



# بررسی متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF و تأثیر پلی مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ بر این متیلاسیون در بیماران مبتلا به سرطان پستان

سیروس نعیمی<sup>\*۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۴/۱۰ - پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۱۶)

## چکیده

**زمینه:** افزایش متیلاسیون در جزایر CpG، یکی از مکانیسم‌های مهم در خاموش شدن ژن می‌باشد. در بسیاری از سرطان‌ها، ژن‌های مختلفی دچار این (CpG island hyper methylation) CIHM می‌گردند. فاکتور تنظیمی P14/ARF در تنظیم منفی سیکل سلولی از طریق تأثیر بر مسیر فاکتور P53 دخالت دارد. از طرف دیگر اینترلوکین ۱۷ با اثرات التهابی می‌تواند باعث افزایش متیلاسیون گردد. هدف از این تحقیق بررسی متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF و تأثیر اینترلوکین ۱۷ بر این متیلاسیون در بیماران مبتلا به سرطان پستان در جنوب کشور و مقایسه آن با افراد سالم می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق موردی - شاهدی از خون محیطی ۴۰ بیمار مبتلا به بیماری سرطان پستان مراجعه کننده به بیمارستان‌های شیراز و ۴۰ زن سالم، جهت استخراج DNA، با استفاده از روش حذف نمکی (Salting out) و پروتئیناز K استفاده گردید. افراد کنترل دارای سابقه خانوادگی سرطان یا بیماری‌های خود ایمنی از مطالعه حذف گردیدند. جهت بررسی پلی مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷، از روش PCR-RFLP و جهت بررسی متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF، از روش MSPCR استفاده گردید. نتایج حاصله از مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آری کوئین و آزمون‌های مجذور کای (X<sup>2</sup>) و Hardy-weinberg equilibrium به ترتیب مورد مطالعه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** یافته‌ها مؤید این مطلب بود که، میان متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF و ایجاد بیماری ارتباط معنی‌داری وجود دارد بدین صورت که پروموتور ژن مذکور در افراد سالم نسبت به افراد بیمار به میزان کمتری متیله شده بود ( $P < 0.05$ ). از طرف دیگر یک ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ GG در پلی مورفیسم ژن IL17 F و متیلاسیون ژن P14/ARF مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF نقش مهمی در ایجاد سرطان پستان ایفا می‌کند با توجه به کاهش متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF و ارتباط آن با این بیماری، به نظر می‌رسد که بتوان از آن به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص بیماری استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** سرطان پستان، متیلاسیون پروموتور، پلی مورفیسم، اینترلوکین ۱۷، P14/ARF

\* گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

## مقدمه

امروزه مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی به عنوان یک فاکتور مشخص در توسعه سرطان پستان شناخته می‌شوند (۱). مطالعات نشان داده است که سرطان پستان همچون دیگر سرطان‌ها با تغییرات اپی‌ژنتیکی همراه است که این تغییرات بدون اینکه تغییری در توالی اولیه DNA به وجود آورند (۲ و ۳)، باعث تغییر در تنظیم غیرطبیعی فاکتورهای نسخه‌برداری و به دنبال آن تغییر در تکثیر سلولی، بقای سلولی و همچنین تمایز سلولی می‌گردد (۳-۶). در سلول‌های ترانسفورم شده به سلول‌های سرطانی، تغییرات اپی‌ژنتیکی در سطح کروموزومی رخ می‌دهد که از جمله می‌توان به متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی، و تغییرات به وجود آمده در عملکرد و بیان فاکتورهای دخیل در تنظیم فرآیندهای اسمبل شدن و باز آرائی نوکلئوزوم، اشاره نمود (۱، ۵، ۷ و ۸). متیلاسیون DNA یکی از سه لایه اپی‌ژنتیکی کنترل بیان ژن‌های دخیل در سلول‌های زاینده و همچنین ژن‌های اختصاصی بافت می‌باشد (۹).

در حدود ۳-۶ درصد از واحدهای سیتوزین در پستانداران متیله می‌باشد. این متیلاسیون باعث تأثیر بر روی بیان ژن می‌گردد، خصوصاً وقتی که این دای نوکلئوتیدها در جزایر CpG (CpG Island) واقع شده باشند. این جزایر غالباً در نواحی پروموتور ژن‌ها واقع شده‌اند (۱۰-۱۲).

