

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

عطیه جلالی فر^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 به صورت رایج در این سرطان گزارش شده است. از فعالیت‌های مهم این مسیر می‌توان به نقش در سرطان‌زایی، تکثیر سلولی، مهاجرت سلولی و... اشاره کرد. اکسین ۲ (axin2) به عنوان 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 C2140T در اگزون ۷ ژن اکسین ۲ و بررسی نقش احتمالی جهش در این SNP در سرطان کولورکتال است.

مواد و روش کار: در این پروژه ۱۴۷ نمونه خون و بافت توموری فریز شده و ۲۵ نمونه شاهد و همچنین ۳ رده سلولی سرطان کولورکتال HT29، SW 480 و CACO-2 استفاده شده است. انتخاب SNP به کمک روش‌های بیوانفورماتیکی از جمله استفاده از پایگاه اطلاعات NCBI و Ensembl و ابزار polyphen انجام شده است. استخراج DNA به روش فنول-کلروفرم انجام شده و روش آزمایشگاهی PCR-RFLP استفاده شده است؛ آنالیز آماری اطلاعات دموگرافی و کلینیکی بیماران نیز به کمک نرم‌افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌ها: در ۱ نمونه از ۱۴۷ نمونه بیمار (۰.۶۸ درصد)، جهش در جایگاه SNP مورد نظر مشاهده شد و در سایر نمونه‌ها از جمله رده‌های سلولی مورد بررسی جهشی مشاهده نشد. نتایج تحلیل SPSS نشان داد که در این مطالعه سایز تومور (T) با $P=0.016$ و درجه انتشار تومور به غدد لنفاوی (N) با $P=0.001$ با درجه پیشرفت بیماری (grade) ارتباط معنی‌دار دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: فراوانی این SNP در جمعیت ایرانی پایین است؛ بنابراین علی‌رغم اهمیت اگزون ۷ ژن اکسین ۲ در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، نتایج آزمایشگاهی هم‌سو با نتایج مطالعاتی نبود. برخی عوامل از جمله 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 اکسین ۲ در مسیر WNT و میزان بالای جهش‌های مشاهده‌شده در مطالعات گذشته، بررسی میزان بیان ژن اکسین ۲ و همچنین کیفیت عملکرد پروتئین آن می‌تواند در مطالعات آینده حائز اهمیت بوده و مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: اکسین ۲، اگزون ۷، 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: ۴۴۷۸۷۴۶۶-۰۲۱

Email: shahlamg@yahoo.com

مقدمه

دلیل رشد غیرطبیعی سلول‌ها اتفاق می‌افتد که می‌توانند به بافت‌های دیگر بدن حمله کنند یا در آن‌ها تکثیر یابند (۲). در جهان

سرطان کولون و رکتوم^۱ به رشد سلول‌های سرطانی در کولون یا رکتوم (بخشی از روده بزرگ) گفته می‌شود (۱). این بیماری به

^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

^۱ colorectal cancer (CRC)

مواد و روش کار

الف- مطالعات بیوانفورماتیکی

بررسی ژن اکسین^۲ و پروتئین حاصل از آن به روش بیوانفورماتیکی انجام گرفته است؛ نوکلئوتیدها و آمینواسیدهای موجود در این پروتئین در بانک اطلاعاتی NCBI مورد جستجو قرار گرفت. بعد از بررسی نوکلئوتیدهای ژن مورد نظر، به کمک استفاده از ابزار ژنومی ensembl موقعیت اگزون‌های اکسین^۲ 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 هر کدام درجه ۱-۰ می‌دهد؛ به این ترتیب که ۰ دارای کم‌ترین اهمیت و ۱ دارای بیشترین اهمیت از نظر ریسک بیماری است). SNP با موقعیت ۱۷: ۶۵۵۳۶۹۵۰ بر روی اگزون ۷ ژن اکسین^۲ نوکلئوتید C در کدون cCc/cTc با جایگاه نوکلئوتیدی P609L (C2140T) انتخاب شد (شرط گزینش SNP در این مطالعه داشتن درجه اهمیت ۱ و همچنین وجود آنزیم اختصاصی برای نوکلئوتید مورد بررسی است)؛ با استفاده از ابزار NEBcutter آنزیم اختصاصی BsoB1 با جایگاه برش C[^]YCGR_G برای هضم آنزیمی SNP مورد نظر انتخاب شد. (در این پروژه از ایزوشیزومر BsoB1 (آنزیم ۱Ava) استفاده شده است).

