

## **SUMMARY AND CONCLUSION**

Infection with Hepatitis C Virus (HCV) is a major risk factor for the development of HCC. Despite the fact that HCV is a RNA virus without a DNA intermediate, recent studies demonstrate that HCV viral proteins may actively participate in epigenetic regulation of hepatic cancer stem cell phenotypes and induce HCC-specific epigenetic changes. Identification of host epigenetic alterations induced by HCV infection and epigenetic differences between hepatic cancer stem cells and the bulk non-tumorigenic cancer cells, may yield potential biomarkers for early detection, as well as therapeutic targets for HCV associated HCC.

Distinct epigenetic marks decide which sets of genes may be expressed and which genes are kept silent. Epigenetic marks can be grouped into four main categories: DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling and non coding RNA.

Cancer is caused by failure of checks and balances that control cell numbers in response to the needs of the whole organism. Inappropriate function of genes that promote or inhibit cell growth or survival can be caused by errors introduced into the genetic code itself or by faulty epigenetic mechanisms deciding which genes can and cannot be expressed.

DNA methylation patterns undergo complex changes in cancer. The total amount of methylated cytosine is usually decreased resulting in global hypomethylation. Besides global hypomethylation, most cancers also show focal hypermethylation in distinct subsets of promoter-associated CpG islands. Affected genes are permanently silenced, Methylation affects individual cancer patients with varying extent. While some patients have minimal changes, others show concordant hypermethylation of multiple genes. Epigenetic DNA methylation changes in cancer appear to be considerably more frequent events than genetic mutations. Epigenetic alterations are easier to reverse than mutations affecting the genetic code.

One short-term goal of diagnostic technologies is to reduce invasiveness and refine disease-forecasting. If specific epigenetic markers can be established for a specific disease, it will be feasible to use blood samples to analyze epigenetic signatures. The analysis of methylation in plasma or whole blood DNA could allow identifying aberrant methylation patterns before the onset of the symptoms. Since the disclosure of epigenetic regulation in key genes, many studies have shown the clinical efficacy of measuring promoter hypermethylation in various specimens such as tumor tissue, feces, and urine for determining the diagnosis and prognosis of cancer patients. Most studies have reported positive results. Unlike mutations, DNA methylation usually occurs at a fixed location in the promoter region of the gene, facilitating development of suitable assays. In addition, DNA methylation changes can be detected noninvasively in blood or other body fluids, making them ideal biomarkers.

Serine protease inhibitor gene (Kunitz type 2, SPINT2 or HAI-2) encodes a transmembrane protein with two extracellular Kunitz domains that inhibits a variety of serine proteases. The protein inhibits hepatocyte growth factor (HGF) activator, which prevents the formation of active hepatocyte growth factor. This gene is a putative tumor

suppressor. This gene is located at 19q13.1, The SPINT2 gene is located on the long (q) arm of chromosome 19 at position 13.1

The present work aimed at studying the methylation status of the promoter of serine peptidase inhibitor, kunitz type 2 (SPINT2) gene of chronic hepatitis-C virus (HCV) infected Egyptian patients with and without hepatocellular carcinoma.

In the present study 130 Egyptian adults were included, they were divided into two groups: group I (80 HCV infected patients) and group II (50 apparently healthy control subjects). Group I was further subdivided into two subgroups: group I a (50 HCV infected patients without HCC) and group I b (30 HCV infected patients with HCC). The methylation status of SPINT2 gene promoter was studied in the peripheral blood by using Methylation-specific PCR (MSP) technique.

According to child pugh classification of patients (group I) in the current study , patients with chronic HCV (group Ia) showed different classes of liver insult; class A was found in 46.5% ,class B in 41.9% and class C in 11.6 % of HCV patients .(Table VIII)

Frequent methylation may occur through activation of DNMT by HCV core protein, or it may be explained by longer infection period.

In the current study the methylation status of SPINT -2 in HCV group (Ia) showed that 60 % of cases were hemimethylated , 4 % were hypermethylated and 36 % were unmethylated. While in the control group (II) , 40 % of cases showed hemimethylation and 60 % of cases were unmethylated. None of cases showed hypermethylation. (Table XVa)

As for many other tumors, development of hepatocellular carcinoma (HCC) must be understood as a multistep process with accumulation of genetic and epigenetic alterations in regulatory genes.

