Badanie inaktywacji genu OPCML w materiale pochodzącym z raka jajnika

Study of the OPCML inactivation in epithelial ovarian cancer

Zbigniew Bystydzieński[1], Monika Gos[1], Krzysztof Gawrychowski[2], Mariusz Bidziński[3]

[1]Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie;
kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Przemysław Janik
[2]Oddział Ginekologii Onkologicznej, Klinika Onkologiczna, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
[3]Klinika Nowotworów Narządów Płciowych Kobiecych, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie;
kierownik Kliniki: dr hab. med. Mariusz Bidziński

Przegląd Menopauzalny 2006; 6: 347–351

Streszczenie

Cel pracy: Sugeruje się, że białko OPCML (*opioid binding protein/cell adhesion molecule-like*) pełni funkcję supresora nowotworowego, jednakże brak jak do tej pory dokładnych danych opisujących to zjawisko. Jak stwierdzono, obniżenie ekspresji genu *OPCML* sprzyjające procesowi powstawania nowotworów jajnika może wynikać z utraty heterozygotyczności, epigenetycznego *wyłączenia* genu poprzez metylację w obrębie wysp CpG lub specyficznych mutacji. Celem pracy było poszukiwanie zależności pomiędzy metylacją wysp CpG lub obecnością mutacji w genie *OPCML* a występowaniem raka jajnika.

Materiał i metody: Materiał do badań pochodził od 75 pacjentek z histologicznie potwierdzonym rakiem *adenocarcinoma serosum ovarii*. Od 20 z nich pobrano materiał w postaci płynu wysiękowego podczas zabiegu odbarczającego. Jako kontroli użyto materiału uzyskanego od 39 kobiet ze stwierdzonymi łagodnymi zmianami w jajniku, którym z przyczyn osłonowych usunięto przydatki.

Z preparatów izolowano genomowe DNA przy użyciu zestawu Genomic Mini lub Sherlock AX. W celu określenia metylacji OPCML DNA poddawano chemicznej modyfikacji, a następnie przeprowadzono PCR specyficzny dla sekwencji metylowanej i niemetylowanej. Do poszukiwania mutacji w genie OPCML zastosowano technikę SSCP, a wytypowane próbki poddano sekwencjonowaniu.

Wyniki: W grupie kontrolnej gen *OPCML* był metylowany u 8 z 39 badanych kobiet (12%). W grupie chorych ze zdiagnozowanym nowotworem, od których śródoperacyjnie pobrano materiał, metylację *OPCML* wykryto u 26 kobiet z 55 badanych, co stanowi 48% (p=0,0095). U chorych, od których pobrano DNA z komórek jądrzastych z płynu wysiękowego, metylację *OPCML* stwierdzono w 100% przypadków (p<0,00001). W całej grupie chorych na raka jajnika u 46 z 75 badanych wykryto metylację *OPCML*, co stanowi 61% (p=0,00001). W badanym materiale z raka jajnika nie stwierdzono obecności mutacji w genie *OPCML*. Z powyższych badań można wnioskować, że epigenetyczna inaktywacja genu *OPCML* może pełnić istotną rolę w procesie rozwoju raka jajnika.

Słowa kluczowe: *OPCML*, metylacja, gen supresorowy nowotworu, rak jajnika

Summary

Aim of the study: OPCML (*opioid binding protein/cell adhesion molecule-like*) has a tumor suppressor function in epithelial ovarian cancer (EOC), although the mechanism of its activity is not precisely known. It was suggested that lower *OPCML* expression may be caused by loss of heterozygosity, epigenetic silencing or the somatic missense mutations. We intended to show dependence between methylation status of "CpG islands" OPCML and EOC. The location of mutations in *OPCML* exons was also an aim of this study.

Material and methods: Material was collected from 75 *adenocarcinoma serosum ovarii* individuals with EOC diagnosed in Centre of Oncology, MSCM Institute. From 20 of them DNA was isolated from peritoneal fluid during decompression reduction of tension. The control group contained 39 cases of *cystadenoma ovarii* from individuals after mastectomy. We used the Genomic Mini or Sherlock AX kits to DNA extraction. DNA was

Adres do korespondencji:
mgr **Zbigniew Bystydzieński**, Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa, tel. +48 22 546 27 79, e-mail: zbyszek@coi.waw.pl

chemically modificated by sodium bisulfite and was used in MS-PCR reaction. Mutation analysis was made by SSCP analysis and the characteristic samples were sequenced.

