بررسی بیان ژن BCL9 در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

بهروز طوفان[۱]، ناهید مسعودیان[۱]، شهلا محمدگنجی[۲*]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه واحددامغان، دانشگاه آزاداسلامی، دامغان، ایران.

۲. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وزیست فناوری، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۹)

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال (CRC) سومین سرطان شایع درمردان و دومین سرطان شایع در زنان دنیا و نیز دومین عامل مرگ ومیر ناشی از میان سرطان های دنیا می باشد. میزان شیوع آن درآسیا به سرعت روبه افزایش است طوری که سالانه۱,۲میلیون نفر به سرطان کولورکتال مبتلا و بیش از نیمی از این مبتلایان می میرند. در ایران نیز طی۳۰ سال اخیر میزان شیوع سرطان کولورکتال در مردان بیش از۵۰٪ و در زنان کمی کمتر ازآن می باشد و سن مبتلایان اکثراً بالای ۵۰ سال است. در این مطالعه بمنظور شناسایی ژن های دخیل در ایجاد CRC، به بررسی بیان ژنBCL9 در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال پرداخته شد.

مواد و روش: در این تحقیق از ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال با تکمیل رضایت نامه و پرسشنامه کتبی، نمونه بافت تازه تهیه شد. سپس mRNA آنها استخراج وسنتزcDNA انجام شد. سپس با پرایمرهای اختصاصی برای ژنهای BCL9و B-actin، آزمایش نیمه کمی RT-PCR انجام شد.

یافته های پژوهش: نتایج این مطالعه نشان داد در تمامی نمونه های توموری باند مربوط به ژن Bcl9 مشاهده می شود درحالی که در نمونه های نرمال یا باندی مشاهده نشد و یا اینکه باند بسیار بسیار ضعیفی قابل مشاهده بود. در این مطالعه، ۲۱ مرد(۵۲,۵٪) و ۱۹ زن(۴۷,۵٪) با میانگین سنی ۱۰±۵۶,۱ سال شرکت کردند و ۷۷,۵٪ ایشان (۳۱ نفر) بالاتر از ۵۰ سال سن داشتند. از نظر فاکتور T، ۹۶,۵٪ بیماران دارای T2 و T3 بودند (P=0.025) و از لحاظ فاکتور N، در ۴۸,۳٪ بیماران تهاجم به غدد لنفاوی مشاهده شد و ۲۲,۵٪ بیماران متاستاز را نشان دادند (P=0.013).

بحث: دراین مطالعه بیان ژنBCL9 در نمونه های توموری افزایش ۳,۵ برابری نسبت به نمونه های نرمال داشت. میتوان گفت ژنBCL9 می تواند، بعنوان یکی از ژن های دخیل درسرطان کولورکتال عمل کند که با برخی از ژنها مثل TCF،LEF،B-catenin،Pygo برهمکنش دارد.

کلیدواژگان

سرطان کولورکتال، BCL9، RT-PCR.

* نویسندهٔ مسئول، رایانامه: shahlamg@yahoo.com

مقدمه

مسیر پیام رسانی Wnt / B-Catenin به طور اختصاصی برنامه رونویسی را کنترل می کند که آن برای رشد و نمو بافت های مختلف در جانوران پر سلولی لازم و ضروری است. فعالیت نامناسب کمپلکس Wnt / B-Catenin موجب سرطان به خصوص سرطان کلورکتال می شود. بتا کاتنین مجری مرکزی این مسیر است که در اصل بوسیله پروتئوزم ها در صورتی که Wnt نباشد تخریب می شود. در سلول های اپی تلیال مشخص شده است که با وجود Wnt در سلول بتاکاتنین در هسته تجمع پیدا می کند. در غیاب Wnt محل اصلی و تخریب Wnt / B-Catenin توسط یوبی کوئین و شدن درسیتوپلاسم می باشد و به عنوان کمک فاکتور نسخه بردار TCF و LEf برای ژن های هدف Wnt نقش بازی می کند که شامل مدیفیکاسیون کروماتین و بازسازی فاکتورهاست (Parker D.S., 2002 & Shi X.,2006 & Li H., 2007).

