



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی استان اصفهان

دانشکده پزشکی

بخش ژنتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی

عنوان:

بررسی توزیع فراوانی آللی سه پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در نمونه DNA بیماران مبتلا به سرطان

کلورکتال و جمعیت غیر مبتلا و ارتباط آنها با شیوع این سرطان در بیماران شهر اصفهان

به راهنمایی:

دکتر رسول صالحی

دکتر منصور صالحی

اساتید مشاور:

دکتر محمد حسن امامی، دکتر محسن جانقربانی، دکتر میترا حیدر پور

توسط:

عبدالرضا دارایی

تابستان ۱۳۹۰

محل اجرای پروژه: بخش ژنتیک

چکیده:

مقدمه: سرطان کولورکتال یا سرطان روده بزرگ معمولترین بدخیمی درگیر با سیستم گوارش است. طبق آمارهای صورت گرفته، تعداد موارد جدید تخمین زده شده ی مبتلا به سرطان کولورکتال در ایران ۳۶۴۱ نفر در سال می باشد که از آن ها ۲۲۶۲ نفر سالانه به خاطر این سرطان جان خود را از دست می دهند که تقریباً ۶۱٪ کل مرگ و میر ناشی از سرطان در ایران می باشد. این سرطان مولتی فاکتوریال بوده و عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد تابلوی بالینی آن دخیلند. بنابراین شناسایی ژنهایی که در کنار عوامل محیطی، فرد را نسبت به بروز بیماری مستعد می کنند، اهمیت بسیاری دارد. واریانتهای خاص ناشی از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) Single Nucleotide Polymorphism در یک فرد، ممکن است وی را مستعد به ابتلا به سرطان می نماید، مشروط به اینکه ریسک فاکتورهای محیطی خاصی نیز وجود داشته باشد. بنابراین با مطالعه پلی مورفیسم ژنهایی که بیشترین ارتباط را در مستعد نمودن فرد به یک سرطان کولورکتال دارند، می توان پیشگویی کرد، چقدر احتمال دارد در آینده، سرطان در این فرد بروز پیدا کند، تا اقدامات پیشگیرانه و درمانی قبل از بروز سرطان انجام شود. با توجه به شیوع رو به افزایش سرطان کولورکتال در ایران و عدم وجود یک مارکر موثر قابل استفاده برای غربالگری جمعیت ها و تشخیص افراد در معرض خطر، در این مطالعه به بررسی پلی مورفیسم های EGF 61 (rs4444903) A>G، rs6983267 G>T و COX-2-765 G>C در بیماران مبتلا به سرطان و افراد سالم در شهر اصفهان پرداختیم.

مواد و روش ها: نمونه خون محیطی مربوط به ۱۲۰ نفر کنترل و ۱۱۰ بیمار، تهیه و DNA ژنومی آنها با کیت استخراج DNG plus استخراج شد. برای تعیین ژنوتیپ این پلی مورفیسم ها از تکنیک RFLP-PCR استفاده شد. در این تکنیک ابتدا قطعه DNA حاوی SNP مورد نظر به وسیله PCR تکثیر و سپس محصول PCR اختصاصی هر SNP توسط آنزیم محدودالایر اختصاصی آن هضم گردید تا الگوی RFLP آن بدست بیاید. آنزیم هایی که در این تحقیق استفاده شدند، شامل AluI, NmuCI, و Bsh 1236 I بودند. ژنوتیپ هر SNP با استفاده از الگوی RFLP آن بدست آمد.

نتایج: بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه آلل G و ژنوتیپ GG پلی مورفیسم rs6983267 G>T ارتباط قوی با سرطان کولورکتال داشت. در مورد پلی مورفیسم COX-2-765 G>C، در کل ارتباطی با سرطان کولورکتال نداشت ولی ژنوتیپ GC و CC آن در افرادی که در دوره زندگی مصرف بسیار کم داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی داشتند، ژنوتیپ ریسک بودند. آلل ها و ژنوتیپ های پلی مورفیسم EGF 61(rs4444903) A>G هیچ ارتباطی با این سرطان نداشتند.

بحث: بررسی نتایج حاصل از مطالعات مختلف در جمعیت های مختلف نشان می دهد که SNP ها می توانند در یک جمعیت فرد را مستعد به سرطان کنند و در جمعیت دیگر این اثر را نداشته باشند، زیرا می توانند با عوامل محیطی مختلف برهم کنش پیچیده داشته باشند. طبق این تنوع اثرات این پلی مورفیسم ها در جمعیت های مختلف، در بین سه SNP مطالعه شده، در جمعیت ما می توان از پلی مورفیسم rs6983267 G>T به عنوان مارکر ژنتیکی برای شناسایی افراد مستعد به سرطان کولورکتال اسپورادیک استفاده کرد.