Results: In all of EOC diagnosed cases methylation was detected in 46 from 75 cases which represents 61% (p<0,00001) but in control group only 8 of 39 cases (21%) showed methylation in OPCML. Methylation of *OPCML* "CpG islands" was detected in 26 out of 55 cases which represents 48% (p=0.0095) of archival material with diagnosed EOC (frozen and paraffined). Methylation was detected in 100% (p<0.00001) of cases in group with DNA isolated from peritoneal fluid. The mutation in *OPCML* exons was not found. Conclusions: Epigenetic inactivation of *OPCML* can lead in ovarian tumorgenesis.

Key words: *OPCML*, methylation, tumor suppressor gen, ovarian cancer

Wstęp

Jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet jest rak jajnika. Współczynnik umieralności z powodu tego nowotworu wykazuje stałą tendencję wzrostową. W pierwszych 44 latach życia ryzyko zachorowania na raka jajnika jest niskie i kształtuje się na poziomie 0,1–2 na 100 tys. kobiet w ciągu roku, zaś umieralność z jego powodu jest niska. W grupie kobiet w wieku 45–64 lat częstość występowania nowotworu jest wyższa, wzrasta także umieralność i wynosi 20,6 na 100 tys. kobiet na rok. Najwyższy współczynnik umieralności obserwuje się u kobiet w wieku powyżej 65 lat i wynosi 29,7 na 100 tys. kobiet [1, 2]. Uważa się, że część przypadków raka jajnika, zwłaszcza występujących rodzinnie w połączeniu z rakiem piersi, jest uwarunkowana genetycznie [3, 4].

Ostatnio wiele uwagi poświęca się czynnikom epigenetycznym mogącym wpływać na ekspresję genów, lecz niezwiązanych ze zmianami w sekwencji nukleotydów. Jednym z czynników epigenetycznych jest metylacja DNA, polegająca na enzymatycznym przyłączaniu reszt metylowych ($-CH_3$) do wielokrotnych powtórzeń sekwencji CG w DNA, tzw. wysp CpG [5–7].

Procesy metylacji DNA są zjawiskiem fizjologicznym i rozpoczynają się, po zapłodnieniu komórki jajowej, od całkowitego zniesienia metylacji we wczesnych podziałach komórkowych [8]. Tkankowo specyficzne wzory metylacji stanowią element kontroli ekspresji genów w czasie rozwoju i życia organizmu. Silnie metylowane – nieaktywne obszary DNA ulegają późniejszej replikacji niż regiony aktywnej rozluźnionej chromatyny [8, 9].

Badania utraty heterozygotyczności przeprowadzone u chorych na raka jajnika wykazały, że w *locus* 11q25 może znajdować się gen supresora nowotworowego [10, 11]. W tym rejonie zidentyfikowano gen OPCML (*opioid binding protein/cell adhesion molecule-like*). Sugeruje się, że utrata heterozygotyczności w *locus* 11q25 może powodować obniżenie ekspresji *OPCML* i w konsekwencji prowadzić do rozwoju choroby nowotworowej [11]. Inną przyczyną zahamowania ekspresji *OPCML* może być metylacja wysp CpG znajdujących się w obszarze promotorowym tego genu. Utrata funkcji białka *OPCML* może być również spowodowana mutacją w pozycji 334 w 2 egzonie, w wyniku której następuje zamiana aminokwasów w sekwencji białka (P95R) [11].

Gen *OPCML* składa się z 7 egzonów, a jego całkowita długość wynosi 600 tys. par zasad. Gen ten koduje receptor dla alkaloidów i jest selektywny dla μ ligandów. Białko jest zakotwiczone w zewnętrznej błonie lipidowej komórek nabłonka. W jego budowie można wyróżnić charakterystyczną domenę glikozylofosfatydyloinozytolową wiążącą ligand [12, 13]. Białko OPCML posiada strukturalną homologię z immunoglobulinami z grupy IgLON związanymi z adhezją międzykomórkową [11–13].

