروزیگوسیتی خود را از دست می‌دهد (۱۱). جهش‌های اکسین۲ عمدتاً به‌صورت کوتاه شدن نابهنگام دومین C-ترمینال این پروتئین است؛ اگرچه به نظر می‌رسد که این جهش‌ها فقط روی یکی از آلل‌های این ژن اثر دارد. جالب‌توجه این است که جهش اکسین۲ در سلول‌های جنسی خانواده‌ایی که مبتلابه CRC خانوادگی بوده‌اند، دیده‌شده است(۱۲). آلل‌های اکسین۲ با تعویض‌های بدمعنی[3] در چندین بیمار مبتلا به پولیپ‌های متعدد شناسایی شده است؛ اگرچه ارتباط این جهش‌ها کاملاً روشن نیست(۱۳). هدف این پروژه بررسی نقش احتمالی جهش در SNP با شناسه rs370618491 نوکلئوتید C2140T در اگزون ۷ اکسین ۲ در نمونه‌های بیماران مبتلابه سرطان کلورکتال و ابتلا به این بیماری است.

مواد و روش کار

الف- مطالعات بیوانفورماتیکی

بررسی ژن اکسین۲ و پروتئین حاصل از آن به‌روش بیوانفورماتیکی انجام گرفته است؛ نوکلئوتیدها و آمینواسیدهای موجود در این پروتئین در بانک اطلاعاتی NCBI مورد جستجو قرار گرفت. بعد از بررسی نوکئوتیدهای ژن موردنظر، به‌کمک استفاده از ابزار ژنومی ensembl موقعیت اگزون‌های اکسین۲ بررسی شد، سپس در بین انواع SNPها، SNPهای بدمعنی در ابزار PolyPhen-2 بررسی شد(این ابزار با توجه به میزان اهمیت SNPها در احتمال بیماری‌زایی به هرکدام درجه ۰-۱ می‌دهد؛ به‌این‌ترتیب که ۰ دارای کم‌ترین اهمیت و ۱ دارای بیشترین اهمیت ازنظر ریسک بیماری است). SNP با موقعیت ۱۷: ۶۵۵۳۶۹۵۰ بر روی اگزون۷ ژن اکسین۲ نوکلئوتید C در کدون cCc/cTc با جایگاه نوکلئوتیدی P609L (C2140T) انتخاب شد (شرط گزینش SNP در این مطالعه داشتن درجه اهمیت۱ و همچنین وجود آنزیم اختصاصی برای نوکلئوتید موردبررسی است)؛ با استفاده از ابزار NEBcutter آنزیم اختصاصی BsoB1 با جایگاه برش C^YCGR_G برای هضم آنزیمی SNP موردنظر انتخاب شد. (در این پروژه از ایزوشیزومر BsoB1 (آنزیم Ava۱) استفاده شده است.)

ب- نمونه‌گیری

۱۷۲ نمونه در این پروژه استفاده شد؛ شامل ۱۴۷نمونه فریز شده بیماران (۹۲ بافت توموری/۵۵ نمونه خون) و ۲۵ نمونه شاهد؛ علاوه بر آن از ۳ رده‌سلولی سرطان CRC شامل HT29، SW480 و CACO-2 نیز به‌منظور بررسی بیشتر، پیرامون اهمیت موضوع موردبحث استفاده شد. انتخاب نمونه‌ها به‌صورت تصادفی انجام و پرسشنامه و رضایت‌نامه از بیماران اخذ شد؛ برخی از بیماران به دلیل بی‌سوادی، بدحالی، نداشتن همراه و... ناقص پر کردند. سن بیماران بین ۱۵ سال تا ۸۳ سال است؛ در بین آن‌ها ۵۵ درصد مرد، ۳۵ درصد زن و جنسیت ۱۰ درصد نامعلوم است.