دو عامل ژنتیکی دیگری به نام های Pygopus=pygo و Legless=Leg=BCL9 نیز در طی رشد و نمو طبیعی برای فعالیت نسخه برداری بتاکاتنین کمک می‌کنند. که یک طناب انگشتی روی در C ترمینال خود به نام PHD1 دارد و به کمک آن مستقیماً به دومین کوتاه BCL9 یا همان HD1 آن می چسبند که دومین همولوژی کوتاه نیز نامیده می‌شود. BCL9 با دومین HD2 خود به بتاکاتنین اتصال پیدا می کند و به عنوان یک آداپتور عمل می کند. حالpygo وBCL9به عنوان کمک فعال کننده رونویسی در هسته کمک می‌کنند (Cantù C., 2014).

به محض انتقال پیام Wnt، بتاکاتنین وارد هسته شده و در آنها تجمع پیدا می کند.Pygo با ژن های هدف Wnt به ترتیب با BCL9 و بتاکاتنین و TCF و LEF که به عنوان یک زنجیره آراپتور کمک کننده رونویسی شناخته شده اند اتصال برقرار می کند. البته در غیاب بتاکاتنین باز هم Pygo با اجزایی Wnt مثل BCL9 همکاری می کند. لازم به ذکر است که Pygo در دومین PHD1 خود به دم هیستون شماره سوم که در لایزین شماره چهارمش دی متیله شده است و در روی کروماتین ژن های هدفWnt، متصل شده است و این Pygo از طریق دومین PHD1خودش به طور اختصاصی و به صورت سطحی به دومین HD1، BCL9نیز اتصال پیدا می کند (Wysocka J., 2006 & Aasland R., 1995).

در مهره داران دو پارالوگ از Pygo و دوپارالوگ از BCL9 وجود دارد. به هر حال از BCL9 و Pygo در سرطان های مختلف انسانی بیان بالایی گزارش شده است. در نسخه برداری وابسته به بتاکاتنین در افزایش فعالیت Wnt در سلول های سرطانی کولورکتال افزایش Pygo و BCL9 گزارش شده است که BCL9 به عنوان پشبرنده سرطان شناخته شده است. به خصوص برای متیله کردن لایزین شماره ۴ آن اهمیت بیشتری دارد. زوائد انگشتی Pygo که متیلاسیون هیستون شماره ۳ را تنظیم می کند بوسیله دومینHD1، BCL9 انسانی برای متیله کردن لایزین شماره ۴ هیستون شماره۳ یک افنیتی بالایی پیدا می کنند یعنی متیله کردن لایزین شماره۴ هیستون سه در روی کروماتین های ژن های هدف Wnt توسط HD1، BCL9 انسانی برای متیله کردن لایزین شماره ۴ هیستون شماره ۳ یک افنیتی بالایی پیدا می‌کنند یعنی متیله کردن لایزین شماره ۴ هیستون سه در روی کروماتین های ژن های هدف Wnt توسط HD1 و BCL9 زوائد انگشتی Pygo القاءوتسهیل می شود. که برای اینکار BCL9 لازم و ضروری است. در ساختار بلوری و کریستاله شده کمپلکس PHD1 -HD1 در مولکول های Pygo و BCL9 که تری متیله شده است (Bienz M., 2006).

هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن BCL9 در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال می باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه بافت تازه از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مراجعه کننده به بخش جراحی بیمارستان امام خمینی. بدین منظور پس از اطلاعات کامل در مورد دموگرافی و روند بیماری از پرونده های پاتولوژی بیماران مبتلا به کولورکتال، اقدام به اخذ نمونه بافتی توموری و نرمال شد. نمونه ها در شرایط ازت مایع به فریزر ۷۰ – درجه سانتیگراد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل گردید. به منظور رعایت قوانین اخلاق زیستی، قبل از نمونه گیری تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضایت نامه ای را پر کردند. جهت این تحقیق، ۴۰ نمونه بافت توموری و نرمال(بافت سالم مجاور تومور) تازه از بیماران مبتلا به سرطان کورکتال جمع آوری شد. این نمونه ها مربوط به مراحل مختلف سرطان کولورکتال می باشد.

