مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۳۰/هفته دوم خرداد ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۴

پلی‌مورفیسم تکرار دی‌نوکلئوتید GT در ژن PIK۳CA و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان کلورکتال

سها پارسافر[۱]، دکتر منوچهر توسلی[۲]، دکتر سیمین همتی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنکوژن PIK۳CA که کد کننده‌ی P۱۱۰α می‌باشد، یکی از ژن‌هایی است که به طور گسترده‌ای در سرطان‌های انسانی از جمله کلورکتال دچار جهش می‌شود. یک ناحیه از توالی تکراری از دی نوکلئوتید GT در اینترون ۱ این ژن وجود دارد که پلی مورفیسم و ارتباط این میکروستلایت با سرطان، در گذشته مورد مطالعه قرار نگرفته بود. در این مطالعه، پلی مورفیسم GT در اینترون ۱ این ژن در بین افراد مبتلا به سرطان کلورکتال و افراد سالم بررسی شد و ارتباط آن با سرطان کلورکتال مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: نمونه‌ی خون محیطی از ۱۰۳ فرد بیمار و ۱۰۰ فرد سالم جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، ناحیه‌ی حاوی تکرار دو نوکلئوتیدی GT با تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) تکثیر شد و تعداد تکرارها، به وسیله‌ی الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید مشخص و تعیین توالی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۸ آلل مختلف در محدوده‌ی بین ۱۳تا ۲۰ تکرار GT و ۲۴ ترکیب آللی مختلف (ژنوتیپ) در بین افراد شاهد و مورد تشخیص داده شد. افراد با دو آلل کوتاه‌تر از ۱۷ تکرار GT، در معرض خطر بالاتری در ابتلا به سرطان کلورکتال قرار داشتند ($P = ۹ \times ۱۰^{-۶}$، OR = ۳/۶۵) و در مقابل، افراد با دو آلل بلندتر از ۱۶ تکرار GT، ۵/۶ مرتبه کمتر به سرطان کلورکتال مبتلا شده بودند ($P = ۳/۵ \times ۱۰^{-۶}$، OR = ۰/۱۸).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این پژوهش، آلل‌های بلند تکرار GT واقع در اینترون ۱ ژن PIK۳CA، نقش محافظت کنندگی در برابر سرطان کلورکتال دارند و برعکس، آلل‌های کوتاه با خطر افزایش ابتلا به سرطان کلورکتال مرتبط می‌باشند.

واژگان کلیدی: PIK۳CA، سرطان کلورکتال، تکرار GT، پلی مورفیسم

ارجاع: سها پارسافر، توسلی منوچهر، همتی سیمین. **پلی‌مورفیسم تکرار دی نوکلئوتید GT در ژن PIK۳CA و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان کلورکتال.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۳۰): ۴۹۴-۴۸۴

مقدمه

سرطان وقتی شروع می‌شود که یک سلول در بخشی از بدن، از قید قوانین طبیعی تقسیم سلولی خارج می‌شود و شروع به تکثیر خود مختار می‌کند. تمامی سلول‌های تولید شده از این سلول، رفتار تکثیر غیر طبیعی را نشان می‌دهند. توده‌ی سلولی ایجاد شده از این سلول‌های غیر طبیعی، می‌تواند داخل بافت منشأ باقی بماند که سرطان در محل (In situ cancer) نامیده می‌شود یا این که شروع به تهاجم به بافت‌های مجاور می‌کند که در این حالت به آن سرطان مهاجم

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار،گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه پرتودرمانی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: منوچهر توسلی
Email: manoochehr@biol.ui.ac.ir

(Invasive cancer) گفته می‌شود. تومور مهاجم، بدخیم (Malignant) می‌باشد و سلول‌هایی که از تومور بدخیم به داخل خون یا لنف رها می‌شوند، در سراسر بدن تومورهای جدید ایجاد می‌کنندکه به آن متاستاز گفته می‌شود (۲-۱).

سرطان کلورکتال اغلب به عنوان یک رشد کوچک در دیواره‌ی روده آغاز می‌شود که پولیپ روده‌ی بزرگ یا آدنوما نامیده می‌شود. این رشدهای قارچی شکل اغلب خوشخیم‌اند، اما بعضی از آن‌ها با مرور زمان به سرطان تبدیل می‌شوند که به طور معمول از طریق کلونوسکوپی تشخیص داده می‌شوند (۳). سرطان کولورکتال شایع‌ترین سرطان دستگاه گوارش و سومین سرطان رایج در جهان می‌باشد که عامل اصلی بروز آن به طور دقیق شناخته نشده است. فعال شدن مسیر سیگنالینگ PI۳K/AKT یکی از رایج‌ترین مکانیسم‌های مرتبط با سرطان کلورکتال در نظر گرفته می‌شود (۵-۴). موتاسیون در ژن PIK۳CA که کد کننده‌ی P۱۱۰α (زیر واحد کاتالتیکی کلاس ۱ PI۳K) می‌باشد، در بسیاری از سرطان‌های انسانی از جمله تخمدان، پستان، سر و گردن، مجاری ادراری، سرویکس و کلورکتال گزارش شده است. این ژن که در ناحیه‌ی ۳q۲۶/۳۲ واقع شده است، حاوی ۲۱ اگزون می‌باشد (۷-۶).