در حقیقت نیمی از ژن‌های خانه‌دار (Housekeeping Genes) انسانی (در حدود ۴۵۰۰ ژن)، حاوی جزایر CpG در ناحیه پروموتور خود می‌باشند (۱۲). P14/ARF یکی از مولکول‌های دخیل در تنظیم سیکل سلولی است که منجر به تنظیم منفی سیکل سلولی از طریق مسیر P53 می‌گردد. این فاکتور

تنظیمی در لوکوس مهار کننده سرطان، یعنی INK4a /ARF قرار دارد (۱۳). این لوکوس ژنی باعث کددهی پروتئین‌هایی می‌شود که در اصل یک مهار کننده کیناز وابسته به سیکلین‌ها می‌باشند (۱۴). اگر چه موتاسون‌هایی که منجر به غیر فعال شدن p14/ARF می‌شود، در سرطان‌های انسانی به ندرت اتفاق می‌افتد ولی بیان p14/ARF به طور اختصاصی در تومورهای انسانی تغییر می‌یابد (۱۵) که این اتفاق از طریق متیلاسیون، واریانت‌های اسپلایسینگ جایگاه‌ها و فاکتورهای سرطان‌زای Twist و Aml-ETO انجام می‌پذیرد (۱۴).

التهاب فرایندی است که سیستم ایمنی را به سمت عفونت یا بافت‌های آسیب دیده هدایت می‌کند. التهاب مزمن یک نقش مهم در پاتوژنز بیماری‌های خودایمنی، آلرژی و سرطان‌ها بازی می‌کند. اینترلوکین ۱۷ یکی از سایتوکاین‌های پیش التهابی است. خانواده اینترلوکین ۱۷ متشکل از ۶ جزء است، (۱۹-۱۶). که در این میان، اینترلوکین IL-17A و IL-17F بیشتر بررسی شده‌اند. اینترلوکین ۱۷ دارای چندین پلی‌مورفیسم بوده که این پلی‌مورفیسم‌ها با میزان بیان این سایتوکاین در ارتباط می‌باشد. با توجه به عدم شناخت دقیق و مناسب از عوامل ایجاد بیماری سرطان پستان و همچنین توجه به این موضوع که این بیماری درصد بالایی از سرطان‌ها را در زنان به خود اختصاص داده است و توجه به این نکته که یکی از مشکلات اساسی در سرطان‌ها، نامیرا شدن و عدم کنترل چرخه سلولی می‌باشد و با توجه به نقش پروتئین P14/ARF در تنظیم سیکل سلولی، به نظر می‌رسد که تغییرات در بیان این پروتئین می‌تواند در ایجاد و گسترش سرطان پستان نقش مهمی را ایفا نماید. لذا هدف از این تحقیق، بررسی ارتباط میان متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF و بیماری سرطان

شرایط اخلاقی پزشکی رعایت گردید و از بیماران رضایت‌نامه کتبی گرفته شده است. از افراد مورد مطالعه ۵ سی‌سی خون سیاهرگی گرفته شد و به لوله‌های آزمایش حاوی EDTA منتقل شد. DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی با روش پروتئیناز K و حذف با استفاده از غلظت بالای نمک استخراج شد.

### واکنش RFLP-PCR جهت بررسی پلی‌مورفیسم

#### ایترلوکین ۱۷

برای تعیین ژنوتیپ ژن ایترلوکین ۱۷ افراد مورد مطالعه از روش RFLP-PCR استفاده شد. قطعات DNA حاوی هر جایگاه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شدند (۲۰). جهت موقعیت G197A IL-17A از زوج پرایمر

و Forward primer: 5-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3

Reverse primer: 5-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3

و جهت موقعیت IL-17F A7488G از پرایمرهای

Forward primer: 5-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3

Reverse primer: 5-GGTAAGGAGTGGCATTCTA-3

مورد نظر با دمای هم سرشته شدن (annealing temperature) برابر ۶۵ درجه سانتی‌گراد و تعداد ۳۰ سیکل تکثیری، تکثیر گردیدند. سپس محصولات PCR به ترتیب تحت تأثیر آنزیم‌های محدودکننده XagI و NlaIII و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفتند. محصولات حاصل از شکست آنزیمی، در ژل آگارز ۲ درصد تحت تأثیر نیروی الکتروفورز از هم جدا شدند (شکل ۱ و ۲). مقادیر و نحوه انجام واکنش و قطعات حاصل از هضم آنزیمی در جدول ۱ آمده است.