واژه های کلیدی: سرطان کولورکتال، پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی، RFLP-PCR

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: کلیات، بیان مسئله و اهمیت پژوهش

- ۱-۱- سرطان کلورکتال..... ۱
- ۲-۱- تاریخچه..... ۲
- ۳-۱- اپیدمیولوژی سرطان کلورکتال در دنیا و ایران..... ۴
- ۴-۱- ژنتیک سرطان کلورکتال..... ۶
- ۴-۱-۱- مسیر ناپایداری کروموزومی..... ۷
- ۴-۱-۲- مسیر ناپایداری میکروساتلایتی..... ۷
- ۴-۱-۳- تئوری تشکیل آدنوما..... ۱۰
- ۵-۱- طبقه بندی انواع اشکال سرطان کلورکتال..... ۱۱
- ۵-۱-۱- سرطان کلورکتال اسپورادیک..... ۱۲
- ۵-۱-۲- سرطان کلورکتال ارثی..... ۱۵
- ۵-۱-۲-۱- سرطان پلی پوزیس آدنوماتوز خانوادگی..... ۱۶
- ۵-۱-۲-۲- سرطان کلورکتال ارثی غیر پولیپوز یا سندرم لینچ..... ۱۹
- ۶-۱- پلی مرفیسم های تک نوکلئوتیدی و ارتباط آنها با بیماری های مولتی فاکتوریال نظیر سرطان کلورکتال..... ۲۴
- ۷-۱- پلی مرفیسم های تک نوکلئوتیدی ژنی بررسی شده در این مطالعه..... ۲۵
- ۷-۱-۱- پلی مرفیسم های تک نوکلئوتیدی G>T rs6982267..... ۲۵

- ۲۷..... EGF 4444903 A>G پلی مرفیسم های تک نوکلئوتیدی
- ۲۸..... COX-2 rs20417 765 G>C پلی مرفیسم های تک نوکلئوتیدی
- ۳۰..... نتیجه گیری

فصل دوم: اهداف و فرضیات

- ۳۱..... اهداف
- ۳۱..... هدف کلی
- ۳۱..... اهداف جزئی
- ۲۵..... هدف کاربردی
- ۳۲..... سوالات و فرضیات
- ۳۲..... سوالات پژوهشی
- ۳۳..... فرضیات

فصل سوم: مواد و روش ها

- ۳۴..... مواد
- ۳۵..... روش ها
- ۳۶..... جمع آوری نمونه های خون
- ۳۴..... انتخاب بیماران و افراد کنترل مناسب
- ۳۶..... نمونه گیری و نگهداری نمونه
- ۳۶..... استخراج DNA از خون تام نمونه ها با روش استاندارد
- ۳۹..... بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده

- ۳۶.....۳-۲-۱-۳- بررسی کمی DNA با اسپکتروفوتومتر.....
- ۳۴.....۳-۲-۲-۳- بررسی کیفی DNA با ژل آگاروز.....
- ۴۱.....۳-۲-۳-۳- طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز.....
- ۴۱.....۳-۲-۳-۱-۳- تهیه بافر الکتروفورز ۵ X TBE.....
- ۴۲.....۳-۲-۳-۲-۳- تهیه بافر نمونه گذاری (Loading buffer).....
- ۴۲.....۳-۲-۳-۳-۳- تهیه ژل آگارز.....
- ۴۴.....۳-۳- کلیات PCR.....
- ۴۸.....۳-۴- تکثیر نمونه های DNA استخراج و تخلیص شده توسط PCR.....
- ۴۹.....۳-۴-۱- مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز جهت قطعات حاوی SNP های مورد نظر توسط PCR.....
- ۵۰.....۳-۴-۲- طرز تهیه محلولهای مورد نیاز.....
- ۵۰.....۳-۴-۱-۲- تهیه mixed dNTP ۲ میلی مولار.....
- ۵۰.....۳-۴-۲-۲- تهیه و آماده سازی پرایمرها.....
- ۵۱.....۳-۴-۲-۳- تهیه محلول PCR.....
- ۵۲.....۳-۵- روش کار PCR روی نمونه ها.....
- ۵۳.....۳-۶- بهینه سازی روش PCR.....
- ۵۴.....۳-۶-۱- بهینه سازی واکنش PCR با پرایمرهای مربوط به SNP; rs4444903.....
- ۵۵.....۳-۶-۲- بهینه سازی شرایط PCR با پرایمرهای مربوط به SNP; rs20417.....
- ۵۶.....۳-۶-۳- بهینه سازی شرایط PCR با پرایمرهای مربوط به SNP; rs6983267.....
- ۵۶.....۳-۷- الکتروفورز محصولات PCR نمونه ها و عکسبرداری از آنها.....