Samuels و همکاران برای اولین بار در سال ۲۰۰۴ جهش سوماتیک PIK۳CA را در چندین سرطان انسانی از جمله سرطان کلورکتال شناسایی کردند (۸). این جهش در ۳۲-۱۰ درصد از سرطان‌های کلورکتال مشاهده شده است (۹-۸). بررسی بیوانفورماتیکی ژن PIK۳CA یک ناحیه از توالی تکراری GT در اینترون ۱ این ژن را نشان می‌دهد. در بین کلاس‌های مختلف میکروستلایت‌ها، تکرارهای دو نوکلئوتیدی GT/CA، فراوان‌ترین تکرار در ژنوم انسان می‌باشند که به عنوان تنظیم کننده‌ی سطوح رونویسی عمل می‌کنند. از آن جایی که ژن PIK۳CA نقش آنکوژنی در بسیاری از سرطان‌ها ایفا می‌کند و با توجه به تأثیر پلی مورفیسم اشاره شده بر روی بیان ژن، پژوهش حاضر با هدف بررسی تعداد تکرارهای GT در اینترون ۱ ژن PIK۳CA و ارتباط احتمالی آن با خطر ابتلا به سرطان کلورکتال انجام شد.

روش‌ها

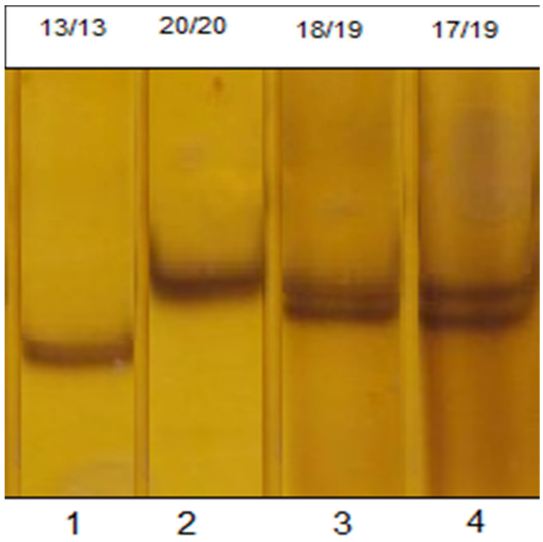
نمونه‌گیری خون از ۱۰۳ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال و ۱۰۰ فرد سالم، در واحد نمونه‌گیری بیمارستان حضرت سیدالشهدا (ع) شهر اصفهان با رضایت کتبی انجام شد. در مرحله‌ی بعد، اطلاعات بالینی و خانوادگی و درجه‌ی پیشرفت بیماری از پرونده‌ی بایگانی شده‌ی بیماران جمع‌آوری شد. DNA ژنومی با استفاده از روش نمکی میلر استخراج گردید (۱۰) و ناحیه‌ی پلی مورفیسم مورد نظر توسط پرایمرهای پیشرو (۵'-ACTGTTCTGCAGTGTCATCAG-۳') و پیرو (۵'-GTGAGATGAAAAAACTTAAGC-۳') تکثیر گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR یا Polymerase chain reaction) در حجم نهایی ۲۵ µl حاوی ۱۰۰-۲۰۰ ng DNA ژنومی، ۰/۲ mM dNTP (Deoxynucleotide triphosphate)، ۰/۲ µM از هر یک از پرایمرهای پیشرو و پیرو، ۲/۵ µl از بافر PCR ۱۰x، ۱/۵ mM $MgCl_2$ و ۲ واحد آنزیم SmarTag DNA polymerase (شرکت سیناژن

تهران) در دستگاه ترمو سایکلر شرکت اپندورف انجام شد.

پس از واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۳ سیکل PCR در دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه به منظور واسرشت شدن رشته‌ها، ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال پرایمرها و ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه جهت گسترش پرایمرها انجام شد. یک سیکل انتهایی نیز جهت تکثیر توالی‌های ناقص به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C در نظر گرفته شد.

محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط ژل آگارز ۱ درصد تأیید و جهت بررسی پلی مورفیسم ژن PIK۳CA از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد غیر واسرشت (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis PAGE) استفاده و در نهایت رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره به منظور آشکارسازی نتایج انجام شد (شکل ۱).

