۱۳۵۷۵
۱۳۹۱/۱۰/۳۰

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

دانشکده پزشکی

بخش ژنتیک – گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی

پایان کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی

عنوان

مطالعه و بررسی متیلاسیون ژنهای ALX4 وCDH4 درسرم خون افراد مبتلا به سرطان کولورکتال وافراد سالم مراجعه کننده به بیمارستانهای شهراصفهان

شماره طرح تحقیقاتی:۳۹۰۶۳۱

نویسنده: **نورالله عطاپوربیدک**

تحت راهنمایی: **دکتر رسول صالحی**

تحت مشاوره: **دکترمحمد حسن امامی**

زمستان ۱۳۹۰

چکیده مقاله:

مقدمه: سرطان کولورکتال سومین سرطان (بدخیم) در سراسر دنیا است و یکی از علل اصلی مرگ ناشی ازسرطان هم در زنان و هم در مردان در بسیاری از کشورهاست. با توجه به شواهد اپیدمیولوژیکی و روند رو به رشد در میزان این سرطان درکشورمان، روش های غربال گری در جهت جلوگیری یا پیشگیری از مرگ و میر و معلولیت های ناشی از این سرطان کشنده ولی قابل پیشگیری در کشور لازم است. ارتباط متیلاسیون DNA با بروز بسیاری از بیماریها از جمله سرطان مشخص شده است. در این مطالعه متیلاسیون ژنهای ALX4 و CDH4 در سرم خون افراد مبتلا به سرطان کولورکتال وافراد سالم با روش MSP انجام گرفت. معرفی تست یا تست هایی بر مبنای استفاده از خون برای بررسی خطر سرطان به عنوان بخشی از مراقبت های استاندارد پیشگیری، می تواند مشکلات مربوط به غربال گری را از کاهش دهند. از روشهای موثر و مفید غیرتهاجمی بیومارکرها می باشد، بیومارکرهایی مفید و باکارایی بالا که بتوانند در یک نمونه استاندارد مثل پلاسما یا سرم در مدت زمان کوتاه اندازه گیری شوند، می تواند برای این هدف مفید وموثر واقع شوند.

روشها: در این مطالعه ۲ گروه هر یک شامل ۲۵ نفرانتخاب شدند. گروه افراد مبتلا به سرطان کولورکتال ویا پولیپ آدنومایی و گروه سالم به عنوان کنترل بودند. انتخاب گروه ها بر اساس نتیجه کولونوسکوپی صورت گرفت. مقدار۵ سی سی از نمونه خون وریدی آنها جمع آوری شد و سپس سرم نمونه ها توسط سانتریفیوژ جداسازی شد. DNA نمونه های سرم استخراج شده و سپس توسط کیت مخصوص بی سولفیت تیمار شدند و بعد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای متیلاسیون، عمل PCR انجام شد.

نتایج: برای ژن ALX4 در افراد بیمار از۲۵ نمونه ۱۷ مورد آنها متیله بودند ودر افراد کنترل از ۲۵ نمونه ۲۲ مورد غیر متیله بودند. همچنین برای ژن CDH4 از ۲۵ بیمار ۱۸ مورد متیله ودر افراد کنترل از ۲۵ مورد ۲۰ غیرمتیله بودند. بر اساس این نتایج دو ژن ALX4 و CDH4 به

ترتیب با حساسیت ۶۸٪ و۷۲٪ در بیماران با سرطان کولورکتال متیله می شوند و برای افراد کنترل این دو ژن دارای اختصاصیت به ترتیب، ۸۸٪ و ۸۰٪ می باشد.

بحث: این یافته ها پیشنهاد می کنند که متیلاسیون دو ژن ALX4 و CDH4 در طول پروسه پیشرفت سرطان با حساسیت بالایی متیله می شوند در نتیجه به وسیله آنالیز متیلاسیون این دو ژن بصورت ترکیبی در نمونه سرم خون بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، احتمالا بتوان برای تشخیص این سرطان در مراحل اولیه از بیماری استفاده کرد.