In the present study, patients with HCV and superimposed HCC showed a methylation status as follows: 6.7% hypermethylated, 60 % hemimethylated and 33.3% unmethylated .(Table XVa)

In the current study, comparison was made between the 3 groups regarding the methylation status and results were divided into 3 categories: unmethylated and hemimethylated or hypermethylated. It was found that there was a statistically significant difference within the groups regarding the methylation status( $p=0.028$ ). (Table XV a), when the hemimethylated subjects and hypermethylated subjects were combined in one group (aberrantly methylated) there was a statistically significant difference within the groups regarding the methylation status. The aberrant methylation in control subjects was significantly less frequent than HCV ( $p= 0.01$ ) as well less frequent than HCC ( $p=0.021$ ) , however there was no significant difference between HCV and HCC as regards the methylation status . (Table XV b)

In the current study it was concluded that there was no significant correlation between age, AFP, HCV viral load , child pugh score and methylation status in the studied groups .(Tables VIII-XX)

In the present study we found increased risk to develop abnormal methylation in the SPINT2 gene promoter of HCV patients in comparison to the normal subjects, as crude

odd's ratio was 2.52 with 95 % confidence interval (1.23-5.14), to exclude the effect of aging as confounder that might affect the methylation status adjustment was made for odd's ratio and it was 2.4 with 95 % confidence interval (1.13-5.26).

The present study of qualitative MSP reveals a global picture of DNA methylation changes in HCV and HCC .Thus providing better understanding of the epigenetic mechanism that might underlie the stepwise progression of hepatocarcinogenesis .

### **From the present study the following could be concluded:**

- 1- The cases of aberrant methylation of SPINT2 gene promoter were statistically more frequent in HCV and HCC patients rather than control subjects.
- 2- There was increased risk to develop aberrant methylation in SPINT2 gene promoter in HCV patients rather than normal subjects.
- 3- There was no correlation between age ,AFP,HCV viral load , child pugh score and the methylation status in the studied subjects.
- 4- Hypermethylation of SPINT2 gene promoter was observed to be more frequent in patients with HCV and superimposed HCC (group Ib ) than HCV patients(group Ia).

### **Recommendations:**

- Larger sample size.
- Study of the methylation status of SPINT2 promoter gene in the liver tissues and correlating the finding with those of the peripheral blood.
- Quantification of methylation level using another quantitative methyl specific PCR method such as sequencing .
- Study of methylation of other genes like TMS1/ASC, RASSF1A, SEMA3B, hMSH3, FHIT and hMSH2 in liver cancer
- Clinical trials to prove and integrate epigenetic pathway modulating agents .

---

---

## REFERENCES

1. Chiu RK, Dennis Lo YM. Principles of molecular biology in : Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. 5th Ed. Elsevier Saunders Company. St Louis 2012,pp.1210.
2. Franklin S, Vondriska T M. Genomes, Proteomes and the Central Dogma. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011; 4(5): 576
3. Wright LK, Fisk JN, Newman DL. DNA→RNA: What Do Students Think the Arrow Means? *Life Sciences Education* 2014; 13:338–48.
4. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 2007; 128(4):635-8.
5. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML. *Epigenetics.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007.
6. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16 (1): 6-21.
7. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28 (10):1057- 68.
8. Kubicek S, Schotta G, Lachner M, Sengupta R, Kohlmaier A, Perez-Burgos L, et al. The role of histone modifications in epigenetic transitions during normal and perturbed development. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2006; 57:1-27.
9. Choi SW, Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr* 2010; 1(1): 8–16.
10. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic difference arise during the lifetime of monozygotic twin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(30): 10604-9.
11. Grewal SI, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 2007; 8(1): 35–46.
12. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* 2011;123 (19):2145-56.
13. Fedorova E, Zink D. Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta.*2008;1783 (11):2174 –84.
14. Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 2009;43:559 –99.
15. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatic assembly. *Science* 2001;292 (5514):110-3.

16. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23(1):62–6.
17. Beltran AS, Sun X, Lizardi PM, Blancafort P. Reprogramming epigenetic silencing: artificial transcription factors synergize with chromatin remodeling drugs to reactivate the tumor suppressor mammary serine protease inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2008;7(5):1080-90.
18. Georgel PT, Horowitz-Scherer RA, Adkins N, Woodcock CL, Wade PA, Hansen JC. Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J Biol Chem*. 2003;278(34):32181-8.
19. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(7):436-47.
20. Weksberg R, Sadowski P, Smith AC, Tycko B. Epigenetics. In: Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. Rimoin DL, Emery AEH (eds). 5th Ed. Churchill Livingstone Elsevier, California. 2007, pp. 81- 99.
21. Hassler MR, Egger G. Epigenomics of cancer – emerging new concepts. *Biochimie* 2012; 94(11): 2219–30.
22. Mack GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol* 2007; 25 (6) :631–8.
23. Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21 (3): 461-7.
24. Huh I, Zeng J, Park T, Yi SV. DNA methylation and transcriptional noise. *Epigenetics Chromatin*. 2013; 6(1):9.
25. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009;462 (7271):315–22.
26. Lander ES, Linton LM, Birren, B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 409 (6822): 860–921.
27. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 481–514.
28. Conerly M, Grady WM. Insights into the role of DNA methylation in disease through the use of mouse model. *Dis Model Mech* 2010;3(5-6): 290-7.
29. Morey C, Avner P. The demoiselle of X-inactivation: 50 years old and as trendy and mesmerising as ever. *PLoS Genet*. 2011;7(7):e1002212.

30. Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, Kaneda A. DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *World J Gastroenterol* 2014; 20(14): 3916-26.
31. CedarH, BergmanY. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(5):295-304.
32. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003;299(5613):1753-5.
33. Abramowitz LK, Bartolomei MS. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Curr Opin Genet Dev.* 2012;22(2):72-8.
34. Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 2009; 58 (12): 2718-25.
35. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol cell* 2013;49 (2):329-67.
36. Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One* 2009 ; 4(8):e6767.
37. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, et al. Epigenetic predictor of age. *PLoS One.* 2011;6(6):e14821.
38. Bell JT, Tsai PC, Yang TP, Pidsley R, Nisbet J, Glass D, et al. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet* 2012;8(4):e1002629.
39. Richardson BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr* 2002; 132(8): 2401-5.
40. Kotsopoulos J, Sohn KJ, Kim YI. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver. *J Nutr* 2008;138(4):703-9.
41. Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol* 2010;4(3):242-54.
42. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):484-92
43. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-96.
44. Tadokoro Y, Ema H, Okano M, Li E, Nakauchi H. De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2007;204:715-22.

45. Prokhortchouk E, Defossez PA. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(11): 2167-73.
46. Shen X, He Z, Li H, Yao C, Zhang Y, He L, et al. Distinct functional patterns of gene promoter hypomethylation and hypermethylation in cancer genomes. *PLoS One* 2012;7(9):e44822.
47. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009; 1(2):239–59.
48. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?. *Genes Cancer* 2011; 2(6): 607–17.
49. Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, et al. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet* 2011; 20 (14): 2710-21.
50. Karpf AR. Epigenetic alterations in oncogenesis, advances in experimental medicine and biology. New York: Springer Science; 2013.
51. Itano O, Ueda M, Kikuchi K, Hashimoto O, Hayatsu S, Kawaguchi M, et al. Correlation of postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma with demethylation of repetitive sequences. *Oncogene* 2002; 21(5):789–97.
52. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22 (1):50–5.
53. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem* 2011; 286(21):18347–53.
54. Kuo KC, McCune RA, Gehrke CW, Midgett R, Ehrlich M. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8 (20): 4763-76.
55. Smith E, Bianco-Miotto T, Drew P, Watson D. Method for optimizing methylation-specific PCR. *Biotechniques* 2003;35 (1):32-3.
56. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc* 2006; 1 (5): 2353-64.
57. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22 (15): 2990-7.
58. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (18): 9821-6.
59. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28 (8):32.