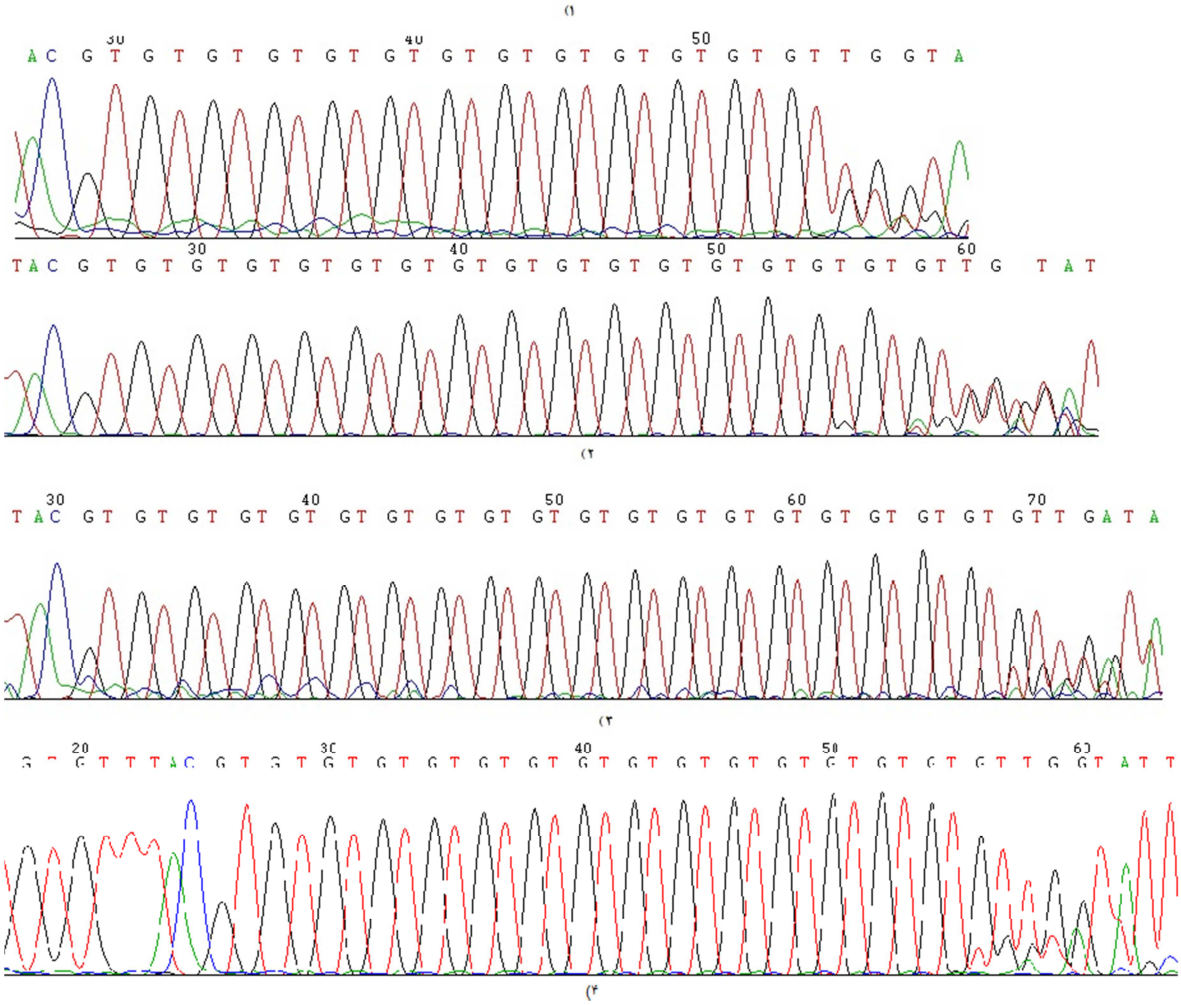
پس از مشاهده‌ی پلی مورفیسم، نمونه‌های ۲، ۱ و ۴ توسط کیت استخراج DNA از ژل آگارز شرکت فرمنتاز خالص‌سازی شدند. سپس جهت تعیین توالی به شرکت سینا کلون تهران ارسال شدند. نمونه‌های تعیین توالی شده به عنوان نشانگر برای تعیین دقیق طول تکرارهای آلل بیماران و افراد سالم مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲). اختلاف در توزیع آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف، در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون χ^2 بررسی گردید. نسبت افزاینده (Odd ratio یا OR) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد به عنوان شاخص ارتباط پلی مورفیسم ژنوتیپ‌های مختلف و خطر ابتلا به سرطان کلورکتال، در گروه‌های مورد مطالعه، محاسبه گردید. در تمامی محاسبات، سطح احتمال $P < ۰/۰۵۰$، از نظر آماری معنی‌دار فرض شد و مورد قبول واقع گشت. در این مطالعه، نسبت افزاینده و CI (Confidence interval) با استفاده از سرویس اینترنتی SISA (Simple interactive statistical analysis) تعیین شد.