در ادامه اطلاعات حاصل از بیماران و نمونه ها مورد بررسی دقیق قرار گرفت و تعدادی از نمونه ها از ادامه مطالعه در این پروژه خارج شد. شرایط خارج ساختن نمونه از ادامه مطالعه عبارتست از: نامشخص بودن محل اولیه سرطان، ابتلای بیمار به سایر سرطانها علاوه بر سرطان بافت کولورکتال، تشخیص انواع دیگر سرطان کولورکتال برای بیمار پس از تشخیص پاتولوژی در این پروژه بررسی شود)، ناقص و یا نادرست بودن اطلاعات مربوط به تاریخچه و کلینیکو پاتولوژی بیماران، و وجود نسبت فامیلی در بیماران داوطلب در این پروژه.

استخراج RNA از بافتها بکمک کیت استخراج RNA شرکت Intron. بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده با روشهای نانودراپ و الکتروفورز آگارز.

سنتز cDNA از RNA های استخراج شده بکمک کیت Revert AID First Strand cDNA synthesis شرکت Ferments و مطابق پروتکل کیت.

انجام RT-PCR

در این روش با پرایمرهای ژن بتااکتین بعنوان یک ژن کنترل داخلی (House-keeping gene) و ژن Bcl9 برای تمامی cDNA سنتز شده از بافت های نرمال و توموری، آزمایش RT-PCR انجام شد. و محصول PCR ها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. توالی پرایمرهای اختصاصی به شرح زیر است:

Bcl9 Forward: 5'-CCATCAGGAAACACACAGAGTAG-3'

Reverse: 5'-AGGGAGTGCTTTAGGGGTATG-3'

b-actin Forward: 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'

Reverse: 5'-AGACGCAGGATGGCATGGG-3'

یافته های پژوهش

تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از پرونده بیماران نشان داد که:

از ۴۰ بیمار شرکت کننده در این مطالعه، ۲۱ مرد(۵۲,۵٪) و ۱۹ زن(۴۷,۵٪) با نژادهای فارس، آذری، کرد و گیلکی بودند که ۸۰٪ ایشان سیگاری بود. میانگین سن بیماران مورد مطالعه ۱۰±۵۶,۱ سال بود درحالیکه ۷۷,۵٪ ایشان (۳۱ نفر) بالاتر از ۵۰ سال و ۲۲,۵٪ آنها (۹ نفر از ۴۰ بیمار) زیر ۵۰ سال سن داشتند. کمترین سن بیماران ۳۲ سال و بیشترین ۷۶ سال بود. از نظر فاکتور های ریسک بالینی همانطور که در جدول یک آمده است، ۴۶,۷٪ بیماران دارای تومورهای با اندازه بیشتر ار ۵,۵ سانتیمتر بودند درحالی که حداقل اندازه تومور ۲ و حداکثر ۱۲,۵ سانتیمتر مشاهده شد. از نظر grade تومورها، ۳۵٪ بیماران دارای stage1 و ۴۰٪ آنها دارای

stage های ۲ و ۳ بودند. از نظر فاکتور T نیز ۹۶,۵٪ بیماران دارای T2 و T3 بودند (P=0.025). از لحاظ فاکتور N، در ۴۸,۳٪ بیماران تهاجم به غدد لنفاوی مشاهده شد و ۲۲,۵٪ بیماران متاستاز را نشان دادند (P=0.013).

