متیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A در نمونه‌های بلوک پارافینه سرطان روده بزرگ

حسین فرامرزی[۱]
الهام مسلمی[۱*]
امیر ایزدی[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران.
۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، شهرک قیامدشت، خیابان شهید باهنر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
تلفن: ۰۲۱-۳۳۵۹٤۹۵۰
E-mail: elham_moslemi60@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۳ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۷ آنلاین: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰

زمینه و هدف: امروزه پژوهش‌های مولکولی نشان می‌دهد که بعضی از ژن‌ها در ناحیه پروموتر خود به‌صورتی متحمل متیلاسیون می‌شوند که باعث خاموشی یا کاهش بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای رشد سلولی می‌شود. تشخیص موقعیت متیلاسیون می‌تواند به‌عنوان مارکری برای تشخیص سرطان و پیش‌بینی بیماری باشد. ژن سرکوب‌گر تومور CDKN2A پروتیینی را رمزگذاری می‌کند که در مهار CDK4/6 و کاهش سطح فسفریلاسیون پروتیین رتینوبلاستوما (pRb) نقش دارد. هدف این مطالعه، بررسی مولکولی هیپرمتیلاسیون اگزون ۱، CDKN2A در افراد دارای سرطان کولورکتال و افراد سالم بود.

روش بررسی: این مطالعه مورد- شاهدی که جمعیت مورد مطالعه آن شامل ۲۰ فرد مبتلا به سرطان کولورکتال و ۱۰ فرد سالم بودند. نمونه‌ها به‌صورت بلوک پارافینه، از دی ۱۳۸۹ تا خرداد ۱۳۹۱ از بخش پاتولوژی بیمارستان مهر تهران تهیه گردید. سپس برای حالت‌های متیله و غیرمتیله ژن CDKN2A، آغازگر اختصاصی طراحی شد، به‌منظور بررسی سطح متیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A از روش PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) استفاده گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، هایپرمتیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A در بافت توموری ۸۰٪ (۱٦ نمونه) و در بافت سالم ۲۰٪ (دو نمونه) مشاهده گردید. در بیمارانی که سن آنها بیشتر از ۵۰ سال بود متیلاسیون ژن CDKN2A با فراوانی بیشتری نسبت به بیمارانی با سن کمتر از ۵۰ سال مشاهده گردید (٦٦٪ در برابر ۳٤٪) (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: نتایج این آزمایش نقش هایپرمتیلاسیون نواحی CpG پروموتر ژن CDKN2A در بافت توموری را به‌عنوان عامل ایجادکننده سرطان کولورکتال در انسان تایید نمود و می‌توان به‌عنوان یک مارکر در تشخیص زودهنگام بیماری و شناسایی افراد مستعد استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، تشخیص زودهنگام، متیلاسیون، CDKN2A، PCR اختصاصی متیلاسیون.

مقدمه

سرطان روده بزرگ (Colorectal Cancer)، دومین سرطان رایج و چهارمین دلیل مرگ‌ومیر در جهان است.[۱و۲] سالانه حدود ٤۰۰/۰۰۰ نفر در دنیا به‌علت ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند.[۳و٤] شیوع این سرطان بیش از ۹٪ تمام انواع سرطان‌ها است. در سطح جهان سرطان روده بزرگ ۹/٤٪ از میزان بروز سرطان در مردها و ۱۰/۱٪ از این میزان را در زن‌ها شامل می‌شود.[۵] آمارها نشان می‌دهند شیوع سرطان روده بزرگ در ایران رو به افزایش است و این سرطان به‌عنوان یکی از مهمترین سرطان‌ها در هر دو جنس مطرح می‌باشد.[٦]