- ۸-۳- هضم اندونوکلئازی محصول PCR نمونه ها و بررسی RFLP آنها جهت تعیین ژنوتیپ SNP های
مورد مطالعه..... ۵۷
- ۹-۳- الکتروفورز نمونه های RFLP شده و عکسبرداری از آنها..... ۵۹
- ۱۰-۳- تعیین ژنوتیپ SNP های مورد بررسی مطالعه در افراد سالم و بیمار..... ۶۰
- ۱-۱۰-۳- تعیین ژنوتیپ SNP; *EGF* 61A>G (rs4444903)..... ۶۰
- ۲-۱۰-۳- تعیین ژنوتیپ SNP; *COX-2* -765G>C (rs20417)..... ۶۱
- ۳-۱۰-۳- تعیین ژنوتیپ SNP rs6983267 G>T..... ۶۱
- ۱۱-۳- تأیید محصولات PCR و تعیین ژنوتیپ با تعیین توالی..... ۶۱
- ۱۲-۳- - تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از روشهای آماری مناسب..... ۶۲

فصل چهارم: نتایج

- ۱-۴- نتایج استخراج و تخلیص ژنومی DNA..... ۶۳
- ۱-۴- نتایج بهینه سازی شرایط استخراج و تخلیص DNA ژنومی..... ۶۳
- ۲-۴- نتایج بررسی کمی و کیفی DNA استخراج و تخلیص شده..... ۶۳
- ۲-۴- نتایج PCR نمونه های استخراج و تخلیص شده..... ۶۴
- ۱-۲-۴- نتایج بهینه سازی شرایط PCR مرتبط به تکثیر پلی مرفیسم ها و نتایج بعد از بهینه سازی PCR..... ۶۴
- ۲-۲-۴- نتایج بهینه سازی PCR و rs6983267 G>T پلی مرفیسم نتایج بعد از بهینه سازی PCR آن..... ۶۵
- ۳-۲-۴- نتایج بهینه سازی *EGF* 61A>G (rs4444903) پلی مرفیسم نتایج بعد از بهینه سازی PCR آن..... ۶۷
- ۴-۲-۴- نتایج بهینه سازی *COX-2* -765G>C (rs20417) پلی مرفیسم نتایج بعد از بهینه سازی PCR آن..... ۶۸
- ۳-۴- نتایج PCR-RFLP..... ۷۰

- ۷۰-۱-۳-۴- نتایج بهینه سازی شرایط PCR-RFLP.....
- ۷۰-۲-۳-۴- نتایج PCR-RFLP مربوط به پلی مرفیسم rs6983267 G>T.....
- ۷۱-۳-۳-۴- نتایج PCR-RFLP مربوط به پلی مرفیسم *EGF* 61A>G (rs4444903).....
- ۷۲-۴-۳-۴- نتایج PCR-RFLP مربوط به پلی مرفیسم *COX-2* -765G>C (rs20417).....
- ۷۳-۴-۴- نتایج حاصل از تعیین توالی محصولات PCR.....
- ۷۶-۵-۴- نتایج حاصل از ارتباط بین متغیر های بررسی شده بین افراد کنترل و بیمار.....
- ۷۸-۶-۴- فراوانی آلی و ژنوتیپی پلی مرفیسم های تک نوکلئوتیدی مورد بررسی در افراد سالم و بیمار.....
- ۷۸-۱-۶-۴- نتایج فراوانی آلی و ژنوتیپی برای پلی مرفیسم rs6983267 G>T در افراد سالم و بیمار و مقایسه این نتایج بین این دو گروه.....
- ۷۸-۲-۶-۴- نتایج فراوانی ژنوتیپی و آلی برای *EGF* 61A>G (rs4444903) در افراد سالم و بیمار و مقایسه این نتایج بین این دو گروه.....
- ۸۱-۳-۶-۴- نتایج فراوانی ژنوتیپی و آلی برای *COX-2* -765G>C (rs20417) در افراد سالم و بیمار و مقایسه این نتایج بین این دو گروه.....
- ۸۳-۷-۴- نتایج حاصل از ارتباط بین فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مرفیسم ها و متغیر های بررسی شده در مطالعه.....

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

- ۹۰-۱-۵- بحث.....
- ۹۲-۱-۱-۵- ارتباط بین SNP rs6983267 8q24 و سرطان کلورکتال اسپورادیک.....
- ۹۶-۲-۱-۵- ارتباط بین پلی مرفیسم *EGF* +61G/A (rs4444903) و سرطان کلورکتال اسپورادیک.....
- ۹۸-۳-۱-۵- ارتباط بین پلی مرفیسم *COX-2* -765G>C (rs20417) و سرطان کلورکتال اسپورادیک.....