ج- تعیین ژنوتیپ

در این پروژه برای استخراج DNA از نمونه‌ها و رده‌های سلولی سرطانی از روش فنول-کلرفرم استفاده شده است. به‌منظور بررسی کیفیت DNAهای استخراج‌شده از الکتروفورز افقی و به‌منظور بررسی کمیت و خلوص DNAها از نانودراپ استفاده شده است. طراحی پرایمر با نرم‌افزارهای oligo7 و gene runner انجام شد و PCR اگزون۷ در ژن اکسین۲ انجام شد؛ با در نظر گرفتن این نکته که ناحیه‌ایی که به کمک پرایمر ساخته می‌شود، دارای آنزیم برش دهنده اختصاصی باشد، به این منظور از سایت NEBcutter نیز

[2] mismatch

[3] Missense

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-08-10]

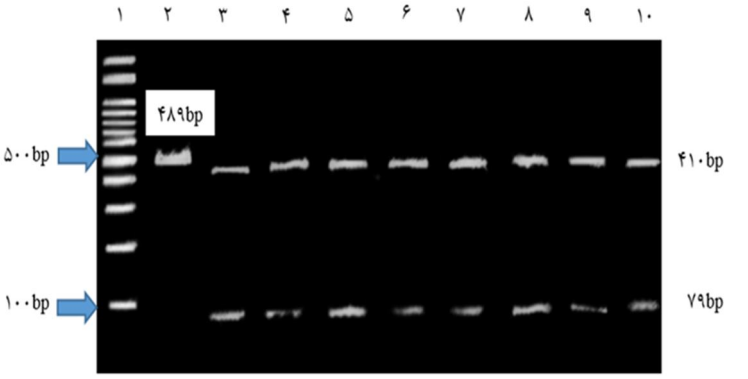
استفاده شد. توالی پرایمر Forward دارای ۱۹ نوکلئوتید شامل CAAGGCTCCGGAAACCATG و توالی پرایمر Reverse نیز داری ۱۹ نوکلئوتید شامل ATGGGGCTTGGGCTTGCTC بوده و اندازه قطعه ایجادشده ۴۶۹ جفت باز است . برای انجام PCR مقدار ۱۰µl مستر میکس، از هر پرایمر ۲ µl با غلظت ۱۰ pM به همراه ۵ µl آب دیونیزه و ۱µl از DNA هر نمونه استفاده شد. دمای اتصال پرایمرها ۶۰C° تعیین شد و تعداد سیکل ۳۵ بود. محصول PCR به‌دست‌آمده از نمونه‌ها برای برش با آنزیم BsoB1 آماده شد؛ برای انکوباسیون و هضم هر نمونه مقدار ۵ µl محصول PCR، ۱ µl بافر tango با غلظت ۱۰ X، ۰/۵ µl آنزیم Ava1 با غلظت ۱۰u/ µl و ۹µl آب دیونیزه استفاده شد. مدت‌زمان موردنیاز برای بهینه فعالیت آنزیم ۱ ساعت بود و این آنزیم توالی‌های نرمال را برش می‌زند. بعد از هضم آنزیمی، برش یا عدم برش نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز افقی مشخص شد.

د- آنالیز آماری

آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS 16.0 نشان داد که ۵۵،۷درصد از نمونه‌ها مرد و ۳۵درصد زن هستند. میزان ابتلا به سرطان کولورکتال نیز با افزایش سن بیماران رابطه مستقیم دارد (کم‌تر از ۴۰ سال ۱۵،۷درصد و بیشتر از ۴۰ سال ۷۴،۳درصد). سطح معنی-داری با آزمون ANOVA انجام شد و نتایج آن نشان داد که در این مطالعه P-value برای دو متغیر درجه سرطان و سایز تومور ۰،۰۱۶ شده و بنابراین کم‌تر از ۰،۰۵ است؛ که نشان‌دهنده ارتباط بین درجه سرطان با سایز تومور است ؛ همچنین P-value بین درجه سرطان و درجه انتشار تومور به غدد لنفاوی بیماران (۰،۰۰۱) نیز کم‌تر از ۰،۰۵ است، بنابراین درجه سرطان و درجه انتشار تومور به غدد لنفاوی بیماران با یکدیگر ارتباط دارند.