بر اساس برآورد سازمان بهداشت جهانی سالانه حدود ۸۷۵/۰۰۰ مورد جدید به بیماران اضافه می‌شود.[۷] به‌طوری که این سرطان دومین علت مرگ، به‌علت ابتلا به سرطان در ایالت متحدهٔ آمریکا شناخته شده است.[۸] در اکثر موارد ابتلا به سرطان روده بزرگ (بیش‌از ۸۵٪) اختلال

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

در الگوی متیلاسیون (تغییرات اپی‌ژنتیک) مشاهده می‌شود. یکی از تغییرات اپی‌ژنتیک اصلی که در تومورهای انسانی، سرکوب ظهور ژن‌ها به‌وسیله متیلاسیون جزایر CpG است، که در انتهای '۵ بسیاری از ژن‌ها قرار دارند.[۹و۱۰] جزایر CpG که در پروموتور یا اولین اگزون‌های ژن‌ها قرار دارند، به‌طور معمول غیرمتیله هستند. افزایش سطح متیلاسیون در این نواحی منجر به تأخیر در همانندسازی، متراکم شدن کروماتین و مهار آغاز رونویسی می‌گردد. اختلال در تنظیم الگوی متیلاسیون DNA در سلول‌های سرطانی منجر به افزایش سطح متیلاسیون جزایر CpG ژن‌های مؤثر در بروز سرطان می‌گردد.[۱۱و۱۲]

ژن‌های مؤثر در تنظیم چرخه تقسیم سلول از جمله ژن‌هایی هستند که اختلال در الگوی متیلاسیون ناحیه پروموتوری آنها، موجب کاهش ظهور ژن و بروز سرطان روده بزرگ می‌گردد. چرخه سلولی در سلول‌های طبیعی و سرطانی به‌وسیله انواع مختلفی از مولکول‌های تنظیم‌کننده شامل: سیکلین‌ها، مهارکننده کینازهای وابسته به سیکلین (CDKI) و کینازهای وابسته به سیکلین (CDK) انجام می‌شود. این مجموعه به‌وسیله گروهی از آنزیم‌های CDKI به‌نام مهارکننده کیناز وابسته به سیکلین نوع چهار (INK4) غیرفعال می‌شود.[۱۳و۱۴] در این میان غیرفعال شدن ژن CDKN2A به فراوانی در انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان روده بزرگ مشاهده می‌شود.[۱۵و۱۶]

ژن CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)، (INK4A، MTS1 و p16) با چهار اگزون (1a، 1b، 2، 3) بر روی ناحیه کروموزومی 9p16 قرار گرفته است (شکل ۱). رونوشت رمزکننده CDKN2A با اگزون 1b آغاز می‌شود.[۱۷و۱۸]

پروتیین CDKN2A به‌وسیله مهار مجموعه پروتیینی cyclinD-Cdk4/6 موجب توقف چرخه یاخته در فاز G0 یا G1 می‌گردد. مهار Cdk4/6 به‌وسیله CDKN2A همچنین موجب کاهش سطح فسفریلاسیون پروتیین رتینوبلاستوما می‌شود.[۱۹و۲۰] ساز و کارهای غیرفعال‌کننده ژن CDKN2A شامل جهش‌های نقطه‌ای، حذف‌های هموزیگوت و هایپرمتیلاسیون جزایر CpG در پروموتور و اگزون ۱ می‌باشند.[۲۱و۲۲]

هایپرمتیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A در سرطان‌های مختلف شایع بوده و به‌تنهایی می‌تواند منجر به آغاز تومورزایی گردد.[۲۳و۲۴] تغییرات اپی‌ژنتیک، ساز و کار غالب غیرفعال‌کننده ژن CDKN2A در سرطان روده بزرگ می‌باشد و جهش در آن ژن به‌ندرت دیده می‌شود. ساز و کارهای مولکولی مختلفی در مهار ظهور ژن‌های دارای ناحیه هایپرمتیله شناسایی شده است.[۲۵و۲۶] هدف از انجام این مطالعه، بررسی هایپرمتیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A در افراد نرمال و افراد دارای سرطان روده بزرگ توسط پرایمرهای اختصاصی و روش مولکولی PCR اختصاصی متیلاسیون (Methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) می‌باشد.