پستان بوده و از طرف دیگر به بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن ایترلوکین ۱۷ بر میزان متیلاسیون ژن P14/ARF در بیماران پرداخته شد.

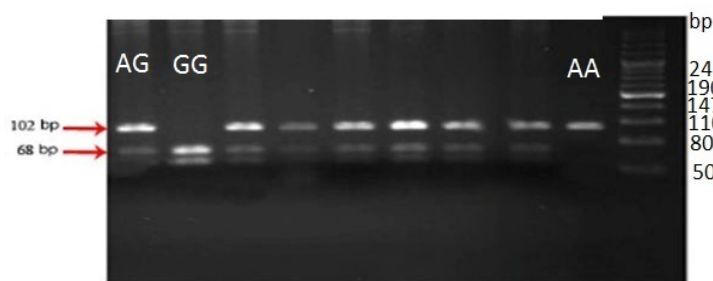
### مواد و روش‌ها

گروه مورد مطالعه شامل ۴۰ نفر مبتلا به سرطان پستان با میانگین سنی  $49/3 \pm 11/6$  بود که در طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳ از استان‌های بوشهر، کهگیلویه و بویراحمد، هرمزگان و اهواز به بیمارستان‌های شهید فقیهی و نمازی شیراز مراجعه نموده و ابتلای به سرطان آنها با بررسی‌های پاتولوژیک تأیید شده بود. گروه کنترل شامل ۴۰ نفر با میانگین سنی  $51/8 \pm 12/9$  که از نظر سن با گروه بیمار مطابقت داشتند و فاقد هرگونه سابقه سرطان و بیماری‌های خودایمنی در خود و بستگان درجه اول خود بودند. در این بررسی، تمامی

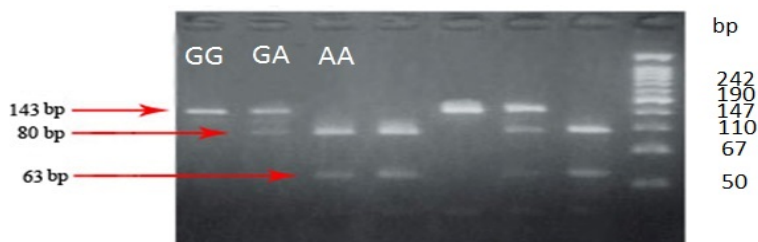
استفاده گردید. برای انجام واکنش PCR برای هر دو موقعیت به هر تیوب ۱۱/۱ میکرولیتر آب، ۱/۷ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۶ میکرولیتر از مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTP، ۰/۶ میکرولیتر Forward Primer، ۰/۶ میکرولیتر Reverse Primer که پرایمرها با غلظت (۲۰ پیکومولار) بودند، ۷ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۰/۳ میکروگرم/میکرولیتر و ۱/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز با غلظت ۱ واحد بر میکرولیتر افزوده شد. تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفته و قطعات

جدول (۱) دمای هم سرشته شدن، آنزیم‌های محدود کننده و جایگاه شکست این آنزیم‌ها و قطعات حاصل از شکست آنزیمی

پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی	دمای هم سرشته شدن	آنزیم محدود کننده	جایگاه شناسایی	قطعات حاصل از شکست
IL-17A rs2275913G197A	۶۵	XagI	5'CCTNN↓NNNAGG...3' 3' GGANNN↑NNTCC...5'	GG (۶۸ و ۳۴ جفت باز) GA (۶۸ و ۱۰۲ جفت باز) AA (۱۰۲ جفت باز)
IL-17F A7488G rs763780	۶۵	NlaIII	5'...CATG↓...3' 3'...↑GTAC...5'	AA (۶۳ و ۸۰ جفت باز) AG (۶۳، ۸۰ و ۱۴۳ جفت باز) GG (۱۴۳ جفت باز)