یافته‌ها

۱۴۷نمونه فریز شده بیمار (۹۲ بافت توموری/۵۵ نمونه خون) و ۲۵ نمونه شاهد در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، علاوه برآن از ۳ رده‌سلولی سرطان کولورکتال HT29، SW480 و CACO-2 نیز استفاده شده است. سن بیماران بین ۱۵ سال تا ۸۳ سال است؛ در بین آن‌ها ۵۵ درصد مرد، ۳۵ درصد زن و جنسیت ۱۰ درصد نامعلوم بود. بعد از استخراج DNA از بافت و خون بیماران و رده‌های سلولی، پس از استخراج DNA، PCR قطعه ۴۸۹ جفت بازی با موفقیت انجام شد. جهت تعیین ژنوتیپ، محصولات PCR با آنزیم BsoB1 انکوبه شدند بعد از برش دو قطعه به طول‌های ۴۱۰ و ۷۹ جفت باز ایجاد می‌گردد و محصولات آنزیمی روی ژل آگارز ۳درصد برده شد(شکل۱). ژنوتیپ همه نمونه‌ها نیز در SNP موردنظر بررسی شد و در بین نمونه‌ها فقط یک نمونه برش نخورد(۰،۶۸ درصد).



شکل (۱): الگوی الکتروفورز نمونه‌های برش خورده به کمک آنزیم Ava۱، اگزون ۷ اکسین ۲ بر روی آگارز ۳درصد. بعد از برش دو قطعه به طول‌های ۴۱۰bp و ۷۹bp ایجاد می‌شود. به‌ترتیب از چپ به راست: چاهک ۱. لدر۱۰۰bp، چاهک ۲. نمونه شاهد(بدون آنزیم)، چاهک ۳ و ۴. نمونه خون بیمار، چاهک‌های ۵و۶و۷. نمونه بافت توموری، چاهک‌های ۸و۹و۱۰. رده‌های سلولی سرطانی است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات گذشته اهمیت جهش در اکسین ۲ در تومورهای کولورکتال اثبات شده است؛ Khan و همکارانش جهش G>T (Gct>Tct) در اکسین۲ (ex۷) در کدون G۶۹۵T با فراوانی ۶درصد مشاهده کردند که می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت این اگزون در ژن اکسین۲ و سرطان‌زایی باشد(۱۴). Suraweera و همکارانش نیز در ۱۱ نمونه از ۴۷ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال جهش‌های تغییر قالب و حذف نوکلئوتید در اگزون ۷ ژن اکسین۲ مشاهده کردند (۱۵). Taniguchi و همکارانش نیز در بررسی ۷۳ نمونه بیمار

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-08-10]

مبتلا به سرطان هپاتوسلولار ۲ مورد جهش در این ناحیه مشاهده کردند (۱۶) ؛ Kai-Feng Pan و همکارانش نیز با مطالعه برروی ۷۰ بیمار مبتلا به سرطان معده ۱ مورد جهش در اگزون۷ ژن اکسین۲ مشاهده کردند (۱۷). علاوه بر آن نتایجی مبنی بر تأثیر واریانت‌های نادر در علت‌یابی بیماری‌ها نیز به‌دست آمده‌است(۱۸)، که می‌تواند بیانگر اهمیت بررسی واریانت‌های نادر در پزشکی فردی شده[1] باشد. علی‌رغم مطالعات بیوانفورماتیکی گسترده پیرامون انتخاب SNP و بررسی مطالعات گذشته پیرامون اهمیت اگزون مورد بررسی، نتایج آزمایشگاهی هم‌سو با نتایج مطالعاتی نبود و می‌توان عواملی ازجمله تنوع بالا در عوامل مؤثر در ابتلا به سرطان کولورکتال(تغییرات ژنتیکی می‌تواند یکی از آن عوامل باشد؛ نه‌تنها عامل) و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت ایرانی را در به‌دست آوردن این نتایج مؤثر دانست. با وجود بررسی ۱۴۷ نمونه بیمار، شیوع کم‌تر از نیم درصدی این SNPها نیازمند جامعه آماری وسیع‌تری است که با هزینه و امکانات محدود در دسترس نیست، از سوی دیگر از مطالعات بیوانفورماتیکی معمولاً اطلاعاتی پیرامون اهمیت یک موضوع به‌دست می‌آید، نه شیوع آن در یک جمعیت خاص؛ بنابراین نمی‌توان به‌تنهایی به این-گونه مطالعات اکتفا کرد؛ بنابراین میزان شیوع و اثرات بالینی یک جهش باید به روش‌های آزمایشگاهی نیز موردبررسی قرار گیرد.