جدول ۱- اطلاعات بیماران و فراوانی فاکتور های ریسک بالینی بیماران شرکت کننده در این مطالعه

Clinical Risk factors	(N=40)(%)
Tumor size (Cm)	
<5.5	16(53.3%)
>5.5	14(46.7%)
Grade Differentiation	
Normal	10(25%)
Stage I	14(35%)
Stage II	9(22.5%)
Stage III	7(17.5%)
Depth of tumor invasion	
T0	1(3.4%)
T1	0
T2	7(24.1%)
T3	21(72.4%)
T4	0
Lymph node invasion(N)	
N0	14(45.1%)
N1	11(35.4%)
N2	4(12.9%)
Metastasis	
M0	19(61.2%)
M1	7(22.5%)

نتایج آزمایش های مولکولی

نتایج آزمایش های مولکولی بشرح زیر است:

ارزیابی کمی و کیفی RNA استخراج شده

در ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز ژل آگارز، مشاهده‌ی طیف RNA و سه باند مربوط به ۵/۸rRNAs و ۱۸rRNAs و ۲۸rRNAs یکپارچگی یاIntegrity آنها را تأیید کرد.

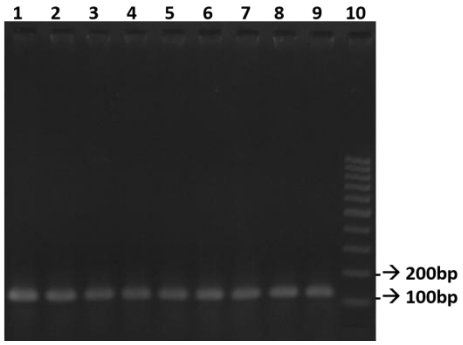
ارزیابی کمیت RNAاستخراج شده با نانودراپ نشان داد که در نسبت جذب A260/A280، عدد بدست آمده برای کل نمونه‌ها بین ۱/۸ تا ۲ بود، که معیار مناسبی برای عدم وجود آلودگی پروتئین، کلروفرم و همچنین عدم تجزیه و تخریب مولکول‌های RNA می باشد.

ارزیابی سنتز cDNA

برای ارزیابی صحت سنتز cDNA از پرایمر ژن بتااکتین استفاده شد زیرا به عنوان یک ژن housekeeping بوده و درتمام نمونه‌ها بیان می‌شود. همچنین پرایمر طراحی شده برای ژن بتااکتین مخصوص cDNA بوده یعنی جایگاهی برای اتصال در DNA ندارد که می‌تواند صحت سنتز cDNA را به خوبی نشان دهد.

همچنین cDNA های سنتز شده مربوط به تمامی نمونه های بافتی توموری و نرمال توسط پرایمر اختصاصی برای ژن bcl9 تکثیر شد و نتایج نشان داد که نمونه های توموری دارای باند می باشند. بعبارت دیگر در تمامی نمونه های توموری باند مربوط به این ژن مشاهده می شود درحالی که در نمونه های نرمال یا باندی مشاهده نشد و یا اینکه باند بسیار بسیار ضعیفی قابل مشاهده است.

نتایج بررسی کمی ژن Bcl9 نشان داد در دو حالت نرمال وتوموری در مقایسه با ژن رفرنس (بتااکتین) حاکی از افزایش بیان ۳,۵ برابری در نمونه های توموری نسبت به نمونه های نرمال بود (P<0.025). همچنین اختلاف معناداری بین فاکتورهای افزایش بیان و stageهای نمونه های توموری مشاهده نشد.

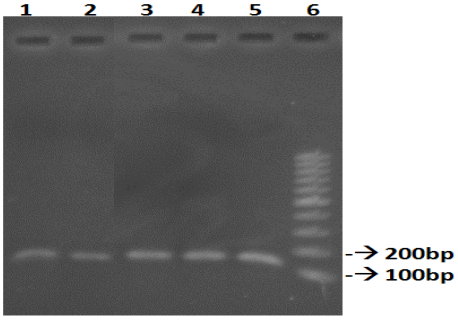


شکل ۱- الگوی حاصل از از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن بتااکتین بر روی ژل آگارز ۱٪.