۱۰۷-۲-۵- نتیجه گیری.....

۱۰۸-۲-۵- پیشنهادات.....

فصل ششم: منابع

۱۱۰- منابع.....

فهرست شکل ها

| صفحه | عنوان |
|---------|---|
| ۳..... | شکل ۱-۱- مسیر مرحله واری که در آن تغییرات ژنتیکی قدم به قدم اتفاق می افتند تا سزطان کولون شکل گیرد..... |
| ۶۴..... | شکل ۱-۴- نتایج حاصل از استخراج DNA از خون تام برای بعضی از نمونه ها..... |
| ۶۶..... | شکل ۲-۴- بهینه سازی شرایط PCR برای پلی مرفیسم rs6983267 G>T با استفاده از شیب..... |
| ۶۶..... | شکل ۲-۴- PCR انجام شده برای بعضی نمونه ها، برای پلی مرفیسم rs6983267 G>T بعد از بهینه سازی..... |
| ۶۷..... | شکل ۴-۴- بهینه سازی شرایط PCR برای پلی مرفیسم EGF 61A>G (rs4444903) با استفاده از شیب دمایی..... |
| ۶۸..... | شکل ۵-۴- PCR انجام شده برای پلی مرفیسم EGF 61A>G (rs4444903) بعد از بهینه سازی..... |
| ۶۹..... | شکل ۶-۴- بهینه سازی شرایط PCR برای پلی مرفیسم COX-2 -765G>C (rs20417) با استفاده از شیب دمایی..... |
| ۷۰..... | شکل ۷-۴- PCR انجام شده برای پلی مرفیسم COX-2 -765G>C (rs20417) بعد از بهینه سازی..... |
| ۷۱..... | شکل ۸-۴- در این شکل قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR حاوی SNP rs6983267 G> T با آنزیم NMUCI در افراد هموزیگوت (TT و GG) و هتروزیگوت (GT) مشاهده می شود..... |
| ۷۲..... | شکل ۹-۴- در این شکل قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR حاوی EGF 61A> G SNP با آنزیم AluI در افراد هموزیگوت (TT و GG) و هتروزیگوت (GT) مشاهده می شود..... |

شکل ۴-۱۰- در این شکل قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR حاوی $COX-2-765G>C$ SNP

با آنزیم Bsh1236I در افراد هموزیگوت (CC و CC) و هتروزیگوت (GC) مشاهده می شود..... ۷۳

شکل ۴-۱۱- نتیجه ی تعیین توالی نمونه هموزیگوت آلل G مربوط به SNP; rs4444903..... ۷۴

شکل ۴-۱۱- نتیجه ی تعیین توالی نمونه هموزیگوت آلل G مربوط به SNP; rs20417..... ۷۵

شکل ۴-۱۱- نتیجه ی تعیین توالی نمونه هموزیگوت آلل G مربوط به SNP; rs6983267..... ۷۵

فهرست جدول ها

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| جدول ۳-۱- لیست دستگاه ها..... | ۳۳ |
| جدول ۳-۲- لیست مواد مصرفی..... | ۳۳ |
| جدول ۳-۳- توالی پرایمرهای مربوط به پلی مرفیسم های مورد مطالعه..... | ۵۰ |
| جدول ۴-۱- اطلاعات نمونه های جمع آوری شده بیماران و گروه کنترل..... | ۷۶ |
| جدول ۴-۲- فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مرفیسم $rs6983267 G>T$ مطالعه شده در افراد مورد و شاهد..... | ۷۸ |
| جدول ۴-۳- در جدول زیر نتایج تحلیل های آماری صورت گرفته برای $SNP; rs6983267 G>T$ آورده شده است..... | ۷۹ |
| جدول ۴-۴- آنالیز فراوانی ژنوتیپ GT و TT در مقابل ژنوتیپ GG پلی مرفیسم $rs6983267 G>T$ در افراد مورد و شاهد..... | ۷۹ |
| جدول ۴-۵- فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مرفیسم $EGF 61A>G$ (rs4444903) مطالعه شده در افراد مورد و شاهد..... | ۸۱ |
| جدول ۴-۶- در جدول زیر نتایج تحلیل های آماری صورت گرفته برای $SNP; EGF 61A>G$ (rs4444903) آورده شده است..... | ۸۱ |

جدول ۷-۴- آنالیز فراوانی ژنوتیپ GA و AA در مقابل ژنوتیپ GG پلی مرفیسم (*EGF* 61A>G (rs4444903) در افراد مورد و شاهد..... ۸۲

جدول ۸-۴- فراوانی آلی و ژنوتیپ پلی مرفیسم (*COX-2* -765G>C (rs20417) مطالعه شده در افراد مورد و شاهد..... ۸۳