کلید واژه: متیلاسیون، سرطان کولورکتال، بیومارکر

مقاله استخراج شده از پایان نامه / شماره صفحه:

Methylation pattern of ALX4 gene promoter as a potential marker for blood-based early detection of colorectal cancer.....۳۳

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۲-۴

- سرطان کولورکتال ۴-۵

- اپی ژنتیک ۵-۶

- متیلاسیون DNA ۶-۷

- جزایر CpG ۷-۸

- متیلاسیون DNA و تومورزایی ۸-۱۰

- کاربرد متیلاسیونDNA در تشخیص سرطان ۱۰

-کاربرد اپی ژنتیک در درمان سرطان ۱۰

- ژنهای هدف(ALX4 and CDH4) ۱۱-۱۲

- هدف کلی و اهداف جزئی ۱۲

- هدف کاربردی ۱۳

- سوالات پژوهشی و فرضیات ۱۳

فصل دوم: روشها ۱۴

- انتخاب افراد بیمار(سرطانی) و افراد کنترل مناسب ۱۵

- جمع آوری نمونه های خون وجداسازی سرم آنها ۱۵

- استخراج DNA ازنمونه های خون با روش استاندارد ۱۵

- تیمار کردن DNA با بی سولفیت سدیم ۱۶

- واکنش بی سولفیت ۱۶

- آنالیز وضعیت متیلاسیون ناحیه پروموتر ژن های ALX4 و CDH4 به وسیله روش MSP ۱۶

- اصول روشMSP ۱۶-۱۸

- روش کار ۱۸-۱۹

فصل سوم: نتایج..... ۲۰

- نتایج مطالعه وآنالیز داده ها ۲۱-۲۳

فصل چهارم: بحث.....۲۵-۲۶

فهرست منابع ۲۸-۳۱

منابع

References:

1. Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A, et al. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2005:55,10–30.

2. Parkin, D. M., Pisani, P., Ferlay, J. Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians1999:49(1), 33–64.

3. Reza malekzadeh, Faraz Bishehsari, Mahboobeh Mahdavinia,Reza Ansari . Epidemiology and Molecular Genetics of Colorectal Cancer in Iran. Arch Iranian Med. 2009:161 –169.

4. Semnani S, Sadjadi A, Fahimi S, Nouraie M, Naeimi M, et al. Declining incidence of esophageal cancer in the Turkmen Plain, eastern part of the Caspian Littoral of Iran: a retrospective cancer surveillance. Cancer Detect Prev.2006:30.14-9.

5. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R,et al. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol.2008.

6. Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi MA, et al. Cancer occurrence in Iran in 2002:an international perspective. Asian Pac J CancerPrev.2005:6:359 –363.

7. Mandel JS, Church TR, Ederer F, Bond JH. Colorectal cance mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. J Natl Cancer Inst 91.1999:434– 437.

8. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. The National Polyp Study Workgroup. Prevention of colorectal cancer by colonoscopy, polypectomy. N Engl J Med.1993: 329:1977e81.

9. Qiong Hea, Hua-Yun Chen, En-Qi Bai, et al. Development of multiplex MethyLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer. Cancer Genet Cytogenet.2010:202: 1-10.

10. Fisher JA, Fikry C, Troxel AB. Cutting cost and increasing access to colorectal cancer screening: another approach to following the guidelines. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.2006:15:108–113.

11. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. Screening and surveillance for the early detection of CRC and adenomatous polyps. Gastroenterology .2008:135:710.

12. Davis KC, Cogswell ME, Rothenberg SL, Koplan JP. Lipid screening in a managed care population. Public HealthRep 1998:113:346–350.

13. American Cancer S. 2005 Recent Prostate-Specific Antigen(PSA) Test Prevalence , by Education Attainment and Health Insurance Status, Men 50 Years and Older.2001– 2002.

14. Regueiro CR.2005.AGA Future Trends Committee report: Colorectal cancer: a qualitative review of emerging screening and diagnostic technologies. Gastroenterology.2005:129:1083-1103.

15. Rosa Estela Caseira C, Januario Bispo Cabral N, Maria da Gloria daCosta C. Circulating DNA as a biomarker for early detection of cancer: A briefupdate with an emphasis on lung cancer. The open Lung Cancer Journal.2010:3,38-44

16. Liggett T, Melnikov A, Yi QL, et al. Differntial methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. Cancer .2010:116:1674-80.

17. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers. Cur Mol Med .2010:10:142-65.

18. Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. Cancer Res .2010: 70:560-7.

19. Emmannuelle G, Elodie C, Paolo V, Pierre H. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. Mutation Res.2007:10.1016.

20. Esteller M, Sanchez-Cespedes R. Rosell D, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. Cancer Res.1999:67-70.

21. Jahr H, Hentze S, Englisch D, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res.2001: 1659-1665.

22. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ.Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res .1977:37:646-50.

23. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. Oncology 1989:46:318 –22.

24. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA,Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev .1994:3:67–71.

25. Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. Clin Chem.2005:51:113– 8.

26. Sabbioni S, Miotto E, Veronese A, et al. Multigene methylation analysis of gastrointestinal tumors: TPEF emerges as a frequent tumor-specific aberrantly

methylated marker that can be detected in peripheral blood. Mol Diagn.2003:7:2017.

27. Mandel P, Matais P. Les acides nucleiques du plasma sanguim chez lhomme. C R Acad Sci Paris.1984: 142:24103.

28. Stefan H, Petra S, Lisa YS, et al. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and Quantitative PCR. Clinchem.2005: 049320.

29. Boni L, Cassinotti E, Canziani M, et al. Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer.Surgical Oncology.2007:16, S29-S31.

30. Ta¨nzer M, Balluff B, Distler J, Hale K, Leodolter A, et al. Performance of Epigenetic Markers SEPT9 and ALX4 in Plasma for Detection Colorectal Precancerous Lesions. PLoS ONE.2008:5

31. Zou H, Harrington JJ, Shire AM, et al. Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.2007:16:2686e96.

32. Miotto, E, Sabbioni, S, Veronese A, et al. Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer.Cancer Res.2004:64, 8156-8159.

33. Antonopoulou I, Mavrogiannis LA, Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Alx4 and Msx2 play phenotypically similar and additive roles in skull vault differentiation. J Anat.2004: Jun;204:487-99.

34. Mavrogiannis LA, Antonopoulou I, Baxová A, Kutílek S, et al. Haploinsufficiency of the human homeobox gene ALX4 causes skull ossification defects. Nat Genet.2001:Jan;27:17-8.

35. Chunping DU, Tingting H, Di Sun, et al. CDH4 as a novel putative tumor suppressor gene epigenetically silenced by promoter hhypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Letters.2011: 54-61.

36. Kinzler KW, Vogelestein B. Lessons from hereditary colorectal cancer.Cell.1996:18:8:159-70.

37. Potter JD. Colorectal cancer: Molecules and populations. J Natl Cancer Inst. (1999): 916-32.

38. Jemel A, Siegel R, Ward E, et al. cancer statistics. Cancer J Clin. 2008: 58.71-96.

39. Kim H, Jen J, Volgestein B, et al. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences .Am J path.1994: 148-56.

40. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. Seminars Cancer Biol.2004:427-432.

41. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer.2004:143-153.

42. S Kim, J Lee, D Sidransky. DNA methylation markers in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev.2009:181-206.

43. Schorderet DF, Grtler SM. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. Proc Natl Acad Sci Usa.1992:957-961.

44. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature.1986:2209-213.

45. Kokura K, et al. CpG islands as gene markers in the human genome. Geneomecs.2001:1095-1107.

46. Szyf M. Targeting DNA methyltransferase in cancer. Cancer Res.1998:219-231.

47. Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, et al. Altered P16/MTS/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of esophageal SCC. Clin Cancer Res.1997:2229-36.

48. Cedar H. DNA methylation and gene activity. Cell.1998:3-4.

49. Fuks F, et al. DNA methyltransferaseDnmtl associates with histone deacetylase. Nat Genet.2000:88-91.

۵۰. مهرداد نوروزی نیا، پانتهآ ایزدی. مروری مختصر بر کاربرد اپی ژنتیک در سرطان پستان. ژنتیک در هزاره سوم،سال هفتم،شماره ۴،زمستان ۱۳۸۸.