روش بررسی

جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۰ فرد مبتلا به سرطان روده بزرگ و ۱۰ فرد سالم بود. نمونه‌ها به‌صورت بلوک پارافینه از دی ۱۳۸۹ تا خرداد ۱۳۹۱ از بخش پاتولوژی بیمارستان مهر تهران تهیه گردید. سپس با بررسی لام‌های مربوطه، توسط متخصص پاتولوژیست بلوک‌هایی که بیشترین سلول‌های سرطانی و کمترین سلول‌های طبیعی را داشتند برای انجام مطالعه انتخاب گردیدند.

نمونه‌های بلوک‌های پارافینه، سه مرتبه با استفاده از زایلن و اتانول مطلق، جهت پارافین‌زدایی شست‌وشو داده شده و سانتریفیوژ شدند. پس از آن جهت تجزیه پروتیین‌ها، آنزیم‌های پروتئاز بافر و

شکل ۱: آرایش اگزون‌های (1a، 1b، 2، 3) ژن CDKN2A بر روی ناحیه کروموزومی 9p16

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

پروتیناز K (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) اضافه گردید و در دمای ۵۶ ºC به‌مدت چهار ساعت قرار گرفتند، سپس آنزیم پروتیناز K در دمای ۹۵ ºC خنثی گردیده، پس از سانتریفیوژ مایع رویی به‌عنوان DNA، جهت مطالعات بعدی در دمای ۲۰- ºC نگهداری شد. جهت بهینه‌سازی DNA استخراج شده از فنل/ کلروفرم استفاده شد. متیلاسیون اگزون ۱ ژن CDKN2A با استفاده از روش PCR اختصاصی متیلاسیون انجام شد. در این روش ابتدا DNA به‌وسیله بی‌سولفیت سدیم تیمار داده می‌شود که موجب تبدیل سیتوزین غیرمتیله به یوراسیل می‌شود.

در روش MSP از دو جفت پرایمر اختصاصی توالی‌های هدف در حالت سیتوزین‌های متیله شده (Methylated) و غیرمتیله‌شده (Un Methylated) استفاده گردید و واکنش PCR جداگانه‌ای برای هر حالت انجام شد. در حالت متیله، پرایمرهای اختصاصی وضعیت متیله (عدم تبدیل سیتوزین‌ها به یوراسیل در جایگاه اتصال پس از تیمار با بی‌سولفیت سدیم) توانایی اتصال به توالی هدف را داشته و محصول PCR ایجاد می‌شود. تیمار با بی‌سولفیت سدیم پس از بهینه‌سازی برخی از مراحل، به‌ترتیب زیر انجام شد.

DNA ۱۰ µl ژنومی با اضافه کردن ۵۰ µl محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) دو مولار (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) به مدت ۱۰ min در دمای ۳۷ ºC واسرشت گردید، ۳۰ µl هیدروکوینون ۱۰mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۵۲۰ µl سدیم بی‌سولفیت ۳ M (PH=۵) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)، به DNA واسرشت شده اضافه گردید و سطح آن به‌وسیله چند قطره روغن معدنی پوشیده شد. سپس مخلوط حاصل به‌مدت سه ساعت در ۹۵ ºC قرار داده شد. DNA تغییریافته به‌وسیله کیت خالص‌سازی DNA (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) خالص‌سازی گردید.

یک جفت پرایمر به‌منظور تکثیر DNA غیرمتیله و جفت دیگر جهت تکثیر DNA متیله برای واکنش PCR اختصاصی متیلاسیون استفاده شد. پرایمرهای موردنظر با استفاده از MethPrimer software (http://www.urogene.org) طراحی و با استفاده از methBLAST software (http://medgen.ugent.be/methBLAST/)، مورد تایید قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تست PCR اختصاصی متیلاسیون در جدول ۱ فهرست شد.