شکل ۱. تصویر ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد جهت بررسی پلی مورفیسم GT در اینترون ۱ ژن PIK۳CA، اندازه‌ی متفاوت آلل‌ها نشان دهنده‌ی اختلاف در تعداد تکرار GT در افراد مختلف می‌باشد. نمونه‌ی ۱ حاوی کوچک‌ترین آلل (هموزیگوت ۱۳)، نمونه‌ی ۲ حاوی بزرگ‌ترین آلل (هموزیگوت ۲۰)، نمونه‌ی ۳ (هتروزیگوت ۱۹/۱۸) و نمونه‌ی ۴ (هتروزیگوت ۱۹/۱۷) قابل مشاهده می‌باشند. نمونه‌های ۱، ۲ و ۴ جهت تعیین توالی انتخاب شدند.

یافته‌ها

با توجه به توانایی کم ژل آگارز در جداسازی قطعات DNA با اختلاف طول نزدیک به هم، برای اندازه‌گیری دقیق تعداد تکرارهای توالی GT واقع در اینترون ۱ ژن PIK۳CA، بررسی‌های بعدی محصول PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد انجام شد (شکل ۱).



شکل ۲. تعیین توالی سه نمونه با تکرارهای GT متفاوت. نمونه‌ی ۱ هتروزیگوت ۱۳، نمونه‌ی ۲ هتروزیگوت ۱۷ (۱۷/۱۹)، نمونه‌ی ۳ هموزیگوت ۲۰ و نمونه‌ی ۴ هموزیگوت ۱۶

در این مطالعه، ۸ آلل مختلف در محدوده‌ی بین ۲۰-۱۳ تکرار در بین افراد مورد و شاهد تشخیص داده شد. نمودار سه ژنوتیپ تعیین توالی شده در شکل ۲ آمده است. از بین این آلل‌ها، آلل ۱۴ تکرار در بین افراد مورد (۳۱/۵۵ درصد) وآلل ۱۷ تکرار در بین افراد شاهد (۲۳/۰۰ درصد)، بیشترین فراوانی را داشت. دومین آلل رایج در بین افراد مورد و شاهد، آلل ۱۶ تکرار با فراوانی به ترتیب (۲۶/۶۹ درصد) و (۲۰/۵۰ درصد) مشاهده شد. آلل ۱۳ تکرار کم‌ترین فراوانی را در بین افراد شاهد (۰/۵ درصد) و مورد (۰/۴۸ درصد) داشت (جدول ۱).

در افراد تحت بررسی ۲۴ ترکیب آللی (ژنوتیپ) مختلف برای ژن PIK۳CA مشاهده شد. در این میان، ترکیب آللی ۱۴/۱۴ بیشترین فراوانی در بیماران (۱۶/۵۰ درصد) و ترکیب آللی ۱۸/۱۶ بیشترین فراوانی در افراد شاهد را با (۱۲ درصد) به خود اختصاص داد. توزیع میزان فراوانی ترکیبات آللی ژن PIK۳CA در بین افراد مورد و شاهد در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول ۱. فراوانی آلل‌های مختلف تکرار GT اینترون ۱ ژن PIK۳CA در بین افراد مورد و شاهد

آلل	فراوانی آلل (درصد) مورد	فراوانی آلل (درصد) شاهد	Odd ratio	P value
$GT_{۱۳}$	۱ (۰/۴۸)	۱ (۰/۵)	۱/۰۳	۱
$GT_{۱۴}$	۶۵ (۳۱/۵۵)	۳۱ (۱۵/۵)	۳/۸۰	۰
$GT_{۱۵}$	۳۹ (۱۸/۹۳)	۲۹ (۱۴/۵)	۱/۴۹	۰/۰۵۸۰
$GT_{۱۶}$	۵۵ (۲۶/۶۹)	۴۱ (۲۰/۵)	۱/۶۴	۰/۰۱۲۳
$GT_{۱۷}$	۲۸ (۱۳/۵۹)	۴۶ (۲۳/۵)	۰/۴۰	$۸/۲ \times ۱۰^{-۶}$
$GT_{۱۸}$	۱۰ (۴/۸۵)	۲۴ (۱۲/۵)	۰/۳۴	۰/۰۰۰۱
$GT_{۱۹}$	۶ (۲/۹۰)	۱۸ (۹/۵)	۰/۲۸	۰/۰۰۰۱
$GT_{۲۰}$	۲ (۰/۹۷)	۱۰ (۵/۵)	۰/۱۷	۰/۰۰۰۵