Bioinformatyczna analiza sekwencji aminokwasowej wskazuje, że w białku OPCML brak jest transmembranowej domeny niezbędnej do transdukcji sygnału. Zatem prawdopodobne jest, że OPCML nie jest niezależnym receptorem opioidowym, lecz jest ważną częścią kompleksu białkowego. Zarówno budowa kompleksu receptorowego, jak i funkcja białka OPCML nie są jeszcze dokładnie poznane [11, 14].

Wysoka ekspresja *OPCML* jest charakterystyczna dla jajnika i mózgu. Dużo niższy poziom transkryptu tego genu wykazano także w innych narządach miękkich, m.in. w jądrach, wątrobie, nerkach czy sercu [11].

Cel pracy

Celem pracy było poszukiwanie zależności pomiędzy metylacją wysp CpG genu OPCML i/lub obecnością mutacji w tym genie a występowaniem nowotworu jajnika.

Materiał i metody

Do badania włączono 114 kobiet – pacjentek Centrum Onkologii w latach 2002–2005. Wśród nich znajdowało się 75 kobiet chorych na raka jajnika (*adenocarcinoma serosum ovarii*). Materiał mrożony i archiwizowany w parafinie pochodził od 55 chorych, a płyn wysiękowy z jamy otrzewnej od 20. Grupę kontrolną stanowiło 39 kobiet, u których stwierdzono łagodne zmiany w jajniku (*cystadenoma serosum ovarii*). Kobiety te zostały wcześniej poddane mastektomii z powodu raka piersi, a ze względów profilaktycznych usunięto im przydatki.

W przypadku 94 pacjentek materiał do badania został pobrany śródoperacyjnie i zabezpieczony w Zakładzie Patologii COI (bloczki parafinowe lub mrożenie). Badany materiał został poddany analizie histopatologicznej w Zakładzie Patologii COI.

Od 20 chorych do badania molekularnego wykorzystano komórki jądrzaste pochodzące z płynu wysiękowego z jamy otrzewnowej. Zabieg odbarczający wykonano w Klinice Nowotworów Narządów Płciowych Kobiecych w Centrum Onkologii w Warszawie.

Izolacja DNA

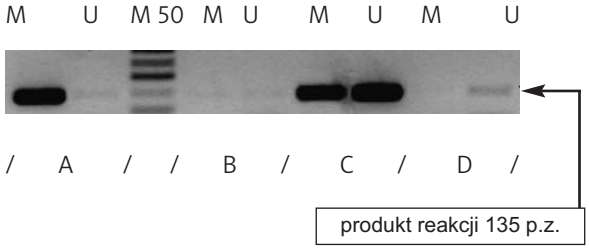
Genomowe DNA izolowano z użyciem zestawu Genomic Mini lub Sherlock AX (A&A Biotechnology) zgodnie z zaleceniami producenta zestawów.

Analiza metylacji genu OPCML

Genomowe DNA (1µg) poddano przez noc trawieniu enzymem Hind III w temp. 37°C, a następnie oczyszczono zestawem Wizard DNA Clean-Up System (Promega). Strawiony DNA (ok. 40 µl) denaturowano przy użyciu 1 M NaOH w temp. 75°C przez 15 min. Modyfikację przeprowadzono, dodając do mieszaniny odpowiednią ilość 3,9 M kwaśnego siarczynu sodowego (Sigma) i 10 mM hydrochinonu (Sigma). Całość inkubowano przez 4 godz. w 55°C. Próbkę oczyszczano zestawem Wizard DNA Clean-Up System (Promega). Depurynację przeprowadzono, dodając 1 M NaOH i inkubując próbkę przez 15 min w 37°C. DNA wytrącano przez noc, dodając 96% EtOH, 7,5 M CH_3COONH_4 (Sigma) oraz glikogen (3 µg/µl) (Sigma). Następnie próbkę wirowano przez 15 min przy prędkości 13 000 rpm. Uzyskany osad płukano w 75% EtOH i suszono w temperaturze pokojowej. Modyfikowane chemicznie DNA zawieszono w wodzie destylowanej.