ب- نمونه‌گیری

۱۷۲ نمونه در این پروژه استفاده شد؛ شامل ۱۴۷ نمونه فریز شده بیماران (۹۲ بافت توموری/۵۵ نمونه خون) و ۲۵ نمونه شاهد؛ علاوه بر آن از ۳ رده سلولی سرطان CRC شامل HT29، SW480 و CACO-2 نیز به منظور بررسی بیشتر، پیرامون اهمیت موضوع مورد بحث استفاده شد. انتخاب نمونه‌ها به صورت 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. به منظور بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده از الکتروفورز افقی و به منظور بررسی کمیت و خلوص DNAها از نانودراپ استفاده شده است. طراحی پرایمر با نرم‌افزارهای oligo7 و gene runner انجام شد و PCR اگزون ۷ در ژن اکسین^۲ انجام شد؛ با در نظر گرفتن این نکته که ناحیه‌ای که به کمک پرایمر ساخته می‌شود، دارای آنزیم برش دهنده اختصاصی باشد، به این منظور از سایت NEBcutter نیز

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 پس از آن 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 قابل پیشگیری است و به دلیل افزایش میزان ابتلا به CRC در سال‌های 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 بعد از آن به صورت مداوم تا سن ۷۵ سالگی توصیه می‌شود (۶).

در سطح مولکولی، فعالیت‌های زیستی متفاوت از طریق مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی مختلف روی می‌دهد؛ از جمله مسیر متعارف WNT که یک مسیر پیام‌رسانی خارج سلولی برای فعال شدن بتاکاتین است. بتاکاتین 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 / TCF است و در شکل‌گیری کمپلکس تخریب بتاکاتین کمک کرده؛ بنابراین یک بازخورد منفی در مسیر WNT ایجاد می‌کند (۸، ۹). در سرطان‌های کولونی که سیستم تعمیر عدم تطابق^۲ آن‌ها ناکارآمد است جهش در ژن اکسین^۲ منجر به افزایش غلظت بتاکاتین می‌شود (۱۰). آنالیزهای هیبریداسیون فلورسنتس در محل نیز نشان می‌دهد اکسین^۲ در سرطان‌های پستان و نوروبلاستوما و سایر تومورها به تکرار هتروزیگوسیتی خود را از دست می‌دهد (۱۱). جهش‌های اکسین^۲ عمدتاً به صورت 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 اکسین^۲ در سلول‌های جنسی خانواده‌ایی که مبتلا به CRC خانوادگی بوده‌اند، دیده شده است (۱۲). آلل‌های اکسین^۲ با تعویض‌های بدمعنی^۳ 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 مبتلا به سرطان کلورکتال و ابتلا به این بیماری است.

³ Missense

² mismatch

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.

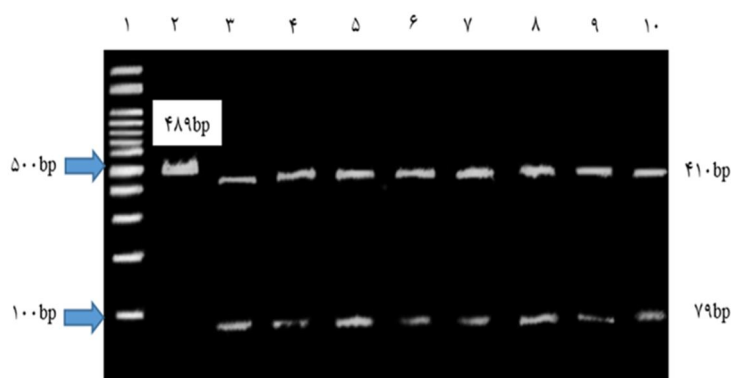
یافته‌ها

۱۴۷ نمونه فریز شده بیمار (۹۲ بافت توموری/۵۵ نمونه خون) و ۲۵ نمونه شاهد در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، علاوه بر آن از ۳ رده سلولی 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 ۳ درصد برده شد (شکل ۱). ژنوتیپ همه نمونه‌ها نیز در SNP مورد نظر بررسی شد و در بین نمونه‌ها فقط یک نمونه برش نخورد (۰,۶۸ درصد).