جدول ۲. فراوانی انواع ترکیبات آللی مشاهده شده در افراد مورد و شاهد

ژنوتیپ	تعداد تکرار GT		تعداد افراد مورد	تعداد افراد شاهد
	آلل ۱	آلل ۲		
SS	۱۳	۱۶	۱	۰
	۱۴	۱۴	۱۷	۴
	۱۵	۱۴	۶	۴
	۱۶	۱۴	۱۵	۱۰
	۱۵	۱۵	۸	۴
	۱۶	۱۵	۷	۴
	۱۶	۱۶	۱۰	۵
مجموع SS			۶۴	۳۱
LS	۱۳	۲۰	۰	۱
	۱۴	۱۷	۷	۸
	۱۴	۱۸	۳	۱
	۱۵	۱۷	۶	۱۱
	۱۵	۱۸	۲	۱
	۱۵	۱۹	۲	۱
	۱۶	۱۷	۸	۵
	۱۶	۱۸	۴	۱۲
مجموع LS			۳۲	۳۰
LL	۱۷	۱۷	۲	۷
	۱۷	۱۹	۲	۷
	۱۷	۲۰	۱	۱
	۱۸	۱۸	۰	۲
	۱۸	۱۹	۰	۵
	۱۸	۲۰	۱	۱
	۱۹	۱۹	۱	۱
	۱۹	۲۰	۰	۳
	۲۰	۲۰	۰	۲
مجموع LL			۷	۲۹

آلل S (Short): آلل‌هایی با تعداد تکرار GT مساوی و یا کوچک‌تر از ۱۶؛ آلل L (Long): آلل‌هایی با تعداد تکرار GT بزرگ‌تر از ۱۶

جدول ۳. بررسی وجود ارتباط میان مجموع آلل‌ها و خطر بروز سرطان کلورکتال

آلل	فراوانی در افراد شاهد (درصد)	فراوانی در افراد مورد (درصد)	(Odd ratio) OR	مقدار P	فاصله‌ی اطمینان (CI)
مجموع S	۱۰۲ (۵۱)	۱۶۰ (۷۸/۶۴)	۳/۳۴	۰	۲/۱۷۵–۵/۱۳۴
مجموع L	۹۸ (۴۹)	۴۶ (۲۱/۳۴)	۰/۳۰	< ۰/۰۰۱	۰/۱۹۵–۰/۴۶۰

S آلل کوچک‌تر از ۱۷ تکرار، L آلل بزرگ‌تر از ۱۶ تکرار

جدول ۴. فراوانی، Odd-ratio و مقدار P ژنوتیپ‌های SS، SL و LL در بین افراد مورد و شاهد

ژنوتیپ	فراوانی در افراد مورد (درصد)	فراوانی در افراد شاهد (درصد)	OR (Odd ratio)	مقدار P	فاصله‌ی اطمینان (CI)
SS	۶۴ (۶۲/۱۳)	۳۱ (۳۱)	۳/۶۵۰	۹×۱۰^{-۶}	۲/۰۴۰–۶/۵۳۰
SL	۳۲ (۳۱/۰۶)	۴۰ (۴۰)	۰/۶۸۰	۰/۱۸۳۵۰۰	۰/۳۸۰–۱/۲۰۰
LL	۷ (۶/۷۹)	۲۹ (۲۹)	۰/۱۷۸	$۳/۵ \times ۱۰^{-۶}$	۰/۰۷۴–۰/۴۳۰
دو آلل مساوی و بزرگ‌تر از ۱۸ تکرار	۲ (۱/۹۰)	۱۴ (۱۴)	۰/۱۲۲	۰/۰۰۱۴۳۴	۰/۰۲۷–۰/۵۵۰

با توجه به توزیع متفاوت ژنوتیپ ها بین افراد شاهد و مورد و برای تسهیل محاسبات آماری، آلل ها به دو گروه تقسیم شدند. آلل های کوچک‌تر و مساوی ۱۶تکرار GT، تحت عنوان آلل S (Short) و آن‌هایی که بزرگ تر از ۱۶ تکرار GT بودند، تحت عنوان آلل L (Long) نام‌گذاری شدند. بنابراین سه نوع ترکیب آللی SS، SL و LL در افراد وجود داشت.

فراوانی آلل های L در افراد شاهد بیشتر از مورد بود و احتمال می‌رود که حاملین این آلل‌ها کمتر از افراد فاقد این آلل‌ها به سرطان کلورکتال مبتلا شوند. به عبارت دیگر، آلل‌های بزرگ نقش محافظت کنندگی در ایجاد سرطان کلورکتال دارند. صحت این مطلب با توجه به آزمون‌های آماری موجود در جدول ۳ برای مجموع آلل‌های بزرگ تکرار GT (L)، یعنی نسبت افزاینده‌ی OR = ۰/۳ و سطح معنی‌داری P < ۰/۰۰۱ تأیید می‌شود. برعکس، فراوانی آلل‌های S در بین افراد مورد بیشتر از افراد شاهد می‌باشد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که حاملین این آلل‌ها بیشتر از بقیه‌ی افراد به سرطان کلورکتال مبتلا می‌شوند. محاسبات آماری این افزایش خطر را تأیید می‌کند (OR = ۳/۳۴ ،P < ۰/۰۰۱) (جدول ۳).