MS-PCR (*Methylation Specific PCR*) jest odmianą techniki PCR służącą do ustalania różnic w metylacji badanej sekwencji DNA. Do oceny metylacji genu OPCML zastosowano specyficzne startery dla sekwencji metylowanej i niemetylowanej obejmujace 35 wysp CpG genu OPCML o długości 135 p.z. Mieszanina reakcyjna zawierała: 3,75 pM dNTPs, 15 pM starterów, 1U polimerazy FastStart (Roche), odpowiedni bufor reakcyjny oraz modyfikowane DNA. Reakcję przeprowadzono wg schematu: denaturacja wstępna 95°C 5 min; 35 cykli amplifikacji: 95°C 30 s, 59–62°C 30 s, 72°C 30 s; elongacja końcowa 72°C 7 min. Produkt reakcji rozdzielano w 2,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,2 µl/ml) (ryc. 1.).

Z powodu małej ilości DNA uzyskanej z materiału ze skrawków parafinowych przeprowadzono dodatkowy etap amplifikacji z użyciem starterów obejmujących większy fragment genu OPCML. Otrzymany produkt o wielkości 243 p.z. rozcieńczano w stosunku 1:25 i użyto w reakcji PCR opisanej powyżej. Sekwencje starterów dostępne są u autora pracy.



Ryc. 1. Obraz rozdziału produktu reakcji MS-PCR w żelu agarozowym. A– próbka od pacjentki mającej jedynie metylowaną kopię OPCML, M50 – marker; B – próba ślepa; C – próbka od pacjentki mającej kopię metylowaną i niemetylowaną OPCML; D – próbka od pacjentki mającej jedynie kopię niemetylowaną

Poszukiwanie mutacji w genie OPCML

Do poszukiwania mutacji w egzonach genu *OPCML* zastosowano technikę SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism Electrophoresis*). Dla każdego egzonu genu *OPCML* przeprowadzono osobną reakcję amplifikacji z zastosowaniem specyficznych starterów. Mieszanina reakcyjna zawierała: 3,75 pM dNTPs, 15 pM starterów, 1 U polimerazy FastStart (Roche), bufor 1 x stężony zawierający $MgCl_2$ (Roche) oraz genomowe DNA. Reakcja była prowadzona wg następującego schematu: denaturacja wstępna 95°C 5 min; 35 cykli amplifikacji: 95°C 30 s, 56–64°C 30 s, 72°C 30 s; elongacja końcowa 72oC 7 min. Sekwencje starterów dostępne są u autora pracy.

Około 5 µl produktu PCR rozdzielano w 2,5% żelu agarozowym w celu stwierdzenia efektywności reakcji. Następnie do produktu PCR (4–7 µl) dodawano bufor denaturujący (99% formamid, 1 M NaOH), inkubowano 10 min w temp. 95°C i przenoszono do lodu. Rozdział produktu prowadzono w 8% żelu akrylamidowym przy napięciu 70 V, przez 17 godz. w temp. 4°C. Żel barwiono metodą srebrzenia i suszono. Na podstawie zmian w obrazie prążków na żelu wybrano próbki do sekwencjonowania.

Sekwencjonowanie

Próbki po reakcji PCR oczyszczano zestawem Clean-Up (A&A Biotechnology) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Otrzymany produkt stanowił matrycę do reakcji sekwencjowania z użyciem zestawu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) zgodnie z zaleceniem producenta. Produkt reakcji sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania COI.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem pakietu SISA z wykorzystaniem testu χ^2 (*chi*^{2}).

Wyniki

Analiza metylacji genu *OPCML* w materiale pochodzącym od pacjentek chorych na raka jajnika oraz ze zmianami łagodnymi wykazała, że gen *OPCML* częściej ulega epigenetycznej inaktywacji u pacjentek chorych na raka (tab. I).

Metylację genu *OPCML* wykryto u 46 z 75 pacjentek (61%) chorych na raka jajnika oraz u 8 z 38 (12%) kobiet z grupy kontrolnej. Różnice w częstości występowania metylowanej kopii genu *OPCML* w obu grupach były statystycznie istotne (p=0,00001).