چاهک ۱: کنترل مثبت (اندازه باند مورد نظر 161bp می باشد).

چاهک‌های ۲ تا ۹: نتیجه محصول PCR بر روی cDNA برخی از نمونه‌ها.

چاهک ۱۰: مارکر مولکولی 100bp شرکت Invitrogen



شکل ۲- الگوی حاصل از از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن BCL9بر روی ژل آگارز1٪.

چاهک ۱: کنترل مثبت (اندازه باند مورد نظر 180bp می باشد).

چاهک‌های ۲ تا۵: نتیجه محصول PCR بر روی cDNA برخی از نمونه‌ها.

چاهک ۶: مارکر مولکولی 100bpشرکت Invitrogen

بحث

تاکنون بررسی ژن BCL9 توسط تعدادی از محققین زیادی انجام شده است و نتایج خوبی نیز درخصوص افزایش بیان ژن Bcl9 در چند نوع سرطان ارائه شده است. در این پروژه تحقیقاتی که برای اولین بار بمنظور بررسی بیان ژن BCL9 در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کلورکتال انجام شده است، افزایش بیان معنا داری در نمونه های توموری نسبت به نمونه های نرمال مشاهده شد. اگرچه این بررسی با تعداد فقط ۴۰ نمونه بافتی انجام شد، نتایج حاصله از آن با نتایج تحقیق های مشابه بر روی بافت های سرطانی با جامعه آماری بزرگتر همراستا بود و می توان گفت به نوعی مطالعه پایلوت بوده است. از طرف دیگر با توجه به اینکه BCL9 حلقه اتصال بتا کاتنین و Pygo می باشد، می توان پیشنهاد داد که این دو نیز در راستای القاء و تقویت رونویسی از ژن های هدف Wnt توسط TCF و LEF می باشند.

به عنوان مثال در سال ۲۰۰۸ توسط Sustmann C. و همکاران نتایج مهمی در مورد بررسی ژن BCL9 بدست آمد. این نتایج عبارتست از اینکه: اولاً BCL9 برای نسخه برداری موثر TCF در مسیر Wnt بسیار مهم و ضروری است و این عمل BCL9 توسط اتصال به بتا کاتنین صورت می گیرد. دوم اینکه هم BCL9 و هم پارالوگ آن، که B9L می باشد، در سلول های سرطانی کولورکتال افزایش بیان دارند.

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۷ توسط Li H. و همکاران در سلول های سرطانی HEK293 و SW480 کورکتال انجام گرفت که اثر بخشی BCL9 به کمک فعال کننده، نسخه برداری بتاکاتنین در مسیر Wnt را نشان دادند. بررسی بیان تنظیم کننده های TCF و LEF از ژن های هدف Axin2 و C-myc نشان می دهد که افزایش بیان داشته اند.

در پژوهش دیگری، با ایجاد موتاسیون و جهش و با ایجاد Loss of Function برای دومین هایHD1 و HD2 ازBCL9 عملاً اتصال آن به بتاکاتنین و همچنین به Pygo ونقش آن را در بیان ژن های هدف مسیر Wnt بررسی کرداند که همه اینها به روشهای مختلفی از قبیل Transfection و RT-PCR, و Immunoblotting وNMR اثبات شده است. در اثر اختلال در اتصالBCL9 به Pygo و بتاکاتنین کاهش بیان ژن های هدفWnt مثل Axin2 و C-myc را نشان داده اند(Pascual J., 2000 & Moore AE, 2015, Li J, 2013).