شکل (۱) قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR پلی مورفیسم rs2275913 از ژن IL-17A ژنوتیپ AA (قطعه ۱۰۲ جفت بازی)، ژنوتیپ GG (قطعات ۶۷ و ۳۴ جفت بازی) و ژنوتیپ GA (قطعات ۶۸، ۱۰۲، ۳۴ جفت بازی)



شکل (۲) قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR پلی مورفیسم rs763780 از ژن IL-17F ژنوتیپ AA (قطعات ۶۳ و ۸۰ جفت بازی)، ژنوتیپ GG (قطعه ۱۴۲ جفت بازی) و ژنوتیپ AG (قطعات ۶۳ و ۸۰، ۱۴۳ جفت بازی)

پلی‌مراز استفاده گردید (MSPPCR)<sup>۱</sup> در این روش ابتدا، ژنوم افراد مورد مطالعه با استفاده از کیت بیوسولفیت ساخت شرکت QIAGEN آلمان با Lot No:142339708 و با توجه به نحوه دستورالعمل

متیلاسیون اختصاصی زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تعیین متیلاسیون جزایر CpG در پروموتور ژن P14/ARF برای بررسی متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون ژن P14/ARF از روش متیلاسیون اختصاصی زنجیره‌ای

<sup>۱</sup> Methylation specific PCR

اختصاصی آنها متفاوت بود. روش کار به طور خلاصه به این صورت بود که برای هر دو موقعیت به هر تیوب ۹/۶۵ میکرولیتر آب، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت ۲۵ میلی مولار، ۰/۴۵ میکرولیتر از مخلوط ۱۰ میلی مولار dNTP، ۰/۶ میکرولیتر Forward Primer، ۰/۶ میکرولیتر Reverse Primer که پرایمرها با غلظت (۱۰ پیکومولار) بودند، ۱ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۰/۳ میکروگرم / میکرولیتر ۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراس با غلظت ۱ واحد بر میکرولیتر افزوده شد. تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفته و قطعات مورد نظر با دمای هم سرشته شدن (annealing temperature) برابر ۵۷/۱ برای بررسی متیلاسیون و ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای بررسی عدم متیلاسیون و تعداد ۳۳ سیکل تکثیر، تکثیر گردیدند. پس از پایان واکنش MSPCR، محصولات در ژل آگارز ۲ درصد، الکتروفورز شد. توالی پرایمرهای استفاده شده جهت بررسی متیلاسیون ژن مذکور در جدول ۲ آورده شده است.

کیت، آماده‌سازی گردید که در انتها، این اعمال باعث می‌شدند که بازهای آلی سیتوزینی که متیله شده، دست نخورده باقی مانده ولی اگر متیله نشده باشند به باز آلی اوراسیل تبدیل گردند. برای بررسی متیلاسیون نواحی پروموتور ژن P14/ARF از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. لازم به ذکر است که برای هر ژن نیاز به دو زوج پرایمر اختصاصی بود. یکی برای بررسی متیلاسیون و دیگری برای بررسی عدم متیلاسیون. همچنین برای کنترل مثبت و منفی متیلاسیون واکنش‌های انجام شده از نمونه‌های کنترل منفی Human HCT116DKO با Lot N:ZRC174904 ساخت شرکت Zymoresearch آمریکا و برای کنترل مثبت آن از نمونه کنترل مثبت Human HCT116DKO با Lot N:ZRC175286 ساخت شرکت Zymoresearch آمریکا، استفاده شد. جهت واکنش MSPCR برای هر نمونه نیاز به دو تیوب جداگانه برای بررسی متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون ژن‌های مورد مطالعه برای هر فرد می‌باشد که محتویات و مقادیر هر تیوب اپندورف مشابه هم بوده، متنها پرایمرهای

جدول ۲) پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش MSPPCR ژن P14/ARF (۲۱)

GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	MF	p14
AAAACCTCACTCGCGACGA	MR	p14
TTTTGGTGTAAAGGGTGGTGTAGT	UMF	p14
CACAAAACCTCACTCACAACAA	UMR	p14

