



مطالعه وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFN، RASSF1A، NANOG1، CASP8، WIF1 و CTSL2 در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان پستان در ایران

علی متولی‌زاده اردکانی^{۱*}، مهسا شیرانی^۱، احمد هاشمی^۱، زهره بصیری^۱، یزدان رحمتی^۱،
نوبین نیک‌بخش^۲، سحر ادیسی^۲، شهلا محمدگنجی^۱

^۱ پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۷/۲۸ - پذیرش مقاله: ۹۴/۱۱/۳)

چکیده

زمینه: غربالگری ماموگرافی برای تشخیص سرطان پستان در زنان جوان نتایج مثبت و منفی کاذب نشان می‌دهد و بنابراین برای تشخیص سرطان پستان در مراحل ابتدایی نیاز به یک روش غیرتهاجمی و کم هزینه دیگر نیز هست. تغییرات متیلاسیون DNA یکی از رایج‌ترین تغییرات مولکولی در سرطان‌های انسانی و از جمله سرطان پستان است. بنابراین بررسی الگوی متیلاسیون بافت‌ها می‌تواند در تشخیص زود هنگام سرطان مورد استفاده قرار گیرد. همچنین شباهت الگوهای متیلاسیون یافت شده در نمونه‌های توموری و در پلاسما، کاربرد بالقوه شناسایی مولکولی سرطان پستان، بر پایه خون را نشان می‌دهد. هدف از این بررسی ارزیابی قابلیت متیلاسیون پروموتور برای تشخیص بالینی سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی متیلاسیون پروموتور برای تشخیص بالینی سرطان پستان ۲۱ بافت توموری و ۲۱ بافت نرمال مورد مطالعه قرار گرفتند. وضعیت متیلاسیون ۶ ژن (SFN، RASSF1A، NANOG1، CTSL2، WIF1 و CASP8) با استفاده از روش PCR مختص متیلاسیون (MS-PCR) آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد ژن NANOG در ۹۴/۷ درصد نمونه‌های توموری و ۱۰۰ درصد نمونه‌های سالم، ژن RASSF1A در ۹/۵ درصد بافت‌های توموری و صفر درصد بافت‌های سالم، ژن SFN در ۱۴/۳ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم، ژن CASP8 در ۳۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم، ژن WIF1 در ۸۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم و ژن CTSL2 در ۲۸/۶ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم متیله بود. آنالیز داده‌ها توسط آزمون فیشر ارتباط معنی‌داری بین این نتایج نشان نداد ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دادند که وضعیت متیلاسیون ۶ ژن برای افتراق دو گروه سرطانی و نرمال کافی نبوده است. این مطالعه مشکلات متدولوژی (MSPCR) استفاده شده در ارزیابی مارکرهای متیلاسیون برای ارزیابی وضعیت متیلاسیون به عنوان بیومارکرهای تشخیصی را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: متیلاسیون DNA، سرطان پستان، MSPCR، ژن‌های SFN، RASSF1A، NANOG1، CTSL1 و WIF1، CASP8

* تهران، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان در بین زنان و دومین عامل مرگ و میر زنان است (۱). در ایران نیز سرطان پستان عمومی ترین سرطان در بین زنان است، ۲۴/۴ درصد کل سرطان های زنان در ایران را سرطان پستان تشکیل می دهد. بیشترین شیوع سرطان پستان در ایران در سنین ۴۰ تا ۴۹ سال است و بیش از ۳۰ درصد بیماران زیر ۳۰ سال سن دارند (۲ و ۳).

ماموگرافی رایج ترین روش تشخیص سرطان پستان است و تشخیص سرطان توسط این تست، آمار مرگ و میر حاصل از سرطان پستان را کاهش داده است. با این وجود غربالگری ماموگرافی به خصوص در زنان جوان (کمتر از ۵۰ سال) نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب نشان می دهد که باعث درمان اضافی می شود.

حساسیت ماموگرافی در زنان ۵۰ ساله و بیشتر، ۶۸ تا ۹۰ درصد است، در حالی که این میزان در زنان ۴۰ تا ۴۹ ساله بین ۶۲ تا ۷۶ درصد تخمین زده می شود.

بنابراین ماموگرافی بیشتر متوجه زنان مسن تر (۵۰ تا ۶۹ سال) می شود. اما ۲۰ درصد سرطان های پستان در زنان جوان تر از ۵۰ سال رخ می دهد که سرطان تهاجمی تر و با رشد بیشتر دارند (۴). بنابراین نیاز به روش دیگری برای غربالگری است که بتواند در کنار ماموگرافی و به عنوان روشی کمتر تهاجمی و ارزان، فرایند غربالگری را بهبود بخشد.