برای انجام یک واکنش PCR به حجم ۲۵ µl، از ۵ µl DNA الگو، ۱ µl از هر پرایمر، ۰/۷۵ µl MgCL2، ۲/۵ µl PCR buffer، ۰/۵ µl dNTP، ۰/۴ µl آنزیم Taq DNA pol همگی تهیه‌شده از (SinaClon Co., Tehran, Iran) و ۱۴ µl آب مقطر استفاده شد.

شرایط واکنش PCR شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ ºC به‌مدت پنج دقیقه و سپس ۳۰ چرخه به‌صورت ۹۵ ºC، ۵۸ ºC برای پرایمر غیرمتیله و ۶۱ ºC برای پرایمر متیله، به‌مدت یک دقیقه برای هر دما و در نهایت در دمای ۷۲ ºC به‌مدت یک دقیقه در دستگاه ترموسیکلر peqSTAR 96X Universal Gradient Cycler (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) قرار داده شدند. مقدار ۵ µl از محصول PCR به‌طور مستقیم بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک شد و به‌وسیله سایبرگیرین رنگ‌آمیزی گردید.

با استفاده از شاخص‌های میانگین و شاخص‌های پراکندگی (انحراف‌معیار) و Mann-Whitney U test، نمونه‌ها متیله و غیرمتیله به‌طور جداگانه بین گروه‌های بیمار و کنترل، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در بررسی متیلاسیون ژن CDKN2A M: پرایمر اختصاصی DNA ژنومی متیله، U: پرایمر اختصاصی DNA ژنومی غیرمتیله

نام پرایمر		توالی پرایمر	محصول (bp)	دمای اتصال
CDKN2A	met-M=F	GTTTATTTTTGGTGTTAAAGGGC	۲۰۵ bp	۶۱ ºC
	met-M=R	AACACGAAAACCACAACGAC		
CDKN2A	met-U=F	GTTTATTTTTGGTGTTAAAGGGTG	۲۰۸ bp	۵۸ ºC
	met-U=R	ATCAACACAAAAACCACAACAAC		

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

این داده‌ها توسط SPSS software, version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) مورد آنالیز قرار گرفت. P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در بررسی حاضر، وضعیت متیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A در ۲۰، DNA ژنومی به‌دست‌آمده از بافت افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ (شکل ۲) و ۱۰ نمونه طبیعی با روش PCR اختصاصی متیلاسیون بررسی شد (شکل ۳). این بیماران شامل ۱۰ زن و ۱۰ مرد با میانگین سنی ٥٦ سال و طیف سنی ٢٤ تا ٨٨ سال بودند که در این مطالعه شرکت داشتند.

در روش MSP پرایمرهای اختصاصی برای توالی‌های متیله و غیرمتیله در ناحیه مشابهی از اگزون ۱، ژن CDKN2A به‌کار گرفته شد و محصولات حاصل، به‌منظور مقایسه در کنار یکدیگر بر روی ژل برده شدند.

حضور یا عدم حضور نوار مربوط به محصول PCR با یک پرایمر ویژه، نشانگر وضعیت متیلاسیون در نظر گرفته شد. نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی نشان داد که ١٦ مورد از ۲۰ نمونه توموری دارای متیلاسیون ژن CDKN2A بودند (۸۰٪) و فقط در دو نمونه از نمونه‌های سالم متیلاسیون ژن موردنظر مشاهده شد (۲۰٪). در بیمارانی که سن آنها بیشتر از ۵۰ سال بود متیلاسیون ژن CDKN2A با فراوانی بیشتری نسبت به بیمارانی با سن کمتر از ۵۰ سال مشاهده گردید (٦٦٪ در برابر ٣٤٪) (نمودار ۱).