جدول ۹-۴- در جدول زیر نتایج تحلیل های آماری صورت گرفته برای (*COX-2* -765G>C (rs20417) SNP; آورده شده است..... ۸۳

جدول ۱۰-۴- آنالیز فراوانی ژنوتیپ GC و CC در مقابل ژنوتیپ GG (*COX-2* -765G>C (rs20417) در افراد مورد و شاهد..... ۸۴

جدول ۱۱-۴- آنالیز لوجستیک رگرسیون فراوانی ژنوتیپ G>T rs6983267 و متغیرها در افراد مورد و شاهد..... ۸۶

جدول ۱۲-۴- آنالیز لوجستیک رگرسیون فراوانی ژنوتیپ (*EGF* 61A>G (rs4444903) و متغیرها در افراد مورد و شاهد..... ۸۸

جدول ۱۳-۴- آنالیز لوجستیک رگرسیون فراوانی ژنوتیپ (*COX-2* -765G>C (rs20417) و متغیرها در افراد مورد و شاهد..... ۸۹

1. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70.
2. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 2;91(11):916-32.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.
4. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*. 1994 Jul;145(1):148-56.
5. Fahy B, Bold RJ. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer. *Surg Oncol*. 1998 Nov-Dec;7(3-4):115-23.
6. Li D, Conti DV. Detecting gene-environment interactions using a combined case-only and case-control approach. *Am J Epidemiol*. 2009 Feb 15;169(4):497-504.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
8. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. 1990 Jan 5;247(4938):49-56.
9. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):843-50.
10. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):769-80.
11. Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR, Peters U. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA*. 2008 May 28;299(20):2423-36.
12. Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Preisinger AC, et al. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics*. 1994 Feb;19(3):525-31.

13. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989 Sep 1;49(17):4682-9.
14. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science.* 1996 Jan 19;271(5247):350-3.
15. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* 2010 Feb 1;116(3):544-73.
16. Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Sep 5;93(17):1307-13.
17. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007 Jan;50(1):113-30.
18. Konishi K, Yamochi T, Makino R, Kaneko K, Yamamoto T, Nozawa H, et al. Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3082-90.
19. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 1993 May 7;260(5109):812-6.
20. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2008 Mar;37(1):1-24, v.
21. Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in Iran: a review. *Arch Iran Med.* 2009 Mar 9;(2) 14:161-9.
22. Pahlavan PS, Kanthan R. The epidemiology and clinical findings of colorectal cancer in Iran. *J Gastrointest Liver Dis.* 2006 Mar;15(1):15-9.
23. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet.* 2005 Jan 8-14;365(9454):153-65.
24. Pellegrini ML, Argibay P, Gomez DE. Dietary factors, genetic and epigenetic influences in colorectal cancer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2010;1:241-50.
25. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* 2006 Mar;41(3):185-92.

26. Vishnoi M, Pandey SN, Modi DR, Kumar A, Mittal B. Genetic susceptibility of epidermal growth factor +61A>G and transforming growth factor beta1 -509C>T gene polymorphisms with gallbladder cancer. *Hum Immunol.* 2008 Jun;69(6):360-7.
27. Søreide K, Thorsen K. Colorectal Cancer – Increased Multidimensional Understanding of the Molecular Genesis Current Cancer Therapy Reviews. 2008;4:243-52.
28. Leslie A ,Stewart A, Baty DLJ. Chromosomal changes in colorectal adenomas: relationship to gene mutations and potential for clinical utility. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005;45:126-35.
29. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9.
30. van Es JH, Giles RH, Clevers HC. The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):126-34.
31. Kondo Y, Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Jan-Jun;23(1-2):29-39.
32. Jass JR, Iino H, Ruszkiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, et al. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut.* 2000 Jul;47(1):43-9.
33. Henson ES ,Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal.* 2006 Dec;18(12):2089-97.
34. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16; (6810)408:307-10.
35. Ando T, Sugai T, Habano W, Jiao YF, Suzuki K. Analysis of SMAD4/DPC4 gene alterations in multiploid colorectal carcinomas. *J Gastroenterol.* 2005 Jul;40(7):708-15.
36. Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):1-4.
37. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 2001 Apr;3(4):433-8.
38. He B, Barg RN, You L ,Xu Z, Reguart N, Mikami I, et al. Wnt signaling in stem cells and non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2005 Jul;7(1):54-60.

39. Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol.* 2001 Apr;3(4):429-32.
40. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 2002 Aug 29;418(6901):934.
41. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997 Dec;1(1):3-11.
42. Anwar S, Frayling IM, Scott NA, Carlson GL. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. *Br J Surg.* 2004 Oct;91(10):1275-91.
43. Aquilina G, Hess P, Branch P, MacGeoch C, Casciano I, Karran P, et al. A mismatch recognition defect in colon carcinoma confers DNA microsatellite instability and a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):8905-9.
44. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1998 Aug 1;58(15):3455-60.
45. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000 Jan 13;342(2):69-77.
46. Fukushima T, Mashiko M, Takita K, Otake T, Endo Y, Sekikawa K, et al. Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003 Jun;22(2):315-20.
47. Akiyama Y, Tsubouchi N, Yuasa Y. Frequent somatic mutations of hMSH3 with reference to microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 18;236(2):248-52.
48. Banerjee A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer.* 2004 Aug 6;3:21.
49. Samowitz WS, Holden JA, Curtin K, Edwards SL, Walker AR, Lin HA, et al. Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1517-24.
50. Nathke IS. The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:337-66.

51. Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004 Dec 21;568(2):275-82.
52. Soreide K, Nedrebo BS, Knapp JC, Glomsaker TB, Soreide JA, Korner H. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol.* 2009 Mar;18(1):31-50.
53. Ahmed FE. Gene-gene, gene-environment & multiple interactions in colorectal cancer. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2006 Apr;24(1):1-101.
54. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med.* 1998 May 21;338(21):1481-7.
55. Cicek MS, Slager SL, Achenbach SJ, French AJ, Blair HE, Fink SR, et al. Functional and clinical significance of variants localized to 8q24 in colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Sep;18(9):2492.-500
56. Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2003;532:39-49.
57. Yang VW. APC as a checkpoint gene: the beginning or the end? *Gastroenterology.* 2002 Sep;123(3):935-9.
58. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet.* 1992 Jul;1(4):229-33.
59. Aaltonen L, Johns L, Jarvinen H, Mecklin JP, Houlston R. Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin Cancer Res.* 2007 Jan 1;13(1):356-61.
60. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):459-69.
61. Makinen MJ, George SM, Jernvall P, Makela J, Vihko P, Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol.* 2001 Mar;193(3):286-94.
62. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Mar 15;58(6):1130-4.
63. Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, et al. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* 1995 Jul 17; 55(14):2972-5.

64. Ebert EC. Mechanisms of colon cancer binding to substratum and cells. *Dig Dis Sci*. 1996 Aug;41(8):1551-6.
65. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev*. 2005 Apr 15;19(8):877-90.
66. Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature*. 1996 Aug 8;382(6591):499-500.
67. Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Satoh K, Baeg GH, et al. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science*. 1996 May 17;272(5264):1020-3.
68. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989 Apr 14;244(4903):21-3.
69. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 2001 .Dec;159(6):2107-16.
70. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, et al. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet*. 1996 Nov;14(3):255-7.
71. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 1994;368(258-261).
72. Haddad R, Ogilvie RT, Croitoru M, Muniz V, Gryfe R, Pollet A, et al. Microsatellite instability as a prognostic factor in resected colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2004 Nov;11(11):977-82.
73. Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, et al. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol*. 1999 Jan;52(1):5-9.
74. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993 Jun 10;363(6429):558-61.

75. Abuli A, Bessa X, Gonzalez JR, Ruiz-Ponte C, Caceres A, Munoz J, et al. Susceptibility genetic variants associated with colorectal cancer risk correlate with cancer phenotype. *Gastroenterology*. 2010 Sep;139(3):788-96, 96 e1-6.
76. Aiello M, Vella N, Cannavo C, Scalisi A, Spandidos DA, Toffoli G, et al. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy (Review). *Mol Med Report*. 2010 Mar-Apr;4 (2):203-8
77. Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology*. 2005 Aug;129(2):565-76.
78. Berndt SI, Potter JD, Hazra A, Yeager M, Thomas G, Makar KW, et al. Pooled analysis of genetic variation at chromosome 8q24 and colorectal neoplasia risk. *Hum Mol Genet*. 2008 Sep 1;17(17):2665-72.
79. Harismendy O, Frazer KA. Elucidating the role of 8q24 in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2009 Aug;41(8):868-9.
80. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):652-8.
81. Tuupanen S, Niittymaki I, Nousiainen K, Vanharanta S, Mecklin JP, Nuorva K, et al. Allelic imbalance at rs6983267 suggests selection of the risk allele in somatic colorectal tumor evolution. *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):14-7.
82. Wokolorczyk D, Gliniewicz B, Sikorski A, Zlowocka E, Masojc B, Debniak T, et al. A range of cancers is associated with the rs6983267 marker on chromosome 8. *Cancer Res*. 2008 Dec 1;68(23):9982-6.
83. Buckland PR. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jan;1762(1):17-28.
84. De Boer WI, Houtsmuller AB, Izadifar V, Muscatelli-Groux B, Van der Kwast TH, Chopin DK. Expression and functions of EGF, FGF and TGFbeta-growth-factor family members and their receptors in invasive human transitional-cell-carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1997 Apr 10;71(2):284-91.
85. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995 Jul;19(3):183-232.

86. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Oct 7;101(1): 1294-1308.
87. Araujo AP, Ribeiro R, Pinto D, Pereira D, Sousa B, Mauricio J, et al. Epidermal growth factor genetic variation, breast cancer risk, and waiting time to onset of disease. *DNA Cell Biol.* 2009 May;28(5):265-9.
88. Spindler KL, Nielsen JN, Ornskov D, Brandslund I, Jakobsen A. Epidermal growth factor (EGF) A61G polymorphism and EGF gene expression in normal colon tissue from patients with colorectal cancer. *Acta Oncol.* 2007;46(8):1113-7.
89. Ribeiro R, Soares A, Pinto D, Catarino R, Lopes C, Medeiros R. EGF genetic polymorphism is associated with clinical features but not malignant phenotype in neurofibromatosis type 1 patients. *J Neurooncol.* 2007 Feb;81(3):225-9.
90. Wu GY, Hasenberg T, Magdeburg R, Bonninghoff R, Sturm JW, Keese M. Association between EGF, TGF-beta1, VEGF gene polymorphism and colorectal cancer. *World J Surg.* 2009 Jan;33(1):124-9.
91. McCarron SL, Bateman AC, Theaker JM, Howell WM. EGF +61 gene polymorphism and susceptibility to and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer.* 2003 Nov 20;107(4):673-5.
92. Mariani F, Sena P, Marzona L, Riccio M, Fano R, Manni P, et al. Cyclooxygenase-2 and Hypoxia-Inducible Factor-1alpha protein expression is related to inflammation, and up-regulated since the early steps of colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2009 Jul 8;279(2):221-9.
93. Ostergaard M, Ernst A, Labouriau R, Dagiliene E, Krarup HB, Christensen M, et al. Cyclooxygenase-2, multidrug resistance 1, and breast cancer resistance protein gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(1):65-73.
94. Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med.* 2003 Jul-Sep;7(3):207-22.
95. Goodman JE, Bowman ED, Chanock SJ, Alberg AJ, Harris CC. Arachidonate lipoxygenase (ALOX) and cyclooxygenase (COX) polymorphisms and colon cancer risk. *Carcinogenesis.* 2004 Dec;25(12):2467-72.

96. Fornai M, Antonioli L, Colucci R, Bernardini N, Ghisu N, Tuccori M, et al. Emerging role of cyclooxygenase isoforms in the control of gastrointestinal neuromuscular functions. *Pharmacol Ther.* 2010 Jan;125(1):62-78.
97. Park JM, Choi JE, Chae MH, Lee WK, Cha SI, Son JW, et al. Relationship between cyclooxygenase 8473T>C polymorphism and the risk of lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer.* 2006;6:70.
98. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 1994 Oct;107(4):1183-8.
99. Ben Nasr H, Chahed K, Bouaouina N, Chouchane L. PTGS2 (COX-2) -765 G > C functional promoter polymorphism and its association with risk and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2009 Jan;36(1):193-200.
100. Cao H, Xu Z, Long H, Li XQ, Li SL. The -765C allele of the cyclooxygenase-2 gene as a potential risk factor of colorectal cancer: a meta-analysis. *Tohoku J Exp Med.* 2010;222(1):15-21.
101. Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep.* 2005 Apr;13(4):559-83.
102. Ke-Xiang Z, Yu-Min L, Xun L, Wen-Ce Z, Yong S, Tao L. Study on the association of COX-2 genetic polymorphisms with risk of gastric cancer in high incidence Hexi area of Gansu province in China. *Mol Biol Rep.* 2010 Jan;38(1):649-55.
103. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* 1999 Dec 20;18(55):7908-16.
104. Xing LL, Wang ZN, Jiang L, Zhang Y, Xu YY, Li J, et al. Cyclooxygenase 2 polymorphism and colorectal cancer: -765G>C variant modifies risk associated with smoking and body mass index. *World J Gastroenterol.* 2008 Mar 21;14(11):1785-9.
105. Zhu W, Wei BB, Shan X, Liu P. -765G>C and 8473T>C polymorphisms of COX-2 and cancer risk: a meta-analysis based on 33 case-control studies. *Mol Biol Rep.* 2010 Jan;37(1):277-88.
106. Butterly LF, Goodrich M, Onega T, Greene MA, Srivastava A, Burt R, et al. Improving the quality of colorectal cancer screening: assessment of familial risk. *Dig Dis Sci.* 2010 Mar;55(3):754-60.