با توجه به اهمیت بررسی سرطان کولورکتال، به دلیل شیوع روزافزون و هزینه‌های سنگینی که این بیماری می‌تواند بر فرد و جامعه تحمیل کند و همچنین قابل‌پیشگیری بودن آن؛ بررسی عوامل مؤثر بر پیش‌آگهی CRC از اهمیت ویژه‌ایی برخوردار است. ازاین‌رو با مطالعاتی که اخیراً انجام‌گرفته، اهمیت پزشکی فردی شده و نقش واریانت‌های نادر در بیماری‌ها و صفات پیچیده اثبات شده است؛ علی‌رغم اینکه واریانت‌های نادر نشانه‌گذاری نمی‌شوند ممکن است یک مؤلفه مهم و قطعی از یک صفت ژنتیکی پیچیده باشند و بررسی‌های بیشتر روی ژنتیک بیماران به‌صورت فردبه‌فرد می‌تواند نقش و اهمیت این‌گونه واریانت‌ها را بیشتر مشخص کند؛ بنابراین با توجه به نتایج مطالعات گذشته که جهش‌های زیادی را در ناحیه اگزون۷ ژن اکسین۲ در بسیاری از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ثبت کرده‌اند؛ بررسی میزان بیان این ژن و کیفیت عملکرد پروتئین اکسین۲ در این بیماران می‌تواند حائز اهمیت باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند که از پرسنل محترم توموربانک، مسئولین بخش گوارش بیمارستان‌های بقیه الله (عج) و امام خمینی(ره) که در تهیه نمونه بیماران همکاری کردند تشکر نمایند.

References:

1. Zhang J, Lai W, Li Q, Yu Y, Jin J, Guo W, et al. A novel oncolytic adenovirus targeting Wnt signaling effectively inhibits cancer-stem like cell growth via metastasis, apoptosis and autophagy in HCC models. Biochem Biophys Res Commun 2017;491(2): 469-77.
2. Hui D, Kim SH, Roquemore J, Dev R, Chisholm G, Bruera E. Impact of timing and setting of palliative care referral on quality of end-of-life care in cancer patients. Cancer 2014;120(11): 1743-9.
3. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Annal Oncol 2007;18(3): 581-92.
4. Ghavami SB, Chaleshi V, Derakhshani S, Aimzadeh P, Asadzadeh-Aghdaie H, Zali MR. Association between TNF-α rs1799964 and RAF1 rs1051208 MicroRNA binding site SNP and gastric cancer susceptibility in an Iranian population. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2017;10(3): 214.
5. Atlas SJ, Zai AH, Ashburner JM, Chang Y, Percac-Lima S, Levy DE, Chueh HC, Grant RW. Non-visit-based cancer screening using a novel population management system. J Am Board Fam Med 2014 Jul 1;27(4): 474-85.
6. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin 2014;64(2): 104–17.
7. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. Cell Res 2005;15(1): 28-32.
8. Mai M, Qian C, Yokomizo A, Smith DI, Liu W. Cloning of the human homolog of conductin

[1] personal medicine

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-08-10]

(AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23–q24. Genomics 1999;55(3): 341-4.

9. Kandimalla R, Linnekamp JF, van Hooff S, Castells A, Llor X, Andreu M, Jover R, Goel A, Medema JP. Methylation of WNT target genes AXIN2 and DKK1 as robust biomarkers for recurrence prediction in stage II colon cancer. Oncogenesis 2017;6(4): e308.
10. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Qian C, Christensen E, Roche PC. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating β-catenin/TCF signalling. Nature genetics 2000;26(2): 146-7.
11. Dong X, Seelan RS, Qian C, Mai M, Liu W. Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AXIN2 gene. Cytogenetic Genome Res 2001;93(1-2): 26-8.
12. Lammi L, Arte S, Somer M, Järvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. Am J Hum Gen 2004;74(5): 1043-50.
13. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. Nature Rev Gen 2010;11(6): 415-25.
14. Khan NP, Pandith AA, Hussain MU, Yousuf A, Khan MS, Wani KA, Mudassar S. Novelty of Axin 2 and lack of Axin 1 gene mutation in colorectal cancer: a study in Kashmiri population. Mol Cell Biochem 2011 Sep 1;355(1-2): 149.
15. Suraweera N, Robinson J, Volikos E, Guenther T, Talbot I, Tomlinson I, Silver A. Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. Int J Cancer 2006;119(8): 1837-42.
16. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA. Mutational spectrum of [beta]-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. Oncogene 2002;21(31): 4863.
17. Pan KF, Liu WG, Zhang L, You WC, Lu YY. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. World journal of gastroenterology: WJG 2008;14(10): 1570.
18. Auer PL, Lettre G. Rare variant association studies: considerations, challenges and opportunities. Gen Med 2015;7(1): 16.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-08-10]