Dodatkowo przeprowadzono analizę metylacji genu OPCML w zależności od sposobu pozyskania materiału do badania. W grupie 20 kobiet, od których materiał uzyskano z płynu wysiękowego, metylację genu *OPCML* stwierdzono w 100% przypadków (w porównaniu z grupą kontrolną p<0,00001). W przypadku materiału pobranego śródoperacyjnie u 26 z 55 kobiet (48%) wykazano obecność metylowanej kopii genu OPCML (w odniesieniu do grupy kontrolnej p=0,0095).

Ze względu na sposób pobierania materiału możliwe jest, że materiał zawierał heterogenną populację komórek, na których wykonano badanie. W badanym materiale pochodzącym od pacjentek z grupy kontrolnej oraz z rakiem jajnika stwierdzono, że wyłącznie niemetylowana lub metylowana kopia genu występowała u odpowiednio 9 i 60 kobiet, co stanowi 8 i 53% badanych. W pozostałej grupie stwierdzono obecność zarówno metylowanej, jak i niemetylowanej kopii genu *OPCML* (tab. I.).

Poszukiwanie możliwych mutacji w genie *OPCML* przeprowadzono za pomocą metody przesiewowej SSCP. Na podstawie zmienionego obrazu migracji prążków w żelu poliakrylamidowym do sekwencjonowania wytypowano 4 próbki. Jednakże dla żadnej z nich nie potwierdzono obecności zmiany w sekwencji nukleotydowej.

Dyskusja

Gen *OPCML* jest opisywany jako potencjalny supresor nowotworowy odgrywający dużą rolę w rozwoju raka jajnika [11]. Przeprowadzona przez nas analiza metylacji *OPCML* wykazała, że w materiale pochodzącym od pacjentek z rakiem jajnika znacznie częściej obserwuje się ten sposób inaktywacji genu niż w materiale kontrolnym. Stwierdziliśmy, że metylacja *OPCML* występuje u 61% pacjentek chorych na raka jajnika, z czego u 48% kobiet, od których materiał do badania pobrano śródoperacyjnie. Wynik ten stanowi wartość pośrednią pomiędzy rezultatami otrzymanymi przez inne grupy badawcze. Wykazały one metylację genu *OPCML* u 87 i 33% pacjentek [11, 15].

Metylację genu *OPCML* stwierdziliśmy w 100% próbek z materiału pochodzącego z płynu wysiękowego. Obecność płynu wysiękowego w jamie otrzewnowej po operacji i kursach chemioterapii jest źle rokującym prognostykiem. U wszystkich chorych, od których pobrano płyn odbarczający, zaobserwowano progresję choroby. Odnalezienie komórek nowotworowych w wysięku może wskazywać na związek metylacji *OPCML* z osłabieniem właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych.

W badanej populacji nie wykryto mutacji w genie *OPCML*. Znajduje to potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych przez G. Sellara i wsp. [11], którzy badając materiał pochodzący z 212 pierwotnych raków jajnika, odnaleźli mutację zaledwie w jednej próbce. Konsekwencją tej mutacji była zmiana aminokwasowa P95R, która powoduje zaburzenia funkcji białka *OPCML* [11]. Sugeruje się, że inaktywacja w wyniku mutacji występuje znacznie rzadziej niż obniżenie ekspresji tego genu na skutek metylacji wysp CpG. Ponadto ostatnio publikowane badania dotyczące ekspresji OPCML potwierdzają, że epignetyczna inaktywacja jest głównym mechanizmem ograniczania ekspresji tego genu [16].

Tab. I. Porównanie częstości występowania metylowanej kopii genu OPCML w materiale od pacjentek ze zmianami łagodnymi w jajniku i chorych na raka jajnika

Grupa	Liczba przypadków	Obecna metylacja *OPCML*		Brak metylacji *OPCML*
		wyłącznie metylowana kopia *OPCML* (M+, U-)	współwystępowanie kopii metylowanej i niemetylowanej *OPCML* (M+, U+)	(M-, U+)
pacjentki chore na raka jajnika (wszystkie)	75	38 (51%)	8 (10%)	29 (39%)
materiał pobrany śródoperacyjnie	55	18 (33%)	8 (15%)	29 (52%)
materiał z wysięków z otrzewnej	20	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
pacjentki kontrolne ze zmianami łagodnymi w jajniku	39	7 (18%)	1 (3%)	31 (79%)

M – kopia metylowana
U – kopia niemetylowana

Zahamowanie ekspresji genów w trakcie rozwoju raka jajnika nie dotyczy wyłącznie *OPCML*. Zaobserwowano, że metylacji mogą ulegać także inne geny, m.in. *PTEN, P16, CASP8, DCR1, RASSF1A, TMS1, BRCA1, MGMT, MLH1*. Obniżenie ekspresji tych genów wskutek metylacji prowadzi do zaburzenia kluczowych funkcji komórkowych, np. proliferacji, cyklu komórkowego, procesów reperacji DNA i apoptozy [15].