MF: methylation Forward, MR: methylation Reversed, UMF: Unmethylation Forward, UMR: Unmethylation Reversed

آزمون آماری مربع کای و برنامه آلی کوبین ویرایش ۲۰۰۰ استفاده شد. در این مطالعه  $P < 0/05$  معنی‌دار تلقی شد.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش MSPCR در مورد ژن P14/ARF و با شرایط ذکر شده در قسمت مواد و

### اصول کاربرد آمار زیستی

مطالعه آماری با استفاده از برنامه‌های آماری SPSS ویرایش ۱۸ و EPI Info 2000 و آلی کوبین و با آزمون‌های مجذور کای (x<sup>2</sup>) و فیشر Kappa بسته به مورد انجام گرفت. برای بررسی اینکه گروه‌های مورد مطالعه در جایگاه‌های مورد بررسی از تعادل هاردی و اینبرگ تبعیت می‌کنند یا خیر از

پروموتور متیله و غیرمتیله به صورت هتروزیگوت می‌باشند که این نسبت در ۱۱ فردی که دارای پلی‌مورفیسم AG می‌باشند به ترتیب، ۸، ۱ و ۲ نفر می‌باشند. همچنین تأثیر پلی‌مورفیسم ژن IL-17F A7488G بر متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF حاکی از آن است که از ۲۱ فردی که دارای پلی‌مورفیسم GG هستند، پروموتور ژن P14/ARF ۱۰ نفر از آنها متیله شده، ۶ نفر دارای پروموتور غیرمتیله و ۵ نفر دارای پروموتور متیله و غیرمتیله به صورت هتروزیگوت می‌باشند که این نسبت در ۱۵ فردی که دارای پلی‌مورفیسم GA می‌باشند به ترتیب، ۱۳ نفر، ۱ و ۱ نفر و در ۴ فردی که دارای پلی‌مورفیسم GA می‌باشند به ترتیب، صفر نفر، ۳ و ۱ نفر می‌باشد. نتایج حاصله نشانگر این مطلب بود که میان پلی‌مورفیسم‌های ذکر شده با میزان متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF، تنها ژنوتیپ GG در پلی‌مورفیسم ژن IL17 F با متیلاسیون پروموتور P14/ARF ارتباط معنی‌داری داشته است ( $P=0/01$ ). (جدول ۴).

جدول ۴) بررسی پلی‌مورفیسم ژن IL-17A G197A بر متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF در بیماران

P	P14/ARF				
	کل	M/UM	UM	M	
۰/۳۳	۲۸	۴	۹	۱۵	AA
	۱۱	۲	۱	۸	AG
	۲۳	۱۰	۶	۳۹	Total
۰/۰۱	۲۱	۵	۶	۱۰	GG
۰/۰۷	۱۵	۱	۱	۱۳	GA
۰/۰۶	۴	۱	۳	۰	AA
	۲۳	۱۰	۷	۴۰	Total

### بحث

سرطان پستان یکی از سرطان‌های شایع است که سالانه تعداد زیادی از افراد را درگیر کرده و درصد

روش‌های آزمایش منجر به تولید محصولی به طول ۱۲۲ جفت باز به عنوان قطعه مورد آزمایش در مورد متیلاسیون پروموتور ژن مذکور و محصولی به طول ۱۳۲ جفت باز به عنوان قطعه مورد آزمایش در مورد عدم متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF شد. پروموتور ژن P14/ARF افرادی که فقط باند ۱۲۲ جفت بازی را نشان دادند، به عنوان CIHM (CpG Island Hyper Methylation) محسوب شدند که در این افراد تعداد ۳ یا بیشتر از ۳ دی‌نوکلئوتید CpG پروموتورژن آنها دچار متیلاسیون شده و به عنوان CIHM محسوب می‌شوند.