107. Morson BC. Symposium on colorectal cancer. 1. Pathology of colorectal cancer. *Can J Surg*. 1978 May;21(3):206-8.
108. Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2007 Aug;39(8):989-94.
109. Hajdu SI. Thoughts about the cause of cancer. *Cancer*. 2006 Apr 15;106(8):1643-9.
110. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):78-85.
111. Westbrook AM, Szakmary A, Schiestl RH. Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models. *Mutat Res*. 2010 Jul-Sep;705(1):40-59.
112. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Aug 21;88(16):1146-51.
113. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*. 1995 Sep 15;55(18):3964-8.
114. Thompson CL, Plummer SJ, Merkulova A, Cheng I, Tucker TC, Casey G, et al. No association between cyclooxygenase-2 and uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A6 genetic polymorphisms and colon cancer risk. *World J Gastroenterol*. 2009 May 14;15(18):224-40.
115. Singh RK, Tsan R, Radinsky R. Influence of the host microenvironment on the clonal selection of human colon carcinoma cells during primary tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 1997 Mar;15(2):140-50.
116. Wagner HE, Toth CA, Steele GD, Jr., Thomas P. Metastatic potential of human colon cancer cell lines: relationship to cellular differentiation and carcinoembryonic antigen production. *Clin Exp Metastasis*. 1992 Jan;10(1):25-31.
117. Ulrich CM, Whitton J, Yu JH, Sibert J, Sparks R, Potter JD, et al. PTGS2 (COX-2) -765G > C promoter variant reduces risk of colorectal adenoma among nonusers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Mar;14(3):616-9.

118. Iglesias D, Nejda N, Azcoita MM, Schwartz S, Jr., Gonzalez-Aguilera JJ, Fernandez-Peralta AM. Effect of COX2 -765G>C and c.3618A>G polymorphisms on the risk and survival of sporadic colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2009 Oct;20(8):1421-9.



Isfahan University of Medical Sciences

School of Medicine

Division of Genetics

A thesis submitted for the Master of Science (M.Sc.) Degree in Human Genetics

Title:

Evaluation of allelic frequencies distribution of three single nucleotide polymorphisms in the genomic DNA samples of colon cancer patients and control population and their correlations with this cancer in patients of Isfahan province

Supervisors:

Dr. Rasul Salehi

Dr. Mansour Salehi

Advisors:

Dr. Mohammad Hassan Emami, Dr. Mohsen Janghorbani, Dr. Mitra Heydarpour

By:

Abdolreza Daraei

Summer 2011

Abstract:

Introduction: Colorectal cancer or large bowel cancer is the most common malignancy involving the digestive system. According to the statistics, the number of new cases of colorectal cancer in Iran is estimated 3641 individuals per year and the 2262 cases of them, death due to this cancer, almost, it forms 3/6% of all deaths from cancer in Iran. This cancer is multi-factorial and both the genetic and environmental factors are involved in its clinical picture. Therefore, the identification of genes that interact with environmental factors and cause individual susceptibility to the colorectal cancer is very important. Special variants due to single nucleotide polymorphism (SNPs) in an individual may be predisposing whom to cancer provided that there are certain environmental risk factors. Therefore, the study of polymorphisms in genes that have the most association with predispose the person to colorectal cancer, can be predicted, how much it likely in future, cancer will occur in person, so can take preventive and therapeutic measures before incidence of cancer. Given the prevalence of colorectal cancer growing in Iran and the absence of an effective marker for screening populations and identify those at risk, in this study, we investigated the association between EGF 61 (rs4444903), rs6983267 G>T and COX-2 -765 G>C polymorphisms and colorectal cancer in patients and controls in Isfahan province.

Method & material: Peripheral blood samples were provided from all 120 controls and cases. Genomic DNA of subjects was extracted by using DNG plus kit. RFLP-PCR technique was used for genotyping of polymorphisms. In this technique first DNA fragment including the SNPs of interest amplified and then specific PCR product for each SNP was digested by its specific restriction endonuclease to get its specific RFLP pattern. The enzymes that used this study include NmuCI, AluI and Bsh 1236 I.

Result: According to the given results in this study G allele and GG genotype of the rs6983267 G>T polymorphism have significant association with colorectal cancer. Overall, The COX-2 -765 G>C polymorphism has not any association with colorectal cancer, but its GC and CC genotypes act as genotype risk in individuals that have low or never NSAID use. The alleles and genotypes of EGF 61(rs4444903) A>G polymorphism has no association with colorectal cancer.

Discussion: Investigations of results from different studies showed that the SNPs can predispose person to cancer in a population but in other population no such effect, because they can to be have complex interactions with different environmental factors. According to these multiple effects of the polymorphisms in different populations, from three studied SNPs in our population, the rs6983267 G>T can be used as genetic marker for identify the predisposed individuals to colorectal cancer

Key words: colorectal cancer, single nucleotide polymorphisms, RFLP-PCR