الگوهای متیلاسیون DNA و ساختار اجزای کروماتین به شدت مرتبط با تغییرات در وضعیت اپی ژنوم هستند که بیان ژن را تنظیم می کنند. مطالعات نشان داده اند که الگوی متیلاسیون DNA در سلول های توموری دارای تفاوت های اساسی نسبت به بافت نرمال است. همچنین فعالیت نادرست DNA متیل ترانسفرازها نیز در سلول های سرطانی به اثبات رسیده است (۵ و ۶).

الگوهای متیلاسیون DNA علاوه بر تشخیص زودهنگام می توانند به طور بالقوه به عنوان بیومارکر برای پیش بینی خطر ابتلا، رده بندی انواع سرطان پستان، پیش آگهی بیماری و پاسخ به درمان استفاده شوند (۷). دو تغییر عمده در الگوی متیلاسیون DNA در سرطان پستان شامل هایپومتیلاسیون منطقه ای ژن های اختصاصی و هایپومتیلاسیون عمومی می باشند. هایپومتیلاسیون، ژن های تنظیم کننده رشد را خاموش می کند و باعث رشد خارج از کنترل می شود در حالی که هایپومتیلاسیون به فعالیت ژن های مورد نیاز برای متاستاز می انجامد (۸).

مطالعات قبلی متیلاسیون ژن هایی مانند ژن های درگیر در تنظیم چرخه سلولی (p14ARF, p16INK4A, p15, p15, DAPK, CCDN2), ترمیم DNA (MGMT, hMLH1), متابولیسم زنبوبیوتیک (IGSTP)، انتقال پیام (ER β , APC, RAR β 2) و چسبندگی و متاستاز (CDH13, CDH1) را نشان داده است (۹-۱۱). این تغییرات در مراحل اولیه سرطان اتفاق می افتند که نشان می دهد متیلاسیون DNA می تواند بیومارکری در تشخیص زودهنگام این بیماری باشد.

در این مطالعه متیلاسیون ۶ ژن NANOG1, RASSF1A, SFN, CASP8 و WIF1 و CTSL2 در نمونه های توموری و بافت سالم افراد مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. NANOG1 فاکتور رونویسی را کد می کند که در حفظ ویژگی خودسازی و چندتوانی سلول های بنیادی جنینی عمل می کند (۱۲-۱۴)، ژن RASSF1A یک ژن سرکوبگر تومور است (۱۵ و ۱۶)، ژن SFN در تنظیم چرخه سلولی (۱۷)، ژن CASP8 در آپوپتوز و بلوغ سیتوکین ها (۱۸)، ژن Ctsl1 در تخریب پروتئین های داخل سلولی و خارج سلولی

نقش دارد (۱۹) و ژن WIF1 پروتئینی را کد می‌کند که مهار کننده مسیر پیام رسانی WNT است (۲۰).

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، بافت توموری از ۲۱ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۲۱ نمونه بافت سالم مورد بررسی قرار گرفت. ۱۵ نمونه از این ۲۱ نمونه با تأیید کمیته اخلاق (IRB) دانشگاه علوم پزشکی بابل گردآوری و ۶ نمونه از بانک بافت سرطان ایران، واقع در بیمارستان امام خمینی ایران خریداری شد. DNA این بافت‌ها با استفاده از کیت استخراج AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit شرکت Bioneer استخراج شد. سپس DNA در معرض سدیم بیسولفیت قرار گرفت و بعد آزمایش MSPCR انجام شد. مرحله تیمار با سدیم بیسولفیت، سیتوزین غیرمتبله را در DNA به یوراسیل تبدیل می‌کند. سپس تست PCR برای تشخیص وضعیت متیلاسیون در منطقه‌ی مورد نظر انجام می‌شود.

برای انجام این مرحله محلول بی‌سولفیت با اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر آب به یک واحد پودر بی‌سولفیت به دست آمد. سپس ۸۵ میکرولیتر محلول بی‌سولفیت و ۳۵ میکرولیتر محلول محافظ DNA به محلول حاوی DNA اضافه شد. تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری حاوی ۱-۲ میکروگرم DNA، ۸۵ میکرولیتر مخلوط بی‌سولفیت، ۳۵ میکرولیتر بافر محافظت کننده DNA و آب مقطر فاقد RNAase آماده شد و محتویات هر میکروتیوب کاملاً مخلوط شد. سپس میکروتیوب‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر و سپس سانتریفوژ گذاشته شد. بافر BL شامل ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Carrier RNA به هر نمونه اضافه شد و سپس ترکیب حاصل در میکروتیوب‌های حاوی ستون فیلتردار به مدت ۱ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد.