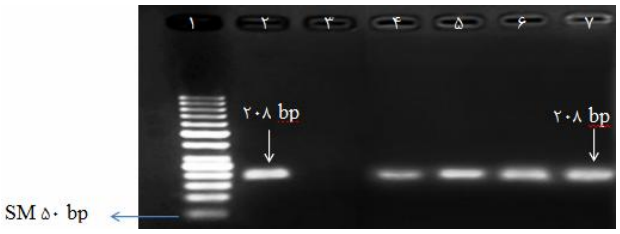
در میان نمونه‌های دارای هایپرمتیلاسیون در ژن CDKN2A، که در مراحل ابتدایی سرطان روده بزرگ (مرحله I یا II) قرار داشته‌اند عارضه نئوپلازی ایجاد شده را سرطان روده‌ی اولیه یا بیماری خفیف روده‌ای نامیده می‌شود.

بحث

سرطان روده بزرگ، دومین سرطان رایج و چهارمین دلیل مرگ‌ومیر در جهان است.[۱و۲] چندین ژن مهارکننده‌ی تومور در این سرطان نقش دارند که از میان آنها، CDKN2A نقش قابل‌توجهی دارد.[۲۷] پروتیین CDKN2A در اغلب سرطان‌ها، دچار تغییرات ژنتیکی می‌گردد که این تغییرات شامل جهش و هایپرمتیلاسیون ناحیه‌ی پروموتور می‌باشد که منجر به کاهش بیان پروتیین CDKN2A و رشد خارج از کنترل سلول می‌شود و از طرف دیگر، منجر به کاهش حساسیت سلول به آپوپتوز می‌گردد و می‌تواند روند تشکیل سرطان را تسهیل کند بیان این پروتیین در اغلب سرطان‌ها از جمله سرطان روده بزرگ کاهش می‌یابد.[۲۸و۲۹]

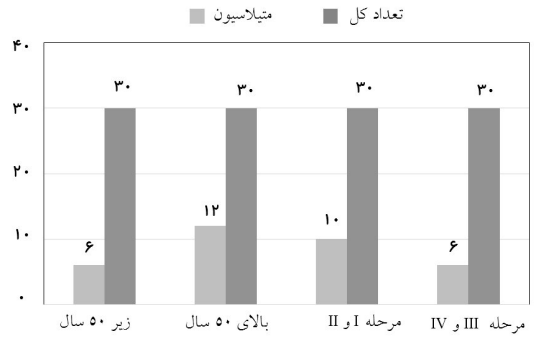
در این پژوهش فراوانی مهار ژن سرکوبگر تومور CDKN2A به‌وسیله ساز و کارهای اپی‌ژنتیک در سرطان روده بزرگ مطالعه شد.

شکل ۲: بررسی متیلاسیون پروموتر ژن CDKN2A با آزمایش MSP و آغازگر اختصاصی حالت متیله ژن CDKN2A برای نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ روی آگارز ۱/۵٪. چاهک ۱) اندازه نشانگر مولکولی (DNA Ladder ۵۰ جفت بازی). چاهک ۲) کنترل مثبت برای حالت متیله ژن CDKN2A، چاهک ۳) کنترل منفی برای حالت متیله ژن CDKN2A، چاهک‌های ۱۲-٤) ۹ تا از نمونه‌های بافتی که برای پروموتر ژن CDKN2A متیله هستند.



شکل ۳: بررسی متیلاسیون پروموتر ژن CDKN2A با آزمایش MSP و آغازگر اختصاصی حالت غیرمتیله ژن CDKN2A برای نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ روی آگارز ۱/۵٪. چاهک ۱) اندازه نشانگر مولکولی (DNA Ladder ۵۰ جفت بازی. چاهک ۲) کنترل مثبت برای حالت غیرمتیله ژن CDKN2A، چاهک ۳) کنترل منفی برای حالت غیرمتیله ژن CDKN2A، چاهک‌های ۷-٤) چهار تا از نمونه‌های بافتی که برای پروموتر ژن CDKN2A غیرمتیله هستند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]