نتایج حاصله، مؤید این مطلب بود که میان متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF و ایجاد بیماری ارتباط معنی‌داری وجود دارد بدین صورت که عدم متیلاسیون پروموتور ژن مذکور در افراد سالم افزایش چشمگیری را نسبت به بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان می‌دهد. نتایج حاصله در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳) مقایسه متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF

در بیماران و گروه کنترل

Pv	افراد مورد مطالعه	
	بیماران	گروه کنترل
۰/۴	۱۸(۴۵)	۱۲(۳۰)
۰/۰۴	۱۴(۳۵)	۲۳(۵۷/۵)
۰/۲	۸(۲۰)	۵(۱۲/۵)
	Total ۴۰	Total ۴۰

M: methylation; UM: UN methylation

در ادامه تجزیه و تحلیل اطلاعات، به بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن IL-17A G197A بر متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF استخراج شده از بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداخته شد. نتایج حاصله حاکی از این است که از ۲۸ فردی که دارای پلی‌مورفیسم AA هستند، پروموتور ژن P14/ARF پانزده نفر از آنها متیله شده، ۹ نفر دارای پروموتور غیرمتیله و چهار نفر دارای

خون محیطی افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل پرداختیم. نتایج نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که تفاوت معنی‌داری در میزان عدم متیلاسیون در پروموتور ژن مذکور در افراد سالم نسبت به افراد مبتلا به سرطان پستان وجود دارد به عبارت دیگر پروموتور ژن مذکور در افراد سالم به نسبت کمتری نسبت به بیماران متیله شده است که احتمالاً این خصوصیت منجر به افزایش بیان این ژن گردیده و با توجه به این مطلب که پروتئین P14/ARF، از جمله فاکتورهای دخیل در تنظیم سیکل سلولی و سرکوب کنندگی سلول‌های توموری است که از مسیر فاکتور P53 نقش مهمی را ایفا می‌نماید، به نظر می‌رسد که متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون پروموتور این ژن می‌تواند نقش مهمی در مقاومت و یا مستعد شدن افراد به بیماری سرطان پستان را ایفا نماید. از طرف دیگر تأثیر فاکتور التهابی ایتیلوکین ۱۷ بر روی متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF، مؤید این نکته بوده که احتمالاً فاکتورهای التهابی می‌تواند در افزایش متیلاسیون پروموتور ژن‌های تنظیمی سیکل سلولی، نقش مؤثری را ایفا نمایند. مطالعات انجام شده قبلی هم مؤید این مطلب است که افزایش متیلاسیون در پروموتور ژن‌ها با کاهش بیان این ژن‌ها در ارتباط می‌باشد. برای درک بهتر عملکرد P14/ARF در سرطان پستان، می‌توان به بررسی میزان بیان این پروتئین در افراد مبتلا به سرطان پستان و میزان متیلاسیون ژن مذکور پرداخت. مطالعاتی که قبلاً انجام شده نیز مؤید نقش مهم این پروتئین در ایجاد و یا مقاومت در برابر این بیماری می‌باشد.

جیمز (James) و همکاران در تحقیقی که با استفاده از روش Micro array بر روی خون محیطی ۱۴ نفر از بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام داده‌اند، مشاهده کرده‌اند که از بین ۱۷ ژن کاندید در سرطان پستان که

بالایی از افراد در اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. از طرف دیگر مطالعات نشان می‌دهد که رخ دادن متیلاسیون نامناسب در نواحی جزایر CpG که غیرمتیله می‌باشند، منجر به نامیرا شدن و ترانسفورم شدن سلول‌ها می‌شود (۲۱)، که این کار، از طریق غیرفعال شدن نسخه‌برداری ژن‌های سرکوب کننده تومور، انجام می‌گیرد (۲۲-۲۴). بنابراین نقشه‌برداری از الگوهای متیلاسیون در جزایر CpG، می‌تواند به عنوان یک ابزار مهم در درک وقایع بیان ژن در سلول‌ها، هم در حالت نرمال و هم در حالت پاتولوژیکی (مثل سرطان) مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، مطالعات انجام شده نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که التهاب و ایجاد واکنش‌های اکسیداتیو در سلول‌ها می‌تواند منجر به افزایش متیلاسیون DNA شود (۲۵). خانواده ایتیلوکین ۱۷ (IL-17) که به عنوان فاکتورهای پیش التهابی عمل می‌نمایند، شامل گروهی از سایتوکاین‌ها می‌باشد که مهمترین و شناخته‌ترین آنها شامل IL-17A و IL-17F می‌باشد (۲۶). میزان بیان این سایتوکاین در بیماری‌های خودایمنی از قبیل روماتیسم مفصلی و پسوریازیس و همچنین سرطان‌هایی از قبیل پروستات، معده و سرطان پستان، افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد (۲۷ و ۲۸). IL-17A و IL-17F در موقعیت‌های A7488G و G197A به ترتیب دارای پلی‌مورفیسم بوده که این پلی‌مورفیسم با بیماری‌های خودایمنی مانند روماتیسم مفصلی و التهاب قولون در ارتباط می‌باشد (۲۹ و ۳۰).