- 60 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827-31.
61. García-Giménez JL, Sanchis-Gomar F, Lippi G, Mena S, Ivars D, Gomez-Cabrera MC, et al. Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics, *Clin Chim Acta* (2012), 413:1576-82.
62. Singer-Sam J, LeBon JM, Tanguay RL, Riggs AD. A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1990; 18 (3): 687.
63. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25 (12): 2532-4.
64. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; 24 (2) : 132-8.
65. Huang TH, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 1999; 8 (3): 459-70.
66. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005; 37 (8): 853-62.
67. Wilson IM, Davies JJ, Weber M, Brown CJ, Alvarez CE, MacAulay C, et al. Epigenomics: mapping the methylome. *Cell Cycle* 2006; 5 (2): 155-8.
- 68 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood born hepatitis genome science 1989; 244: 359-62.
- 69 Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004;39:5-19.
- 70 Zampino R , Marrone A, Restivo L, Guerrera B, Sellitto A, Rinaldi L, et al. Chronic HCV infection and inflammation: Clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations . *World J Hepatol*. 2013; 5(10): 528-40.
- 71 Sy T , Jamal M. Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci*. 2006; 3: 41.
- 72 Smuts HE, Kannemeyer J. Genotyping of hepatitis C virus infection in South Africa. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:1679–81.
- 73 Huy TT, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. *Pediatrics International* 2004; 46: 223–30.

- 74 Fawzi MH, Fawzi MM (Jr.), Said NS. Prevalence of hepatitis C virus infection among Egyptian patients with schizophrenia. *Current Psychiatry, Egypt* 2009; 16:7-17.
- 75 Abbas Z, Moatter T. Interleukin (IL) 1b and IL-10 gene polymorphism in chronic hepatitis C patients with normal or elevated Alanine Aminotransferase levels. *JPMA* 2003; 53:59-62.
- 76 Swiątek BJ. Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection? *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2012; 23:47-59.
- 77 Knapp S, Hennig BJW, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 2003; 55:362-9.
- 78 Feng Q, Hassan S, Das T, Huang J, Feng Z , Gretch D. Epigenetic mechanisms in hepatitis C virus- associated hepatocellular carcinoma: a potential new link between stem cells, virology and cancer. *AMJ* 2013; 4(1): 21- 35.
79. Tischoff I, Tannapfel A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(11): 1741-8.
- 80 Anwar WA, Khaled HM, Amra HA, El-Nezami H, Loffredo CA. Changing pattern of hepatocellular carcinoma (HCC) and its risk factors in Egypt: possibilities for prevention. *Mutat Res.* 2008;659:176-84.
- 81 Blum H , Moradpour D. Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002;17:S413–S420.
- 82 But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;14:1652-6.
- 83 Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer, *Cell* 2000;100:57-70.
84. Komatsu Y, Waku T, wasaki NI, Ono W, Yamaguchi C, Yanagisawa J. Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis. *BMC Medical Genomics* 2012; 5: 5.
85. Yu J, Ni M, Xu J, Zhang H, Gao B, Gu J, et al. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC Cancer* 2002; 2: 29.
86. Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, von Kampen O, et al. Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2012; 130 (6): 1319-28.
87. Deng YB, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, et al. Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101 (6): 1501-10.

88. Wong CM, Ng YL, Lee JM, Wong CC, Cheung OF, Chan CY, et al. Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 As a Frequently Silenced Tumor Suppressor Gene in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2007; 45 (5):1129-38.
89. Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003;163 (4): 1371-78.
90. Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003;163 (3):1101-7.
91. Kawaguchi T, Qin L, Shimomura T, Kondo J, Matsumoto K, Denda K, et al. Purification and cloning of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* 1997; 272 (44):27558-64.
92. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 2004; 36 (1):40-5.
93. Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T. A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium dependent transforming growth factor-beta1 signaling cascade. *J Biol Chem* 2003; 278 (10):7790-9.
94. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*2003; 4: 915-25.
95. Muller M, Morotti A, Ponzetto C. Activation of NF- $\kappa$ B is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1060-72.
96. Fukai K, Yokosuka O, Chiba T, Hirasawa Y, Tada M, Imazeki F, et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor 2/placental bikunin (HAI-2/PB) gene is frequently hypermethylated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63 (24): 8674-9.
97. Morris MR, Gentle D, Abdulrahman M, Maina EN, Gupta K, Banks RE, et al. Tumor Suppressor Activity and Epigenetic Inactivation of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type 2/SPINT2 in Papillary and Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65 (11): 4598-606.
98. Dong W, Chen X, Xie J, Sun P, Wu Y. Epigenetic inactivation and tumor suppressor activity of HAI-2/SPINT2 in gastric cancer. *Int J Cancer* 2010;127: 1526-34.
99. Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra M R, Natali PG, Comoglio PM. The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer*1991; 49: 323-8.