نمودار ۱: مقایسه نمونه‌های متیله‌شده ژن CDKN2A، در سرطان روده بزرگ بر اساس سن و مرحله بیماری

برای این منظور، متیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان روده بزرگ با روش PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) بررسی شد. با استفاده از این روش، ۸۰٪ هایپرمتیلاسیون ژن CDKN2A در DNA به‌دست‌آمده از بافت بلوک پارافینه، ۲۰ بیمار ایرانی مبتلا به سرطان روده بزرگ شناسایی شد. بررسی ویژگی‌های پاتولوژی تومورها نشان داد که نمونه‌های دارای متیلاسیون در ژن CDKN2A در مراحل ابتدایی بروز سرطان روده بزرگ قرار دارند.

در پژوهش Sanchez-Cespedes و همکاران در مورد نقش پروتیین CDKN2A در بروز سرطان روده بزرگ که روی ۲۱ نمونه سرطانی انجام دادند، ۷۶٪ بیماران دارای هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن CDKN2A و کاهش بیان پروتیین مربوط بودند.[۳۰] در مطالعه Jass و همکاران روی ۱۹۵ نمونه سرطان روده بزرگ با روش ایمونوهیستوشیمی، رابطه معناداری بین این سرطان و هایپرمتیلاسیون ژن CDKN2A و کاهش میزان بیان این پروتیین مشاهده شد.[۳۱]

در مطالعه Zou و همکاران روی نمونه‌های سرطان روده بزرگ، در ۳۸٪ موارد ژن CDKN2A دچار هایپرمتیلاسیون بود و کاهش بیان پروتیین مربوط تشخیص داده شد.[۳۲] متیلاسیون ژن CDKN2A با CIMP همراه بوده و در تعیین تشخیص زودهنگام بیمار دارای اهمیت بوده است.[۳۳-۳۵] Shima و همکاران اثر پیش‌آگهی متیلاسیون پروموتور ژن (CDKN2A) P16 و فقدان این ژن را بررسی کردند. به این منظور از اطلاعات بالینی و مولکولی ۹۰۲ مورد سرطان روده بزرگ استفاده کردند. تعداد بالای نمونه‌ها توانایی کافی در آنالیز بقای بیماران را برای آنها فراهم کرده بود. آنها دریافتند که متیلاسیون ژن CDKN2A یا فقدان آن مستقل از تشخیص زودهنگام بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ نمی‌باشد. مطالعه آنها نتایج مهمی درباره متیلاسیون پروموتور ژن CDKN2A کاهش بیان ژن CDKN2A در سرطان روده بزرگ فراهم کرد.[۲۸] برخی مطالعات دیگر نشان دادند که متیلاسیون ژن CDKN2A و عدم بیان ژن CDKN2A با تشخیص زودهنگام بیماری ارتباط دارد؛ اگرچه در این مطالعات تعداد نمونه کمی مورد بررسی قرار گرفته بود.[۳۶و۳۷]

از آنجایی‌که نمونه‌های توموری دارای هایپرمتیلاسیون در ژن CDKN2A از دیدگاه خصوصیات پاتولوژیک سرطانی روده بزرگ در مراحل اولیه قرار داشتند، به‌احتمال هایپرمتیلاسیون یک رویداد اپی‌ژنتیک اولیه در بیماران است.

هایپرمتیلاسیون در نمونه‌های طبیعی، تنها در دو مورد مشاهده شد، از این رو می‌توان بیان کرد که متیلاسیون ژن CDKN2A از ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های سرطانی است. فراوانی به‌نسبت بالای غیرفعال‌شدن ژن CDKN2A به‌وسیله متیلاسیون در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ امکان استفاده از وضعیت متیلاسیون این ژن را به‌عنوان نشانگر پاسخ بالینی بهینه، داروهایی که بر مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با ژن CDKN2A تأثیر می‌گذارند، مطرح می‌سازد.