استفاده شد. توالی پرایمر Forward دارای ۱۹ نوکلئوتید شامل CAAGGCTCCGGAAACCATG و توالی پرایمر Reverse نیز دارای ۱۹ نوکلئوتید شامل ATGGGGCTTGGGCTTGCTC بوده و اندازه قطعه ایجاد شده ۴۶۹ جفت باز است. برای انجام PCR مقدار ۱۰ μl مستر میکس، از هر پرایمر ۲ μl با غلظت ۱۰ pM به همراه ۵ μl آب دیونیزه و ۱۱ μl از DNA هر نمونه استفاده شد. دمای اتصال پرایمرها ۶۰ C° تعیین شد و تعداد سیکل ۳۵ بود. محصول PCR به دست آمده 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 ۱۰ u/μl و ۹ μl آب دیونیزه استفاده شد. مدت زمان مورد نیاز 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 ۵۵,۷ درصد از نمونه‌ها مرد و ۳۵ درصد زن هستند. میزان ابتلا به سرطان کولورکتال نیز با افزایش سن بیماران رابطه مستقیم دارد (کم‌تر از ۴۰ سال ۱۵,۷ درصد و بیشتر از ۴۰ سال ۷۴,۳ درصد). سطح معنی - داری با آزمون ANOVA انجام شد و نتایج آن نشان داد که در این



شکل (۱): الگوی الکتروفورز نمونه‌های برش خورده به کمک آنزیم Ava1، آگزون ۷ اکسین ۲ بر روی آگارز ۳ درصد. بعد از برش دو قطعه به طول‌های ۴۱۰ bp و ۷۹ bp ایجاد می‌شود. به ترتیب از چپ به راست: چاهک ۱. لدر ۱۰۰ bp، چاهک ۲. نمونه شاهد (بدون آنزیم)، چاهک ۳ و ۴. نمونه خون بیمار، چاهک‌های ۵ و ۶. نمونه بافت توموری، چاهک‌های ۷ و ۸ و ۹ و ۱۰. رده‌های سلولی سرطانی است.

بحث و نتیجه‌گیری

در ژن اکسین ۲ 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 آگزون ۷ ژن اکسین ۲ مشاهده کردند (۱۵). Taniguchi و همکارانش نیز در بررسی ۷۳ نمونه بیمار

در مطالعات گذشته اهمیت جهش در اکسین ۲ در تومورهای کولورکتال اثبات شده است؛ Khan و همکارانش جهش G>T (Gct>Tct) در اکسین ۲ (ex7) در کدون G6۹۵T با فراوانی ۶ درصد مشاهده کردند که می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت این آگزون

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 ویژه‌ای برخوردار است. از این رو با مطالعاتی که اخیراً انجام گرفته، 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 به صورت فردبه‌فرد می‌تواند نقش و اهمیت این‌گونه واریانت‌ها را بیشتر مشخص کند؛ بنابراین با توجه به نتایج مطالعات گذشته که جهش‌های زیادی را در ناحیه اگزون ۷ ژن اکسین ۲ در بسیاری از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ثبت کرده‌اند؛ بررسی میزان بیان این ژن و کیفیت عملکرد پروتئین اکسین ۲ 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. *Ann Oncol* 2007;18(3): 581-92.
4. Ghavami SB, Chaleshi V, Derakhshani S, Aimzadeh P, Asadzadeh-Aghdaie H, Zali MR. Association

مبتلا به سرطان هپاتوسلولار ۲ مورد جهش در این ناحیه مشاهده کردند (۱۶)؛ Kai-Feng Pan و همکارانش نیز با مطالعه بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به سرطان معده ۱ مورد جهش در اگزون ۷ ژن اکسین ۲ مشاهده کردند (۱۷). علاوه بر آن نتایج مبنی بر تأثیر واریانت‌های نادر در علت‌یابی بیماری‌ها نیز به‌دست آمده‌است (۱۸)، که می‌تواند بیانگر اهمیت بررسی واریانت‌های نادر در پزشکی فردی شده^۱ 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 از جمله تنوع بالا در عوامل مؤثر در ابتلا به سرطان کولورکتال (تغییرات ژنتیکی می‌تواند یکی از آن عوامل باشد؛ نه تنها 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 این‌گونه مطالعات اکتفا کرد؛ بنابراین میزان شیوع و اثرات بالینی یک جهش باید به روش‌های آزمایشگاهی نیز موردبررسی قرار گیرد.

- 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

- (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.

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

Atiye Jalalifar¹, Shahla Mohammad Ganji^{2*}, Zarrin Minuchehr³, Mahmood Khaniki⁴, Behrooz Abbaszade Moakher⁵

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