Original Article

STUDY OF MUTATION IN EXON 7 OF AXIN 2 IN COLORECTAL CANCER (LABORATORY AND BIOINFORMATICS STUDIES)

Atiye Jalalifar[1], Shahla Mohammad Ganji [2], Zarrin Minuchehr[3], Mahmood Khaniki[4], Behrooz Abbaszade Moakhkher[5]*

Received: 17 Feb, 2018; Accepted: 29 Apr, 2018

Abstract

Background & Aims: Colorectal cancer is the third most common cancer in Iran. Wnt pathway changes are commonly reported in this type of cancer. Some of the important activities of this pathway are the role of carcinogenicity, cellular proliferation, cell migration, and so on. Axin2 acts as a negative regulator in the Wnt / TCF signaling pathway and helps in the formation of the beta-catenin destruction complex. Research has shown that this protein is mutated in many cases of CRC cancer. In past studies, the mutation on the exon 7 of this gene is of particular importance because it is linked to PP2A phosphatase and in various scientific sources; mutations in this region have been reported repeatedly in colorectal tumors. The aim of this project is to study SNP with ID rs370618491 nucleotide C2140T in exon 7 of axin 2 gene and to investigate the possible role of mutation in this SNP in colorectal cancer.

Materials & Methods: In this project, 147 frozen samples of patients (92 tumor tissues / 55 blood samples) and 25 control samples, and 3 cell lines of colorectal cancer, HT29, SW480 and CACO-2 were used. SNP selection was performed using bioinformatics methods including the use of NCBI, Ensembl databases and polyphen tool; DNA extraction was done by phenol-chloroform method. The PCR-RFLP method was used. The PCR-RFLP method was used and statistical analysis of demographic and clinical data was done using SPSS software.

Results: This study showed that in one of 147 patient samples, there was a mutation in our preferred SNP position; in other samples, including cell lines no mutation showed. The results of SPSS 16.0 showed that the incidence of colorectal cancer in men was 55.7% and the mean age of patients over 40 years was 74%. It was also found that the size of the tumor (T) with P = 0.016 and the degree of tumor diffusion to the lymph nodes (N) with P=0.001 had a significant relationship with the grade of cancer progression.

***Conclusion*:** The presence one mutation in 147 samples indicates the low frequency of this SNP in the Iranian population. Therefore, despite the importance of exon 7 in axin 2, laboratory results were not consistent with the results of studies. Some factors can influence this outcome, including high variability in factors affecting colorectal cancer and high genetic variation in Iranian population. In addition, it usually comes from bioinformatics studies that provide information about the importance of an issue, not its prevalence in a particular population; therefore, bioinformatics studies alone are not enough and the frequency and clinical effects of a mutation in laboratory methods should also be considered. Due to the importance of axin 2 in the Wnt pathway and the high rates of mutations observed in previous studies, investigating the level of gene expression of axin 2 and the quality of its protein function can be important in future studies.

Keywords: Axin 2, Exon 7, SNP, Colorectal Cancer, RFLP

Address: National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Shahrak-e Pajoohesh, Tehran - Karaj Highway, Tehran, Iran

Tel: +982144787466

Email: shahlamg@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2018: 29(4): 263 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc, Molecular Cell Biology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran*

[2] *Assistant Professor, Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran (Corresponding Author)*

[3] *Assistant Professor, Biophysicist, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran*

[4] *Assistant Professor, Clinical Pathology and Anatomy, Iran Tumor Bank, Institute of Internal Medicine, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran*

[5] *MSc, Molecular Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-08-10]