نتایج نشانگر این است که غیرفعال‌سازی ژن CDKN2A به‌وسیله متیلاسیون، به‌احتمال در ساز و کار تومورزایی در سرطان روده بزرگ نقش مهمی بر عهده دارد. متیلاسیون جزایر CpG پروموتر ژن‌ها که باعث خاموشی و یا کاهش بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای رشد سلولی می‌شود، از علل ایجادکننده سرطان روده بزرگ می‌باشد. نتایج این آزمایش نقش متیلاسیون نواحی CpG پروموتر ژن CDKN2A در بافت سرطان روده بزرگ را به‌عنوان عامل ایجادکننده آن در انسان تایید می‌نماید.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل از پایان‌نامه با عنوان "بررسی متیلاسیون اگزون ۱، ژن CDKN2A در نمونه‌های بلوک پارافینه افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ" در مقطع کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی در سال ۱۳۹۳ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق اجرا شده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

References

1. World Health Organization (WHO). 58th World Health Assembly Approved Resolution on Cancer Prevention and Control (WHA58.22). [Internet] 2005 May 25 [cited 2015 Feb 15]; Available from: URL: http://www.who.int/cancer/eb1143/en/
2. Mohammad Ganji S, Samei E, Hashemi SA, Rezagholizadeh A, Kazemnejad A, Mostakhdemin Hosseini Z. Investigation of the E-cadherin promoter methylation in patients with colorectal cancer in Iran. *Modares J Med Sci* 2013;16(2):75-83.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90.
4. Mehrabani D, Tabei S, Heydari ST, Shamsina SJ, Shokrpour N, Amini M, et al. Cancer occurrence in Fars Province, Southern Iran. *Iran Red Crescent Med J* 2008;10(4):314-22.
5. Moradi A, Khayamzadeh M, Guya M, Mirzaei HR, Salmanian R, Rakhsha A, et al. Survival of colorectal cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009;10(4):583-6.
6. Azadeh S, Moghimi-Dehkordi B, Fatem SR, Pourhoseingholi MA, Ghiasi S, Zali MR. Colorectal cancer in Iran: an epidemiological study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008;9(1):123-6.
7. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Zali MR. Prognostic factors in 1,138 Iranian colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 2008;23(7):683-8.
8. Garfinkel L, Mushinski M. U.S. cancer incidence, mortality and survival: 1973-1996. *Stat Bull Metrop Insur Co* 1999;80(3):23-32.
9. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005;37(8):853-62.
10. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4(2):143-53.
11. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* 2008;98(12):1881-5.
12. Tada T, Watanabe T, Kazama S, Kanazawa T, Hata K, Komuro Y, et al. Reduced p16 expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancers. *Hepatogastroenterology* 2003;50(54):1756-60.
13. James AS, Campbell MK, Hudson MA. Perceived barriers and benefits to colon cancer screening among African Americans in North Carolina: how does perception relate to screening behavior? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(6):529-34.
14. Stone WL, Krishnan K, Campbell SE, Qui M, Whaley SG, Yang H. Tocopherols and the treatment of colon cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:223-33.
15. Scotto J, Fears TR, Fraumeni JF Jr. Solar radiation. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, editors. Cancer Epidemiology and Prevention. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press; 2010. p. 355-72.
16. Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 2006;44(3):143-54.
17. Reed SI. Control of the G1/S transition. *Cancer Surv* 1997;29:7-23.
18. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264(1):42-55.
19. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(4):1286-90.
20. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007;130(2):223-33.
21. Sanz-Casla MT, Maestro ML, Vidaurreta M, Maestro C, Arroyo M, Cerdan J. p16 Gene methylation in colorectal tumors: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *Dig Dis* 2005;23:151-5.
22. Zhao P, Hu YC, Talbot IC. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9(10):2202-6.
23. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, et al. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* 1995;55(14):2995-7.
24. Krude T, Jackman M, Pines J, Laskey RA. Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* 1997;88(1):109-19.
25. Gonzalez-Zulueta M1, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55(20):4531-5.
26. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(22):4632-42.
27. Voorhoeve PM, Agami R. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* 2003;4(4):311-9.
28. Shima K, Nosho K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, et al. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review. *Int J Cancer* 2011;128(5):1080-94.
29. Nikbahkt M, Moeini M. A comparative study of the incidence of tumor suppressor protein P16 in normal and colorectal cancer specimens by immunohistochemistry. *J Isfahan Med Sci* 2012;10:5349-54. [Persian]
30. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Hibi K, Cope FO, Westra WH, Piantadosi S, et al. Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin Cancer Res* 1999;5(9):2450-4.
31. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VL, Gabrielli B, et al. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2003;56(1):69-73.
32. Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, Sun JY, Cang H, Gao F, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):188-91.
33. Ishiguro A, Takahata T, Saito M, Yoshiya G, Tamura Y, Sasaki M, et al. Influence of methylated p15 and p16 genes on clinicopathological features in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(8):1334-9.
34. Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003;21(20):3729-36.
35. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009;58(1):90-6.
36. Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep* 2003;10(4):935-8.
37. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, Kanazawa H, Saito T, Matsuoka T, et al. Aberrant p16((INK4a)) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136(2):323-31.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