۵۰۰ میکرولیتر بافر BD به هر ستون اضافه شد و بعد از سانتریفوژ مجدد ۵۰۰ میکرولیتر بافر BW به هر ستون اضافه گردید. در روش MSPCR این DNA به صورت الگو در واکنش PCR استفاده می‌شود. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر این ۶ ژن در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR در ۴۰ سیکل انجام شد. شرایط دمایی این واکنش عبارت بود از: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، تکرار ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۵۰ ثانیه در ۵۵/۵ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه و طول‌سازی نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه صورت گرفت. بعد از انجام واکنش PCR، الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد انجام شد.

آنالیزهای آماری

داده‌های مربوط به نمونه‌ها جمع‌آوری و معنی‌دار بودن یا نبودن آنها سنجیده شد. آنالیز آماری داده‌ها با آزمون Fisher انجام شد. نتایج با $P < 0.05$ به عنوان نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شد.

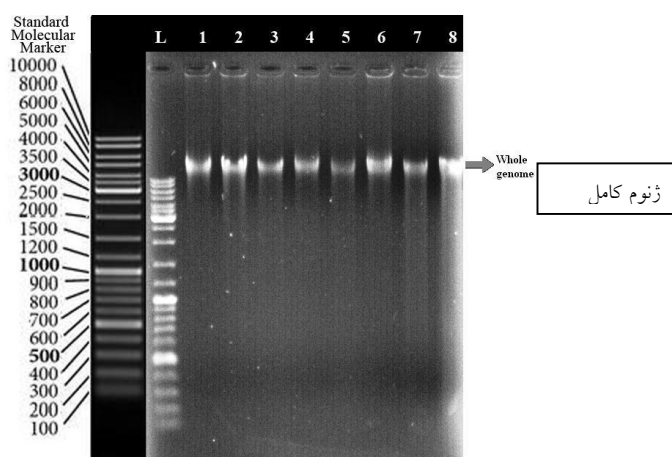
یافته‌ها

۲۱ نمونه بافت توموری و ۲۱ نمونه بافت سالم مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA از این بافت‌ها کمیت و کیفیت DNA به وسیله نانودراپ و ژل آگارز سنجیده شد (شکل ۱). وضعیت متیلاسیون در پروموتور ژن‌های WIF1، CASP8، SFN، RASSF1A، CTSL2 در این بافت‌ها از طریق تکنیک MSPCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). در شکل ۲ نمونه‌های ژل آگارز از ۴ ژن آورده شده است. محصول PCR هر ۶ ژن در جدول ۱ ذکر گردیده است.

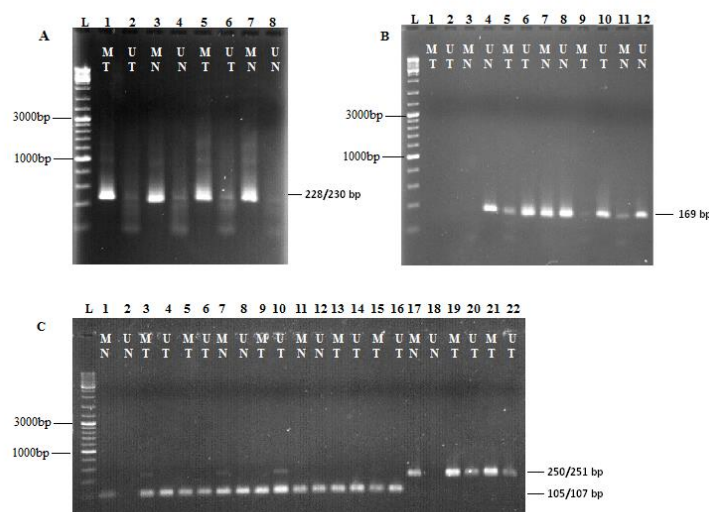
نتایج MSPCR برای این ۶ ژن و آنالیز آنها توسط آزمون فیشر ارتباط معنی‌داری بین نتایج نشان نداد (جدول ۲).