فراوانی ژنوتیپ‌های SS در افراد مورد بیشتر از افراد شاهد بود. فراوانی بیشتر این ژنوتیپ‌ها در افراد مورد، این فرضیه را مطرح می‌کند که افراد با این ترکیب‌های آللی، بیشتر از افراد فاقد این آلل‌ها به سرطان کلورکتال مبتلا می‌شوند. صحت این مطلب با توجه به آزمون‌های آماری موجود در جدول ۴ تأیید می‌شود ($OR = ۳/۶۵ ،P = ۹ \times ۱۰^{-۶}$). به عبارت دیگر، احتمال ابتلای افراد دارای ژنوتیپ‌های SS به سرطان کلورکتال بیشتر از افرادی است که دارای سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشند. این نتایج نشان می‌دهد که احتمال دارد ژنوتیپ‌های SS نقش مؤثری در خطر بروز سرطان کلورکتال ایفا می‌کنند. افرادی که حامل دو آلل بزرگ‌تر از ۱۶ تکرار می‌باشند،

نسبت به افرادی که حامل آلل‌های دیگر می‌باشند ۵/۶ مرتبه کمتر در خطر ابتلا به سرطان کلورکتال می‌باشند (OR = ۰/۱۷۸) و این اثر محافظت کنندگی با افزایش طول تکرارها افزایش پیدا می‌کند؛ به طوری که افرادی که حامل دو آلل مساوی و بزرگتر از ۱۸ تکرار می‌باشند، نسبت به افرادی که حامل آلل‌های دیگرند، ۸/۲ مرتبه کمتر در خطر ابتلا به سرطان کلورکتال می‌باشند (OR = ۰/۱۲۲) (جدول ۴).

در مرحله‌ی بعد ارتباط بین ژنوتیپ توالی تکراری GT ژن PIK۳CA بر سن بروز بیماری، درجه‌ی پیشرفت بیماری و جنسیت بیماران مورد بررسی قرار گرفت، اما هیچ ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. به هر حال، برای کسب نتایج دقیق‌تر انجام آزمایش‌های بیشتر بر روی جمعیت‌های بزرگ‌تر نیاز است.

بحث

سرطان کلورکتال سومین سرطان شایع در سراسر جهان می‌باشد که سالیانه منجر به مرگ تقریبی ۶۰۰۰۰۰۰ نفر در جهان می‌گردد. این بیماری به عنوان یک سرطان پیچیده‌ی چند ژنی در نظر گرفته می‌شود که در روند بیماری‌زایی آن، تجمع چندین موتاسیون توارثی و سوماتیکی منجر به بروز این بدخیمی می‌گردد. با توجه به پیچیدگی ذکر شده، تفسیر رفتار بیولوژیکی تومورها تنها بر اساس یک نشانگر، کار ساده‌ای نمی‌باشد. در میان چندین مسیر مولکولی مرتبط با این بیماری، سه مسیر مولکولی اصلی در روند بیماری‌زایی این سرطان، نقش عمده‌ای دارند: ۱) مسیر ناپایداری کروموزمی (CIN یا Chromosomal instability)، ۲) مسیر ناپایداری میکروستلایت (MSI یا Microsatellite instability) و ۳) فنوتیپ (CpG island methylator phenotype) CIM (۱۷-۲۲).

PI۳Kها، لیپید کینازهای هترودایمری هستند که از زیر واحدهای کاتالایتیک و تنظیمی تشکیل شده‌اند که با فسفریله کردن PIP۲، پیامبر ثانویه‌ی PIP۳ را تولید و در مسیرهای سیگنالی مهمی ایفای نقش می‌کنند. PI۳K منجر به تنظیم و ترفیع فرایندهای سلولی متعدد از جمله تکثیر سلولی، مهاجرت سلولی، متابولیسم و آپوپتوز می‌گردد. بر اساس مطالعات انجام شده، فعال شدن آنکوژن PIK۳CA (کد کننده‌ی زیر واحد کاتالایتیکی کلاس ۱ PI۳K) در سرطان کلورکتال بسیار شایع می‌باشد. جهش‌های فعال کننده‌ی این ژن در تمامی کارسینوماهای کلورکتال منجر به کاهش بقای فرد می‌گردد (۲۶).

تا کنون تحقیقی در مورد پلی مورفیسم تکرارهای GT اینترون ۱ ژن PIK۳CA و نیز ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان کلورکتال صورت نگرفته است. در این تحقیق، پلی مورفیسم تکرارهای GT و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان کلورکتال مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که افراد دارای آلل‌ها و ژنوتیپ‌های کوتاه (GT < ۱۷) در معرض خطر افزایش یافته‌ی ابتلا به این سرطان هستند و همچنین آلل‌ها و ژنوتیپ‌های بلند تکرار GT واقع در اینترون ۱ ژن PIK۳CA (GT > ۱۶)، نقش محافظت کنندگی در برابر سرطان کلورکتال ایفا می‌کنند. ارتباط به نسبت قوی آلل‌های کوتاه با افزایش خطر ابتلا به سرطان کلورکتال و فراوانی بالای این آلل‌ها در جمعیت بیماران، پیشنهاد می‌کند که شاید بتوان از این آلل‌ها به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی دهنده برای سرطان کلورکتال،

حداقل در جمعیت اصفهان استفاده نمود.