همچنین مطالعات انجام شده حاکی از ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها با سرطان معده بوده است (۲۰). لذا با توجه به مطالب ذکر شده، در این تحقیق ما به بررسی متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF استخراج شده از

نقش مهاری این فاکتور در چرخه سلولی را بهتر نمایان می‌سازد (۳۵).

شولنینا (Shulenina) و همکاران به بررسی میزان بیان P14/ARF و دیگر ژن‌های دخیل در مسیر تنظیمی P53 در بیماران مبتلا به سرطان خون قبل و بعد از رادیودرمانی پرداخته و به این نتیجه رسیدند که کاهش بیان این ژن‌ها در بیماران می‌تواند منجر به تغییرات موتاسیونی گردد (۳۶).

#### نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب ذکر شده و اطلاعات به دست آمده و با عنایت به نقش مهاری پروتئین P14/ARF در مهار سیکل سلولی و کنترل نمودن چرخه سلولی از طریق مسیر P53 به نظر می‌رسد که متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون پروموتور ژن P14/ARF با تأثیر اپی‌ژنتیکی بر روی خاموش و یا روشن شدن ژن مذکور، منجر به مستعد و یا مقاوم شدن افراد به بیماری سرطان پستان می‌گردد.

#### تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسنده بیان نشده است.

در بررسی آنها مورد استفاده قرار گرفته، میزان متیلاسیون ATM (یکی از ژن‌های کاندید در ایجاد سرطان پستان) با بیماری ارتباط مستقیمی داشته و این طور استنباط نموده که می‌توان از آن به عنوان یک بیومارکر استفاده نمود (۳۱).

عسکری و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان در کشور هندوستان انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که افزایش متیلاسیون ژن‌های P14/ARF و P16/Ink4 با بیماری سرطان پستان در ارتباط می‌باشد (۳۲).

اشمیت (Schmitt) و همکاران، با آزمایش بر روی لیمفومای موشی به این نکته دست پیدا کردند که موتاسیون در ژن‌های P53 و INK4A/ARF باعث tumorigenesis و مقاومت دارویی تومور می‌گردد (۳۳). در مطالعه دیگری که توسط لینگگی (Linggi) و همکاران انجام گرفت، به این نتیجه رسیدند که P14/ARF یک مهار کننده توموری در بسیاری از لوکمهای انسانی می‌باشد (۳۴).

وازیر (Wazir) و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی سرطان پستان انجام دادند به این نتیجه رسیدند که میزان بیان mRNA P14 در نمونه‌های غیرسرطانی بسیار بیشتر از نمونه‌های بیمار می‌باشد که این مطلب،

#### References:

1. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes Dev* 2006; 20(23): 3215-31.
2. Gerstung M, Eriksson N, Lin J, et al. The temporal order of genetic and pathway alterations in tumorigenesis. *PLoS One* 2011; 6(11): e27136.
3. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21(35): 5462-82.
4. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007; 117(11): 3155-63.
5. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(2): 107-16.
6. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8(4): 286-98.
7. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6): 415-28.
8. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007 Feb 23; 128(4): 683-92.
9. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8(7): 1499-504.