TUMJ Tehran University Medical Journal, April 2015; Vol. 73, No. 1: 11-17 Original Article

DNA Methylation in exon 1 of CDKN2A gene in formalin-fixed, paraffin-embedded colon cancer samples

Hossein Faramarzi M.D.[1]
Elham Moslemi Ph.D.[1*]
Amir Izadi M.D.[2]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran.
2- Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Shahid Bahonar St, Ghiamdasht Town, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-33594950
E-mail: elham_moslemi60@yahoo.com

Abstract

Received: 25 Oct. 2014 Accepted: 27 Jan. 2015 Available online: 11 Mar. 2015

Background: The molecular studies indicate some of the genes in the promoter region itself, will undergo methylation. Methylation of CpG islands in the promoter region of that cause silence or reduced expression of genes involved in cell growth pathways, which are colorectal cancer causing agents. Detection of methylation status can be used as a marker for cancer diagnosis and prediction of disease. CDKN2A tumor suppressor gene encodes a protein, which inhibit CDK 4/6 and loss of retinoblastoma protein phosphorylation (pRb) is involved. The purpose of this study was to investigate the molecular hypermethylation in exon 1 of CDKN2A gene in patients with colorectal cancer and normal subjects.

Methods: In this case-control study, the study population consisted of 20 patients with colorectal cancer and 10 healthy persons. Samples in paraffin blocks were prepared in pathology department of Mehr Hospital, Tehran, Iran, from December 2010 to June 2012. Then, specific primers were designed for the methylation and Non-methylation of CDKN2A gene. To determine the level of exon 1 methylation of CDKN2A gene, methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) method was performed.

Results: In this study, hypermethylation in exon 1 of CDKN2A gene were observed in 80% of tumor tissues (16 cases) and 20% of normal tissues (2 cases). The patients aged older than 50 years, had a higher CDKN2A gene methylation and frequency than patients younger than 50 years old (66% vs 34%) (P<0/001).

Conclusion: The result of this study has been confirmed the role of CDKN2A gene promoter methylation of CpG sites of colorectal cancer as the leading cause of colorectal cancer. These data suggest that epigenetic silencing via aberrant methylation of the CDKN2A promoter plays a critical role in the inactivation of this tumor suppressor gene in colorectal cancer and can be used as a marker for early detection and identification of potential applications.

Keywords: CDKN2A, colorectal neoplasms, early diagnosis, methylation, methylation specific PCR.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]