افزایش اتصالBCL9 به بتاکاتنین موجب افزایش بیان Cyclin D1-C-myc- CD44 در کارسینومای کولون می شود. حدس زده می شود به این علت است که در روی کروموزوم یک (1q21)، ژن های RAB25 و CKS1B و PDZK1 و MUC1 قرارگرفته اند که خود این ژنها نیز در سرطان کولورکتال افزایش بیان دارند. BCL9 در بافت های نرمال افزایش ناچیزی و بیان کمی را نشان می دهد ولی در کارسینومای کولون حدوداً ۶۵٪ افزایش بیان دارد. همچنین در تکثیر سلول های سرطانی، در مراحل متاستاز، رگزایی و مهاجرت نیز افزایش بیان نشان می دهد. این موضوع با تکنیک‌های Q.RT-PCR، Immunoblotting

و ایمونوفلورسانس بر روی سلولهای سرطانی کولون اثبات شده است. BCL9 در مالتیپل میلومای اولیه توموری کولون ۶۰٪ افزایش بیان دارد و در سلولهای سل لاین های سرطانی کولون ۶۵٪ افزایش بیان دارد (Capili A.D., 2001).

برای بیان انکوژنهایی مانندC-myc،CD44، Cyclin D1 و VEGF9 درسرطان کولورکتال کمپلکس چهارتایی (LEF/TCF) و BCL9 و PygoB-catenin ضروری است که هر چهار تا در سرطان کولورکتال افزایش بیان را نشان می دهند. این موضوع با آزمایش بر روی سلول های سرطانی COLO320 در آزمایشگاه به اثبات رسید و نیز مشخص شد که روش اتصال BCL9 به بتا کاتنین از طریق دومین HD2 خودش می باشد و با تخریب اتصال بتا کاتنین و BCL9 افزایش بیان انکوژنهای بالا متوقف می شود(Fiedler M., 2008).

در رشد و نمو طبیعی بافت های جنینی BCL9 از طریق دومین HD1 خودش به Pygo2 و از طریق دومین HD2 خودش به بتا کاتنین متصل شده تا اینکه در کمپلکس چهارتایی(TCF/ LEF) و BCL9 بتا کاتنین و Pygo قرار گیرد که موجب تقویت کوفاکتوری بتا کاتنین برای TCF/ LEF شده و باعث تقویت فعالیت نسخه برداری آن می شود. که این عمل در مسیر سیگنالین wnt ودر تومورهای مختلف از جمله کولورکتال انجام می شود.(Kramps T., 2002)

به کمک روش NMR Spectroscopy مشخص شده است که BCL9 در N ترمینال خودش با دومین HD1 به دومین PHD1، در C ترمینال مولکول Pygo اتصال پیدا می کند و درC ترمینال خودش با دومین HD2 به مولکول بتا کاتنین متصل می شود که اجزای این کمپلکس به کمک هم به کمپلکس TCF/ LEF نسخه بردار در مجاورت هیستون شماره ۳ که درلایزین چهارمش دی متیله شده است قرارمی گیرد و موجب تقویت نسخه برداری TCF / LEF از ژن های هدف مسیر Wnt مثل CD44وAxin2وC-myc که به عنوان آنکوژن هم هستند و در رشد طبیعی بافت های جنینی و همچنین در رشدو پیشرفت تومور دخیل هستند، می شود (de la Roche & Adachi S., 2004 Cantù C., 2014 & Brembeck F.H., & M., 2008 2004).

Beaulieu JF. در سال ۲۰۱۵ نشان داد که تاثیر پاسخ سلولی می تواند با BCL9 / 9L به عنوان یک کوفاکتور وابسته به بتاکاتنین مرتبط باشد. در واقع ایشان نظر Moore و همکاران در سال ۲۰۱۵ را اینگونه تایید کرد که مهار اینترکشن BCL9/9L و بتاکاتنین منجر به کاهش بیان ژن مرتبط با EMT و ترویج تمایز تومورهای سرطان کولورکتال خواهد شد .

از محدودیت های این مطالعه، موارد زیر قابل اشاره است: مشکلات هماهنگی با بیمارستان ها جهت نمونه گیری بافت تازه، کم سواد بودن یا بدحال بودن بیماران جهت پر کردن پرسشنامه که منجر به خروج نمونه ها از مطالعه گردید. بنابراین پیشنهاد می گردد مطالعات مشابه با تعداد نمونه بافتی بیشتر، و بر روی ژن های درگیر در مسیر Wnt انجام شود تا نتایج ارزشمند آن بتواند برای سیستم سلامت جامعه کاربردی باشد.