10. Bird AP. Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 1995; 11(3): 94-100.
11. Vanyushin BF, Tkacheva SG, Belozersky AN. Rare bases in animal DNA. *Nature* 1970; 225(5236): 948-9.
12. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(24): 11995-9.
13. Duro D, Bernard O, Della Valle V, et al. A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. *Oncogene* 1995; 11(1): 21-9.
14. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* 2005; 576(1-2): 22-38.
15. Harland M, Taylor CF, Chambers PA, et al. A mutation hotspot at the p14ARF splice site. *Oncogene* 2005; 24(28): 4604-8.
16. Hizawa N, Kawaguchi M, Huang SK, et al. Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(9): 1109-14.
17. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6(11): 1133-41.
18. Yang XO, Chang SH, Park H, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* 2008; 205(5): 1063-75.
19. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183(6): 2593-603.
20. Wu X, Zeng Z, Chen B, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *Int J Cancer* 2010; 127(1): 86-92.
21. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al. Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. *Int J Mol Med* 2009; 24(4): 563-9.
22. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21): 9700-4.
23. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55(20): 4525-30.
24. Herman JG, Jen J, Merlo A, et al. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* 1996; 56(4): 722-7.
25. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 101-18.
26. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, et al. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6): 1265-73.
27. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 2007; 17(5): 435-40.
28. Chang SH, Dong C. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine* 2009; 46(1): 7-11.
29. Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(4): 367-70.
30. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2008; 28(1): 44-9.
31. Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Hum Mol Genet* 2009; 18(7): 1332-42.
32. Askari M, Sobti RC, Nikbakht M, et al. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes (p14/ARF and p16/INK4a): case-control study in North Indian population. *Mol Biol Rep* 2013; 40(8): 4921-8.
33. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002; 109(3): 335-46.
34. Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, et al. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2002; 8(7): 743-50.
35. Wazir U, Jiang WG, Yasaei H, et al. P14ARF is down-regulated during tumour progression and predicts the clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer Res* 2013; 33(5): 2185-9.
36. Shulenina LV, Ushenkova LN, Ledin EV, et al. Expression of P53, NPM1, Kras, c-Myc, p14(ARF) genes in blood cells of cancer patients before and after radiation therapy]. *Radiats Biol Radioecol* 2012; 52(6): 572-81.

*Original Article*

# Study of P14/ARF Gene Promoter Methylation and Effect of Interleukin-17 Gene Polymorphism on this Methylation among Breast Cancer Patients

S. Naeimi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Collegue of Science, Kazerun branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

(Received 1 Jul, 2015      Accepted 7 Dec, 2015)

## Abstract

**Background:** hyper-methylation in CpG Island is one of the major mechanisms in gene silencing. In many cancers, different genes are experiencing CIHM (CpG island hyper methylation). P14 / ARF regulatory factor, involved in negative regulation of the cell cycle through the effect on P53 factor pathway. On the other hand, Interleukin 17 can be increased methylation by inflammatory effects. The purpose of this study was to study the P14/ARF gene promoter methylation and effect of Interleukin-17 on this methylation among breast cancer patients in the south of the country and its comparison with healthy people.

**Materials and Methods:** in this case-control study, peripheral blood of 40 patients with breast cancer who were referred to hospitals in Shiraz and 40 healthy women was used to DNA extraction by using salt out and K proteinase . Control subjects with a family history of cancer or autoimmune diseases were excluded from the study. We used PCR-RFLP method In order to study of Interleukin-17 gene polymorphism, and MSPCR method was used to study of P14/ARF gene promoter methylation. The results of the study were studied by using SPSS software, Arlequin, chi-square and Hardy-weinberg equilibrium test was used respectively.

**Results:** findings confirms that there was a significant association between P14/ARF gene promoter methylation and disease and mentioned gene promoter was less methylated in healthy subjects compared to patients ( $p<0.05$ ). On the other hand, there is a significant association between GG genotype in IL17 F gene polymorphisms and P14 /ARF gene methylation ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** P14/ARF gene promoter's methylation play an important role in breast cancer. Due to the decline of P14/ARF gene promoters methylation and its association with this disease, seems that it could be used as a biomarker for diagnosis.

**Key word:** Breast cancer, promoter methylation, polymorphism, Interleukin-17, P14/ARF

©Iran South Med J. All rights reserved.

---

Cite this article as: Naeimi S. Study of P14/ARF Gene Promoter Methylation and Effect of Interleukin-17 Gene Polymorphism on This Methylation among Breast Cancer Patients. Iran South Med J 2016; 19(5): 809-818.

---

Copyright © 2016 Naeimi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

---

\*Address for correspondence: Department of Genetics, Collegue of Science, Kazerun branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. Email: naeimis@kau.ac.ir