جدول (۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در MSPCR ۶ ژن NANOG, RASSF1A, SFN, CASP8, CTSL2, WIF1		
اسامی ژنها	توالی (5' → 3')	محصول PCR(bp)
NANOG(M)-F	TTAGGTTGGAGTATAGTGGCGC	۲۲۸
NANOG(M)-R	CAATAAATTAACCAACGTAACAAACGA	۲۲۸
NANOG(U)-F	TTTAGGTTGGAGTATAGTGGTGTGA	۲۳۰
NANOG(U)-R	CCAATAAATTAACCAACATAACAAACA	۲۳۰
RASF1A(M)-F	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	۱۶۹
RASSF1A(M)-R	GCTAACAAACGCGAACCG	۱۶۹
RASSF1A(U)-F	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTAG	۱۶۹
RASSF1A(U)-R	CACTAACAAACACAAACCAAG	۱۶۹
SFN M(F)	TGGTAGTTTTATGAAAGGCGTC	۲۵۰
SFN(R)	CCTCTAACCGCCACCACG	۲۵۰
SFN U(F)	ATGGTAGTTTTATGAAAGGTGTT	۲۵۱
SFN U(R)	CCCTCTAACCCACCACCA	۲۵۱
Caspase8 M(F)	TGTTGTTGGGTAACGTATCGA	۱۰۵
Caspase8 M(R)	CCCTACTTAACCTAACCCTACTCGAC	۱۰۵
Caspase8 U(F)	TTGTTGTTGGGTAATGTATTGA	۱۰۷
Caspase8 U(R)	CAACCCTACTTAACCTAACCCTACTCA	۱۰۷
CTSL2 M(F)	TTTGTGGGTGAAGTCGGATCG	۱۳۵
CTSL2 M(R)	GAACCGAAACAAACAACTCCCG	۱۳۵
CTSL2 U(F)	TTTGTGGGTGAAGTTGGATTG	۱۳۵
CTSL2 U(R)	GAACCAAAACAAACAACTCCCA	۳۵
WIFI M(F)	CGTTTTATTGGGCGTATCG	۱۴۴
WIFI M(R)	ACTAACGCGAACGAAATACGA	۱۴۴
WIFI U(F)	GGGTGTTTTATTGGGTGTATTGT	۱۴۵
WIFI U(R)	AAAAAACTAACACAAACAAATACAAAC	۱۴۵

جدول (۲) آنالیز آماری داده‌های متیلاسیون ژن‌های NANOG ,RASSF1A ,SFN ,CASP8 ,WIF1 ,CTSL2 (UN: نامعلوم، M: حالت متیله، U: حالت غیر متیله، M/U: حالت متیله و غیر متیله همزمان)												
مقدار P	گروه‌ها	بافت نرمال (۱۹ نمونه)					بافت تومور (۲۱ نمونه)					نام ژن‌ها
		جمع	UN (نامعلوم)	M (حالت متیله)	U (حالت غیر متیله)	M/U (حالت متیله و غیر متیله همزمان)	جمع	UN (نامعلوم)	M (حالت متیله)	U (حالت غیر متیله)	M/U (حالت متیله و غیر متیله همزمان)	
۱	M vs U	۱۹	۳	۱۶	۰	-	۲۱	۲	۱۸	۰	۱	NANOG
۱	M vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۱	U vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۲۲	M vs U	۱۹	۱	۰	۱۴	۴	۲۱	۰	۲	۱۱	۸	RASSF1A
۱	M vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۲۹	U vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۲۶	M vs U	۱۹	۱	۵	۱	۱۲	۲۱	۰	۳	۴	۱۴	SFN
۰/۶۹	M vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
0/۳۷	U vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۲۳	M vs U	۱۹	۲	۴	۰	۱۳	۲۱	۱	۶	۵	۹	CASP8
۰/۴۵	M vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۰۴	U vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۱	M vs U	۱۹	۱	۵	۷	۶	۲۱	۱	۰	۱۶	۴	WIF1
۰/۶	M vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۲۹	U vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۲۲	M vs U	۱۹	۲	۴	۱۱	۲	۲۱	۰	۶	۱۳	۲	CTSL2
۱	M vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	
۰/۲۹	U vs M/U		-	-	-	-		-	-	-	-	



شکل (۱) نمونه DNA استخراج شده از بافت. L: مارکر DNA، چاهک‌های ۱-۴ نمونه‌های بافت تومور، چاهک‌های ۵-۸ نمونه‌های بافت سالم