منابع و مآخذ

1. Adachi S., Jigami T., Yasui T., Nakano T., Ohwada S., Omori Y. Role of a BCL9-related β-catenin-binding protein, B9L, in tumorigenesis induced by aberrant activation of Wnt signaling.Cancer Res. 2004;64:8496–8501
2. Aasland R., Gibson T.J., Stewart A.F. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. Trends Biochem. Sci. 1995;20:56–59
3. Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. Trends Biochem. Sci.2006;31:35–40
4. Brembeck F.H., Schwarz-Romond T., Bakkers J., Wilhelm S., Hammerschmidt M., Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between β-catenin's adhesive and transcriptional functions. Genes Dev. 2004;18:2225–2230
5. Brack A.S., Murphy-Seiler F., Hanifi J., Deka J., Eyckerman S., Keller C. BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration. Dev. Biol. 2009;335:93–105
6. Beaulieu JF. Tuning WNT-β-catenin signaling via BCL9 proteins for targeting colorectal cancer cells. EBioMedicine. 2015; 2: 1846–47
7. Capili A.D., Schultz D.C., Rauscher I.F., Borden K.L. Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. EMBO J. 2001;20:165–177
8. Cantù C, Zimmerli D, Hausmann G, Valenta T, Moor A, Aguet M, Basler K. Pax6-dependent, but β-catenin-independent, function of Bcl9 proteins in mouse lens development. Genes Dev. 2014 Sep 1;28(17):1879-84
9. De la Roche M., Worm J., Bienz M. The function of BCL9 in Wnt/β-catenin signaling and colorectal cancer cells. BMC Cancer. 2008;8:199
10. Fiedler M., Sanchez-Barrena M.J., Nekrasov M., Mieszczanek J., Rybin V., Muller J. Decoding of methylated histone H3 tail by the Pygo–BCL9 Wnt signaling complex. Mol. Cell.2008;30:507–518
11. Klaus A., Birchmeier W. Wnt signaling and its impact on development and cancer. Nat. Rev. Cancer. 2008;8:387–398
12. Kramps T., Peter O., Brunner E., Nellen D., Froesch B., Chatterjee S. Wnt/wingless signaling requires BCL9/Legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear β-catenin–TCF complex. Cell. 2002;109:47–60
13. Li H., Fischle W., Wang W., Duncan E.M., Liang L., Murakami-Ishibe S. Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD finger. Mol. Cell. 2007;28:677–691
14. Li J, Chen X, Ding X, Cheng Y, Zhao B, at al. LATS2 Suppresses Oncogenic Wnt Signaling by Disrupting β-Catenin/BCL9 Interaction. Cell Reports 5, December 2013: 1650–1663
15. Moor AE, Anderle P, Cantù C, Rodriguez P, Wiedemann N, et al. BCL9/9L-β-catenin Signaling is Associated With Poor Outcome in Colorectal Cancer. EBioMedicine. 2015;2: 1932–43
16. Parker D.S., Jemison J., Cadigan K.M. Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in Drosophila. Development. 2002;129:2565–2576
17. Pascual J., Martinez-Yamout M., Dyson H.J., Wright P.E. Structure of the PHD zinc finger from human Williams–Beuren syndrome transcription factor. J. Mol. Biol. 2000;304:723–729
18. Shi X., Hong T., Walter K.L., Ewalt M., Michishita E., Hung T. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. Nature. 2006;442:96–99

19. Sustmann C., Flach H., Ebert H., Eastman Q., Grosschedl R. Cell-type-specific function of BCL9 involves a transcriptional activation domain that synergizes with β-catenin. Mol. Cell. Biol. 2008;28:3526–3537

20. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects.Nat Rev Microbiol.2012; 10(8):575-82

21. Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne T.A., Kwon S.Y., Landry J. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. Nature. 2006;442:86–90

22. http://www.cancerindex.org/geneweb/BCL9.htm.