در بین کلاس‌های مختلف میکروستلایت‌ها، تکرارهای دو نوکلئوتیدی GT/CA، فراوان‌ترین تکرار در ژنوم انسان می‌باشند که ممکن است به عنوان تنظیم کننده‌ی سیس در رابطه با سطوح رونویسی عمل نمایند. تأثیر تکرارهای GT بر رونویسی احتمال دارد به علت شکل‌گیری ساختارهایی غیر از ساختار DNA B باشد (۱۲-۱۱). ساختارهای پورین/پیریمیدینی این تکرارها، پتانسیل اخذ ساختارهایی مانند DNA Z را به ناحیه‌ی مربوط می‌دهند که می‌تواند منجر به مهار دسترسی عامل رونویسی به منطقه‌ی مورد نظر شود (۲۹).

علاوه بر این، تکرارهای دو نوکلئوتیدی GT، می‌توانند رونویسی ژن را از طریق کاهش کارایی RNA Pol II تحت تأثیر قرار دهند (۳۰، ۲۴-۲۳). در میان عواملی که بر سطوح رونویسی ژن‌ها اثر می‌گذارند، طول ژن یکی از مهم‌ترین عوامل محسوب می‌شود. مطالعات مختلف حاکی از تأثیر توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی GT/CA واقع در اینترون ۱ تعدادی از ژن‌ها بر روی بیان آن‌ها می‌باشد (۱۴-۱۳) و در بیشتر مطالعات پیشین مشخص شده است که فراوانی تکرارهای دوتایی و بیان ژن به شکلی معکوس با هم مرتبط می‌باشند (۲۸-۲۷، ۲۵) و تکرارهای بلند GT تأثیر منفی بر رونویسی دارد که این اثر منفی، با افزایش طول تکرارها بیشتر می‌شود (۱۶-۱۵)؛ فرضیه‌ای که نتایج به دست آمده از این تحقیق نیز از آن حمایت می‌کند.

از آن جایی که ژن PIK۳CA نقش آنکوژنی در سرطان‌ها ایفا می‌کند، احتمال دارد افزایش تعداد تکرارهای GT در اینترون ۱ منجر به کاهش بیان آن و نیز منجر به نقش محافظت کنندگی آلل‌های بلند تکرارهای GT اینترون ۱ ژن PIK۳CA در برابر سرطان کلورکتال شود. بر عکس، احتمال دارد آلل‌های کوتاه باعث افزایش بیان و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به سرطان شوند. تحقیقات بیشتر جهت مشخص شدن ارتباط بین طول تکرارهای GT و میزان بیان ژن PIK۳CA نیاز می‌باشد.

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری میان تعداد تکرار GT ژن PIK۳CA و سن بروز بیماری، درجه‌ی پیشرفت بیماری و جنسیت بیماران مشاهده نشد.

ارتباط به نسبت قوی آلل‌های کوتاه با افزایش خطر ابتلا به سرطان کلورکتال و فراوانی بالای این آلل‌ها در جمعیت بیماران، پیشنهاد می‌کند که شاید بتوان از این آلل‌ها به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی دهنده برای سرطان کلورکتال در جمعیت اصفهان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