100. Boix L , Rosa J L., Ventura F, Castells A, Bruix J, Rodes J, et al . c-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*1994, 19:88–91.
101. Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*1997; 25: 619–23.
102. Yamagamim H, Moriyama M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, SaitoT, Et al. Serum concentrations of human hepatocyte growth factor is a useful indicator for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas in C-viral chronic liver diseases. *Cancer* 2002, 95: 824–34.
103. Monvoisin A, Neaud V, De Ledinghen V, Dubuisson L, Balabaud C, Bioulac-Sage, et al. Direct evidence that hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells is mediated by urokinase. *J Hepatol* 1999; 30: 511–8.
104. Iizuka N, Oka M, Sakaida I, Moribe T, Miura T, Kimura N, et al. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. *Clin Chim Acta* 2011; 412 : 152-8.
105. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. Sleisenger & Fordtrans. *Gastrointestinal and liver disease*. 7th Ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2002, pp. 1263,1303-588.
106. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis Practical Haematology Text Book. 9th Ed. Harcourt publishers limited. London 2001, pp.30-41,353-4.
107. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th Ed. Elsevier Saunders Company. St Louis 2006, pp. 870-1 (glucose), 604-7(AST, ALT), 548 (albumin), 1195-8 (bilirubin total, direct), 613 (GGT), 768 (AFP).
108. Wiber C. Development and use of laboratory tests for hepatitis C infection. *J Clin Immunoassay* 1993; 16: 204-7.
109. Walters G, Kuijperst P, Kaccaki J, Schuurs L. Enzymes linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1997;6:1365-71.
110. Stevens J, Heid CA, Livak KJ and Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6:986-94.
111. Kirkpatrick LA, Feeney BC. *A simple guide to IBM SPSS statistics for version 20.0*. Student ed. Belmont, Calif.: Wadsworth, Cengage Learning 2013, pp 115.
112. Kotz S, Balakrishnan N, Read CB, Vidakovic B. *Encyclopedia of statistical sciences*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2006.
113. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107–16.

114. Zhang YJ, Wu HC, Shen J, Ahsan H, Tsai WY, et al. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2378–2384
115. Jones PA, Baylin, SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128 (4):683-92.
116. Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1998; 26 (21):5009-10.
117. Grebely J, Dore GJ. What is killing people with hepatitis C virus infection? *Semin Liver Dis* 2011;31(4):331-9.
118. Kroeger H, Jelinek J, Estécio MR, He R, Kondo K, Chung W, et al. Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood* 2008; 112 (4):1366-73.
119. Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, et al. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2008; 22 (8):1529-38.
120. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; 318 (5853):1108-13.
121. Connolly R, Stearns V. Epigenetics as a therapeutic target in breast cancer. *J Mammary Gland Bio Neoplasia* 2012;17:191-204.
122. Shenker N, Flanagan JM. Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. *Br J Cancer* 2012;106 (2):248–53.
123. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5 (1): 37-50.
124. Issa JP. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (6): 1634-7.
125. Chiba T, Yokosuka O, Fukai K, Hirasawa Y, Tada M, Mikata R, et al. Identification and investigation of methylated genes in hepatoma. *Eur J Cancer* 2005;41(8):1185-94.
126. Kwon GY, Yoo BC, Koh KC, Cho JW, Park WS, Park CK. Promoter methylation of E-cadherin in hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *J Korean Med Sci.* 2005;20(2):242-7.
127. Fukai K, Yokosuka O, Imazeki F, Tada M, Mikata R, Miyazaki M, et al. Methylation status of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005;25(6):1209-16.
128. Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, Lai HC, Liu KY, Chu TY, et al. Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2006;107(3):579-90.