Somatyczna metylacja wysp CpG jest dobrze poznaną przyczyną inaktywacji genów hamujących powstawanie nowotworu [5, 6]. Metylacja wysp CpG genu *OPCML* powoduje obniżenie ekspresji genu, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia poziomu białka – receptora i jednocześnie jego aktywności jako czynnika supresorowego [7, 11]. Sugeruje się, że przyczyną metylacji w obrębie wysp CpG w obszarze promotorowym genu *OPCML* jest wzrost aktywności onkogenicznego genu RAS, który aktywuje metylotransferazy (w wyniku czego wzrasta metylacja genów, w tym również genów supresorowych) [17]. Mechanizmy kontrolujące metylację i demetylację DNA nie są jeszcze do końca poznane.

Obniżenie ekspresji związane z metylacją wykazano również dla innych przedstawicieli rodziny IgLON – *NEGR1* i *LSAMP* – mogących również pełnić funkcję genów supresorowych w raku jajnika [16].

Dokładne poznanie mechanizmu regulującego ekspresję oraz działanie *OPCML* jest niezwykle ważnym celem, którego osiągnięcie przyczyni się do lepszego zrozumienia procesu nowotworzenia.

Wniosek

Z powyższych badań można wnioskować, że epigenetyczna inaktywacja genu *OPCML* poprzez metylację wysp CpG może pełnić istotną rolę w rozwoju raka jajnika.

Badania finansowane z grantu KBN nr 2 PO5E 032 28 (0708).

Piśmiennictwo

1. Zatoński WA, Tyczyński JE. Epidemiologia nowotworów złośliwych w Polsce w piętnastoleciu 1980–1994. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie, Warszawa 1997.
2. Tyczyński JE i wsp. Atlas umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce w latach 1991–1995. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie, Warszawa 1998.
3. Basham VM, Lipscombe JM, Ward JM, at al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. Breast Cancer Res. 2002; 4: R2.
4. Ottini L, D'Amico C, Noviello C, at al. BRCA1 and BRCA2 mutations in central and southern Italian patients. Breast Cancer Res 2000; 2: 307-10.
5. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, at al. A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Res 2001; 61: 3225-9.
6. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene 2002; 21: 5427-40.
7. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, at al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. Oncogene 2001; 20: 3156-65.
8. Szpecht-Potocka A. Rodzicielskie piętno genomowe w zespole Praderа-Williego. Postępy Biochemii 2001; 1: 87-97.
9. Robertson KD. DNA methylation and chromatin. Oncogene 2002; 21: 5361-79.
10. Launonen V, Stenback F, Puistola U, et al. Chromosome 11q22.3-q25 LOH in ovarian cancer: association with a more aggressive disease course and involved subregions. Gynecol Oncol 1998; 71: 299-304.
11. Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, et al. OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. Nat Genet 2003; 34: 337-43.
12. Funatsu N, Miyata S, Kumanogoh H, at al. Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. J Biol Chem 1999; 274: 8224-30.
13. Harpaz Y, Chothia C. Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. J Mol Biol 1994; 238: 528-39.
14. Shark KB, Lee NM. Cloning, sequencing and localization to chromosome 11 of a cDNA encoding a human opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM). Gene 1995; 155: 213-7.
15. Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, et al. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian. Cancer Res 2005; 65: 8961-7.
16. Mei FC, Young TW, Liu J, et al. RAS-mediated epigenetic inactivation of OPCML in oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells. FASEB J 2006; 20: 497-9.
17. Ntougkos E, Rush R, Scott D, et al. The IgLON family in epithelial ovarian cancer: expression profiles and clinicopathologic correlates. Clin Cancer Res 2005; 11: 5764-8.