در پایان از حمایت معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان در راستای انجام این پروژه، از کلیه‌ی بیماران محترم، عوامل بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان به خاطر در اختیار قرار دادن اطلاعات پزشکی و نمونه‌ی خون بیماران و خانم الهه جان‌نثاری به خاطر یاری ایشان در جمع‌آوری نمونه‌ها و همچنین کلیه‌ی افرادی که به صورت مادی و معنوی به انجام این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? J Pathol 2011; 223(2): 148-62.
2. Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. Molecular biology of cancer. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc.; 2003. p. 213-21.
3. Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. BMJ 2011; 343: d6617.
4. Liu KQ, Liu ZP, Hao JK, Chen L, Zhao XM. Identifying dysregulated pathways in cancers from pathway interaction networks. BMC Bioinformatics 2012; 13: 126.
5. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, et al. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. Cancer Res 2005; 65(11): 4562-7.
6. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. Br J Cancer 2006; 94(4): 455-9.
7. Guo XN, Rajput A, Rose R, Hauser J, Beko A, Kuropatwinski K, et al. Mutant PIK3CA-bearing colon cancer cells display increased metastasis in an orthotopic model. Cancer Res 2007; 67(12): 5851-8.
8. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science 2004; 304(5670): 554.
9. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. Int J Cancer 2008; 122(10): 2255-9.
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.
11. Sawaya S, Bagshaw A, Buschiazzo E, Kumar P, Chowdhury S, Black MA, et al. Microsatellite tandem repeats are abundant in human promoters and are associated with regulatory elements. PLoS One 2013; 8(2): e54710.
12. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med 2009; 361(25): 2449-60.
13. Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. Hum Mol Genet 1993; 2(8): 1123-8.
14. Hui J, Hung LH, Heiner M, Schreiner S, Neumuller N, Reither G, et al. Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. EMBO J 2005; 24(11): 1988-98.
15. Zhang W, He L, Liu W, Sun C, Ratain MJ. Exploring the relationship between polymorphic (TG/CA)n repeats in intron 1 regions and gene expression. Hum Genomics 2009; 3(3): 236-45.
16. Levinson G, Gutman GA. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in Escherichia coli K-12. Nucleic Acids Res 1987; 15(13): 5323-38.
17. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. Front Oncol 2014; 4: 35.
18. Sharma VK, Kumar N, Brahmachari SK, Ramachandran S. Abundance of dinucleotide repeats and gene expression are inversely correlated: a role for gene function in addition to intron length. Physiol Genomics 2007; 31(1): 96-103.
19. Agarwal AK, Giacchetti G, Lavery G, Nikkila H, Palermo M, Ricketts M, et al. CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2: effects on gene expression and salt sensitivity. Hypertension 2000; 36(2): 187-94.
20. Dufour C, Capasso M, Svahn J, Marrone A, Haupt R, Bacigalupo A, et al. Homozygosis for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. Br J Haematol 2004; 126(5): 682-5.
21. Zhang W, He L, Liu W, Sun C, Ratain MJ. Exploring the relationship between polymorphic (TG/CA)n repeats in intron 1 regions and gene expression. Hum Genomics 2009; 3(3): 236-45.
22. Gemayel R, Cho J, Boeynaems S, Verstrepen KJ. Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. Genes (Basel) 2012; 3(3): 461-80.
23. Gao PS, Heller NM, Walker W, Chen CH, Moller M, Plunkett B, et al. Variation in dinucleotide (GT) repeat sequence in the first exon of the STAT6 gene is associated with atopic asthma and differentially regulates the promoter activity in vitro. J Med Genet 2004; 41(7): 535-9.
24. Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, et al. Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. FEBS Lett 1999; 455(1-2): 70-4.

25. Phipps AI, Makar KW, Newcomb PA. Descriptive profile of PIK3CA-mutated colorectal cancer in postmenopausal women. Int J Colorectal Dis 2013; 28(12): 1637-42.
26. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer Res 2009; 69(5): 1851-7.
27. Kato S, Iida S, Higuchi T, Ishikawa T, Takagi Y, Yasuno M, et al. PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. Int J Cancer 2007; 121(8): 1771-8.
28. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. J Biol Chem 1999; 274(19): 13176-80.
29. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. PLoS One 2013; 8(6): e65479.
30. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. N Engl J Med 2012; 367(17): 1596-606.

Journal of Isfahan Medical School Received: 11.03.2015

Vol. 33, No. 330, 2nd Week, June 2015 Accepted: 24.04.2015

Polymorphic GT Dinucleotide Repeat in the PIK3CA Gene and its Association with Colorectal Cancer Risk

Soha Parsafar[1], Manoochehr Tavassoli PhD[2], Simin Hematti PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: The PIK3CA oncogene, which encodes p110α, is one of the most mutated genes in human cancers such as colorectal. A polymorphic GT dinucleotide repeat exists in intron 1 of the PIK3CA gene**.** Till this research, there were no study on polymorphism of PIK3CA gene microsatellites and their relationship with cancer risk. In the present study, we investigated GT repeat polymorphism in the intron 1 of this gene among patients with colorectal cancer and healthy individuals and evaluated the association between this polymorphism and the potential genetic susceptibility to the development of colorectal cancer.

Methods: Peripheral blood samples were collected from 103 patients with colorectal cancer and 100 healthy blood donors. After DNA extraction, GT dinucleotide region was amplified using polymerase chain reaction (PCR) technique and the number of GT repeats was determined via polyacrylamide gel electrophoresis.

Findings: Eight distinct alleles were identified in these subjects, ranging in size from 13 to 20 GT repeats. People with two alleles shorter than 17 GT repeat had a significantly higher risk of developing colorectal cancer (OR = 3.65, $P = 9 \times 10^{-6}$); in contrast, people with two alleles longer than 16 GT repeat were at a significantly lower risk of colorectal cancer (OR = 0.18, $P = 3.5 \times 10^{-6}$).

Conclusion: Our findings indicate significant relationship between the numbers of repetitive sequences in intron 1 of PIK3CA gene and the risk of colorectal cancer.

Keywords: PIK3CA, Colorectal cancer, GT repeat, Polymorphism

Citation: Parsafar S, Tavassoli M, Hematti S. **Polymorphic GT Dinucleotide Repeat in the PIK3CA Gene and its Association with Colorectal Cancer Risk.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(330): 484-94

1- MSc Student, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Radiotherapy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Manoochehr Tavasoli PhD, Email: manoochehr@biol.ui.ac.ir