- 129 Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003;163(4):1371-8.
- 130 Archer KJ, Mas VR, Maluf DG, Fisher RA. High-throughput assessment of CpG site methylation for distinguishing between HCV-cirrhosis and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Mol Genet Genomics*. 2010 ;283(4):341-9.
131. Sua H, Zhaoa J, Xiong Y, Xua T,Zhoua F, Yuan Y, et al. Large-scale analysis of the genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma from Southeast China. *Mutation Research* 2008;641:27–35.
132. Kwok-Kwan Tung E, Wong C, Yau T, Lee JM, Ching Y , Ng IO. HAI-2 is epigenetically downregulated in human hepatocellular carcinoma, and its Kunitz domain type 1 is critical for anti-invasive functions. *Int J Cancer* 2009; 124:1811–9.
133. Moribe T, Iizuka N, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, et al. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009;125:388–97.

## المخلص العربي

الإصابة بفيروس التهاب الكبد الوبائي (سي) هي احد الاسباب الرئيسية المسببة لسرطان الكبد . على الرغم من أن فيروس التهاب الكبد الوبائي (سي) هو RNA وليس له وسيط من الاحماض النووية DNA، تظهر الدراسات الحديثة أن البروتينات الفيروسيّة الخاصة بفيروس التهاب الكبد الوبائي (سي) يمكن أن تشارك بنشاط في تنظيم الخلايا الجذعية السرطانية الكبدية بواسطة التخلق الجيني . التعرف على التعديلات التخلقية الجينية الناجمة عن فيروس التهاب الكبد الوبائي(سي) قد تكشف عن دلالات محتملة للكشف المبكر على الاورام الكبدية ، و ايضا قد تساعد في اكتشاف ادوية جديدة للاورام الكبدية المرتبطة بفيروس (سي).

علم التخلق يشير إلى معلومات عالية المستوى تكمن فوق الشفرة الوراثية. علامات التخلق المتوالي يمكن تصنيفها في أربع فئات رئيسية هي: اضافة مجموعة الميثيل للحمض النووي ، تعديلات الهيستون، تعديلات الكروماتين و الحمض النووي الريبي بدون شفرة.

ويتسبب السرطان عن طريق فشل الضوابط والتوازنات التي تتحكم في أعداد الخلايا استجابة لاحتياجات الانسان. يمكن أن يكون سبب اختلال وظائف الجينات التي تزيد أو تثبط نمو الخلايا ، أخطاء في الشفرة الوراثية نفسها أو عن طريق اليات تخلق خاطئة تحدد الجين العامل من الجين الغير عامل.

أنماط اضافة مجموعة الميثيل للحمض النووي تخضع لتغيرات معقدة في السرطان. كم مجموعة الميثيل في قاعدة السيتوزين يكون عادة منخفض مما يؤدي إلى انخفاض شامل في مجموعات ميثيل الحمض النووي. إلى جانب الانخفاض الشامل، تظهر معظم سرطانات أيضا زيادة في مجموعات ميثيل لاجزاء معينة من محفز الجين تسمى جزر CpG. يترتب علي هذا توقف الجينات عن العمل بصورة دائمة.

المثيلة تؤثر على مرضى السرطان بدرجات متفاوتة. في حين أن بعض المرضى الذين لديهم تغيرات بسيطة، بينما يظهر الآخريين زيادة في مجموعات ميثيل في جينات متعددة. و يعتقد ان التغيرات في مجموعات ميثيل الحمض النووي في السرطان تحدث بصورة اكبر من الطفرات الوراثية. كما ان التعديلات في التخلق من السهل عكسها اكثر من الطفرات الوراثية. إذا تم اكتشاف دلالات تخلقية محددة لمرض معين سوف يكون من الممكن استخدام هذه الدلالات في عينات الدم لتحديد التوقعات التخلقية . تحليل مثيلة الحمض النووي في البلازما قد يسمح بتحديد أنماط المثيلة المغايرة قبل ظهور أعراض الامراض .

كثير من الدراسات اثبتت الكفاءة الاكلينيكية لقياس كم مجموعة الميثيل في محفزات الجينات في انواع مختلفة من العينات و انها قد تساعد في تشخيص سرطان الكبد، و بما ان التغيير في مجموعة الميثيل يحدث في اماكن محددة في محفزات الجينات و ذلك يساعد ان تكون هذه التعديلات التخلقية دلالات غير خطيرة و من السهل الحصول عليها من عينات الدم و السوائل الحيوية مما يجعل تعديلات التخلق دلالات مثالية

جين أنزيم المثبط للسيرين بيبتيدياز من النوع كونتر الثاني يشفر بروتين الغشاء و يتكون من وحدتان Kunitz خارج الخلية التي تمنع مجموعة متنوعة من البروتياز سيرين. البروتين يمنع عامل النمو الكبدى (HGF) المنشط، الذي يمنع تشكيل عامل النمو الكبدى النشط. و يعتبر هذا الجين مثبط للاورام ، ويقع جين SPINT2 علي ذراع الكروموسوم الطويل ١٩ في منطقة ١٣.١ .