Methylation pattern of ALX4 gene promoter as a potential marker for blood-based early detection of colorectal cancer

Abstract

Background: To detect a noninvasive screening method for colorectal cancer, we evaluated the methylation of ALX4 gene promoter in serum samples from patients with colorectal cancer (CRC) with respect to a series of healthy individuals, using methylation-specific polymerase chain reaction (MSP).

Methods: In serum samples from 25 patients with colorectal cancer and 25 healthy control subjects, isolated free-floating DNA was treated with sodium bisulfite and analyzed by methylation-specific polymerase chain reaction with primers specific for methylated or unmethylated promoter sequences of the ALX4 gene.

Results: Methylation of the ALX4 gene promoter was present in the serum DNA of patients with adenoma and colorectal cancer. A sensitivity of 68 percent and specificity of 88 percent were achieved in the detection of colorectal neoplasia. The difference in methylation status of the ALX4 promoter between the patients with colorectal neoplasia and the control group was statistically highly significant ($P < .0001$).

Conclusions: The results indicate that this DNA serum test of methylation of the ALX4 gene promoter is a sensitive and specific method. Therefore in combination with other useful markers It seems ALX4 has the potential of a clinically useful test for the early detection of colorectal cancer.

Keywords : Colorectal cancer, DNA methylation, Free-floating

Introduction

Currently, the incidence of colorectal cancer in Iranian older age subjects is very low compared to Western population, but the younger generation is experiencing an increased rate approaching the Western rates and dramatically, the burden of disease will increase in near future(3). Environmental and genetic factors impress on the developing of CRC. Economic indices show that, since the 1979 Iranian revolution, significantly living standards have improved across country (statistical center of Iran, 2007, World Bank report 2006). Our country has experienced rapid development in socioeconomic status during the past three decade with significant lifestyle changes like sedentary lifestyle and the high fat and high protein diet, and low cereals and fiber typical of Western population(3). Recently in Iran, epidemiologic studies (4,5) have indicated a rapid increase in the rate of CRC while there are still no preventive methods established. Elucidating to the epidemiologic trend of CRC in Iran, screening method is necessary in order to prevent morbidity and mortality for this lethal but preventable cancer in the country (4). The number of new cases of CRC in Iran is 3641 each year, from which 2262 die of CRC annually, accounting for approximately 6.3% of all cancer deaths in Iran(6). Early detection and resection of adenoma can significantly decrease the risk of death for patients with CRC (7, 8,9). CRC screening has been effective to reduce disease-specific mortality and several European countries practicing regular national screening programmers. These almost entirely rely upon stool tests, with endoscopy employed as an adjunct in some countries (10).The most widespread non-invasive screening methods currently used in Iran is faecal occult blood test (FOBT). This test although proved useful in CRC prevention but due to its low sensitivity and patient's compliance remained to be substituted by more sensitive with better compliance non-invasive tests (11-15).

There are number of genes evaluated so far to examine their selective potentials to act as a desirable CRC blood-base screening biomarker in different populations (16,17,18). Many of the human genes contain CpG islands in their promoters, hence abnormal cytosine methylation of these sequences result in inactivation of the prospective gene controlled by the promoter. There are numerous examples of tumor suppressor genes promoter methylation of CpG islands in various cancers, including colorectal cancer (19). It is reported that the promoter methylation changes occur as early as precancerous lesions, such as adenomas, which indicates that the analysis of epigenetic DNA alterations may be useful for the early diagnosis of malignant diseases (18,20). Interestingly it is evident that genetic and epigenetic alternations in serum free- floating DNA are identical to those found in primary human cancers (21). Based on the available data we choose to evaluate the ALX4 gene promoter in subset of patients referred to GI wards of various hospitals of Isfahan. ALX4 gene, homeodomain transcription factor ALX4, is located on the short (p) arm of the chromosome 11 at position 11.2. The ALX4 gene encoding a protein that is necessary for proper development throughout the body, especially in the skull and limb bones (22,23). In various blood based studies using ALX4 gene promoter methylation, different levels of sensitivity and specificity were obtained, mostly with satisfactory achievement (16,17). In this study, we will assess the methylation status of ALX4