العمل الحالي يهدف إلى دراسة حالة الميثيل في محفز جين أنزيم المثبط للسيرين بيبتيدياز من النوع كونتر الثاني في المرضى المصريين المصابين بالتهاب الكبد المزمن – سي بدون سرطان كبد و آخريين مصابين بسرطان كبد. وفي هذا العمل تمت دراسة حالة الميثيل في محفز جين مثبط بروتياز السيرين في الدم باستخدام تقنية تفاعل البوليميريز التسلسلي الخاص بالمثيلة (MSP) .

وتمت هذه الدراسة علي ١٣٠ من البالغين المصريين، تم تقسيمهم إلى مجموعتين: المجموعة الأولى (٨٠ من المرضى المصابين بفيروس C) والمجموعة الثانية (٥٠ اصحاء) . و لقد تم تقسيم مجموعة المرضى إلى مجموعات فرعية: المجموعة الأولى أ (٥٠ مريض بفيروس C) و لكن غير مصابين بسرطان الكبد) والمجموعة الأولى ب (٣٠ مريض بفيروس C و مصابين بسرطان الكبد)

ولقد تمت المقارنة بين المجموعات الثلاثة في هذه الدراسة فيما يتعلق بوضع حالة الميثيل في محفز جين مثبط بروتياز السيرين و قسمت النتائج إلى 3 فئات: غير مثيلة و نصف مثيلة و مثيلة زائدة، وتبين أنه في مجموعة الاولى أ 60٪ من نصف مثيلة ، وكذلك في مجموعة الاولى ب 60٪. بينما في مجموعة الاصحاء الضابطة كانت النسبة 40٪ فقط. ولم تكن هناك حالات الزيادة في المثيلة في مجموعة الاصحاء الضابطة، في حين ان 4٪ في المجموعة الاولى أ و 6.7٪ في المجموعة الاولى ب يوجد لديهم مثيلة زائدة. وتبين أن هناك فروق ذات دلالة إحصائية داخل المجموعات فيما يتعلق بوضع مثيلة.

وفي الدراسة الحالية تم دمج الحالات ذات المثيلة الزائدة و النصف مثيلة في مجموعة واحدة (المثيلة المغايرة) ووجد أن هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين المجموعات المدروسة. وكانت مجموعة الاصحاء الضابطة أقل بكثير من المجموعة الاولى أ ( $p=0.01$ )، وأقل من المجموعة الاولى ب ( $p=0.021$ ) فيما يتعلق بوضع المثيلة، ولكن لم يكن هناك فرق ذو دلالة إحصائية بين المجموعتين الاولى أ و ب ( $p=0.052$ ).

وقد أفادت مجموعة متزايدة من البحوث بوجود ارتباط بين التقدم في السن و مدى المثيلة للحامض النووي. و على وجه الخصوص، وقد تم ربط مثيلة الحامض النووي مع العمر الزمني على فترات زمنية طويلة، ولقد تم ربط التغيرات في مثيلة بأمراض مرتبطة بالسن مثل السرطان، ولكن في الدراسة الحالية لم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية وجدت متعلقة بالعمر.

في هذه الدراسة وجدنا زيادة خطر وجود زيادة في حالة الميثيل في محفز جين مثبط بروتياز السيرين في مصابي فيروس التهاب الكبد المزمن-C بالمقارنة مع الأشخاص الطبيعيين، كما كانت نسبة الأرجحية 2.52 مع 95٪ فاصل الثقة (1.23-5.14)، ولاستبعاد تأثير السن فقد تم إحداث تعديل نسبة الأرجحية وكانت 2.4 مع 95٪ فاصل الثقة (1.13-5.26).

في هذه الدراسة تم التعرف بشكل هام على التغيرات الجينية التخلقية في كل من الالتهاب الكبدي سي و سرطان الكبد الناجم عنه، مما قد يساعد في فهم الميكانيكية التخلقية التي قد تسبب التقدم المرهلي للسرطان الكبدي

#### ويستخلص من هذه ما يلي :

- ١) حالات المثيلة المغايرة كانت احصائيا اكثر في حالات المرضى بفيروس C و مرضى السرطان الكبدي من الاصحاء.
- ٢) هناك زيادة خطر لحدوث مثيلة مغايرة في محفز جين spint2 في المرضى المصابة بفيروس C اكثر من الاصحاء.
- ٣) لم يكن هناك علاقة بين التقدم في السن ومستوى الفا فيتو بروتين AFP , و مستوى فيروس سي و درجة تشايلد Child و حالة المثيلة في الحالات التي تمت دراستها.
- ٤) ملاحظة زيادة حالات المثيلة الزائدة في مجموعة المرضى المصابين بسرطان الكبد عنه في مجموعة المرضى المصابين بالالتهاب الكبدي

#### التوصيات:

- دراسة عدد اكبر من الحالات.
- دراسة حالة المثيلة في معزاز جين spint2 في أنسجة الكبد والربط والنتائج مع تلك المستنتجة من عينات الدم .
- قياس المستوى الكمي للمثيلة باستخدام تقنية اخرى مثل تفاعل البوليميريز التسلسلي الكمي الخاص بالمثيلة.
- دراسة حالة مجموعات الميثيل في جينات اخرى في سرطان الكبد.
- تجارب سريرية لإثبات ودمج مسار تحويل عوامل التخلق الجيني.

دراسة حالة الميثيل في محفز جين أنزيم المثبط للسيرين بيبتيدياز من النوع كونتز الثاني  
فى المرضى المصريين المصابين بالتهاب الكبدى المزمن - سى

رسالة علمية

مقدمة إلى معهد البحوث الطبية- جامعة الإسكندرية  
ايفاء جزئيا لشروط الحصول على درجة

دكتوراه

فى

الباثولوجيا الكيميائية

مقدمة من

احمد مصطفى محمد عوض

بكالوريوس الطب و الجراحة، جامعة الإسكندرية، ٢٠٠٤  
ماجستير الباثولوجيا الكيميائية، معهد البحوث الطبية، جامعة الإسكندرية، ٢٠١٠

معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية  
٢٠١٤

دراسة حالة الميثيل في محفز جين أنزيم المثبط للسيرين بببتيداز من النوع كونتز الثانى  
فى المرضى المصريين المصابين بالالتهاب الكبدى المزمن – سى

مقدمة من

احمد مصطفى محمد عوض

بكالوريوس الطب و الجراحة، جامعة الإسكندرية، ٢٠٠٤  
ماجستير الباثولوجيا الكيميائية، معهد البحوث الطبية، جامعة الإسكندرية، ٢٠١٠

للحصول على درجة

دكتوراه

فى

الباثولوجيا الكيميائية

موافقون

لجنة المناقشة والحكم على الرسالة

.....

أ.د. وفاء سعد رجب  
أستاذ بقسم الباثولوجيا الكيميائية  
معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية

.....

أ.د. احمد احمد شعراوي  
أستاذ ورئيس قسم الباثولوجيا الاكلينيكية  
معهد الكبد القومي  
جامعة المنوفية

.....

أ.د. جيهان محمود حمدي ماجور  
أستاذ بقسم الباثولوجيا الكيميائية  
معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية

.....

د/ ميسر أحمد محمد زكي  
أستاذ مساعد بقسم الباثولوجيا الكيميائية  
معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية

## المشرفون

.....

**الدكتورة/ وفاء سعد رجب**  
أستاذ بقسم الباثولوجيا الكيميائية  
معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية

.....

**الدكتور/ ميسر أحمد محمد زكي**  
أستاذ مساعد بقسم الباثولوجيا الكيميائية  
معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية

.....

**الدكتورة/ رجاء عبد القادر رمضان**  
مدرس بقسم الباثولوجيا الكيميائية  
معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية

.....

**الدكتورة/ لمياء أحمد الغليظ**  
مدرس بقسم الأمراض الباطنية  
معهد البحوث الطبية  
جامعة الإسكندرية