شکل (۲) نمونه آگارز ژل از محصولات MSPCR در تست متیلاسیون نمونه‌های بافت تومور و نرمال برای چهار ژن *SFN*, *CASP8*, *RASSF1A*, *NANOG*.
 (A) محصول MSPCR ژن *NANOG* (طول محصول PCR در حالت متیله ۲۲۸ bp و در حالت غیرمتیله ۲۳۰ bp است) (B) محصول MSPCR ژن *RASSF1A* (طول محصول PCR در هر دو حالت متیله و غیرمتیله ۱۶۹ bp است). (C) محصول MCPCR دو ژن *SFN* و *CASP8*. ۱۶ چاهک اول مربوط به ژن *SFN* و ۶ چاهک بعدی مربوط به ژن *CASP8* است. (طول محصول PCR برای ژن *SFN* در حالت متیله ۲۵۰ bp و در حالت غیرمتیله ۲۵۱ bp و برای ژن *CASP8* در حالت متیله ۱۰۵ و در حالت غیرمتیله ۱۰۷ bp است). L: مارکر M: نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر مخصوص حالت متیله U: نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر مخصوص حالت غیرمتیله N: نمونه‌های مربوط به بافت نرمال T: نمونه‌های مربوط به بافت توموری

بحث

پستان نشان داده‌اند و بر اهمیت این موضوع در تشخیص زودهنگام سرطان تأکید کرده‌اند (۲۵-۲۱). فرگوسن (Ferguson) و همکاران با روش SAGE نشان دادند بیان ژن (σ 14-3-3) *SFN* در سلول‌های سرطان پستان ۷ برابر کمتر از سلول‌های اپی تلیال در

مطالعات بسیاری تغییرات متیلاسیون ژن‌های مختلف مانند *ESR1*, *RAR-B2*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *APC*, *CyclinD2*, *E-cad*, *RAR-β*, *14-3-3*, *HIN-1*, *Twist* و غیره را در بیماران مبتلا به سرطان

بافت سالم پستان است و این در حالی است که تغییرات ژنتیکی در این ژن مانند از دست رفتن هتروزیگوسیتی تنها در یک بیستم موارد و جهش در هیچ یک از موارد دیده نشد. تیمار رده‌های سلولی فاقد بیان با 5-azadeoxycytidine با متیلاسیون پروموتور و بیان مجدد SFN (14-3-3) همراه بود (۲۶).

زوریتا (Zurita) و همکاران با استفاده از تکنیک QMSP و BSP متیلاسیون ژن SFN (14-3-3) را در گروهی از بیماران سرطان پستان که در مراحل اولیه تحت درمان قرار گرفته‌اند و در حال حاضر بدون علائم متاستاز هستند و گروهی که در مراحل پیشرفته بیماری هستند مقایسه کردند و نشان دادند که سطح متیلاسیون SFN (14-3-3) در گروهی که دچار متاستاز شده‌اند بیشتر از افراد سالم و بیماران مراحل اولیه است (۲۷). ماهاوچ (Mhawech) و همکاران نشان دادند، کاهش بیان ژن SFN (14-3-3) در سرطان تخمدان، پروستات و اندومتریال با متیلاسیون جزایر CpG در پروموتور این ژن همراه است (۲۸).

وا (Wu) و همکاران، متیلاسیون CASP8 و MASPIN را در ۴ رده سلولی سرطان پستان HCC1937، MCF-7، MDA-MB231، SKBR3 دو رده سلولی غیر توموری MCF12A و MCF10 توسط MSPCR بررسی و مقایسه کردند. نتایج حاکی از کاهش بیان هر دو ژن در اثر متیلاسیون پروموتور در هر ۴ رده سرطانی بود، در حالی که دو رده غیر سرطانی غیر متیله بودند (۲۹).

هاپکینز (Hopkins) و همکاران نیز وضعیت متیلاسیون پروموتور ۳ ژن TRAI-R1، CASP8 و FAS را در تومور SCLC با روش MSPCR بررسی کرده و مشاهده کردند، متیلاسیون حداقل دو تا از این ژن‌ها در ۷۲ درصد تومورهای SCLC دیده می‌شود و این

متیلاسیون همراه با کاهش بیان ژن‌های مربوطه می‌باشد، آنها همچنین نشان دادند تیمار این تومورها با 5-azadeoxycytidine تا حدی موجب بازگشت بیان این ژن‌ها شد (۳۰).

وانگ (Wang) و همکاران در بررسی تغییرات اپی ژنتیک ژن‌های چند توانی در سرطان کبد و چند رده سلولی سرطانی نشان دادند که در مقایسه با سلول‌های نرمال کبد (L02) که ۳۹ درصد متیلاسیون ژن NANOG را نشان می‌دهد، این ژن در رده‌های سلولی سرطان کبد (97L، 97H، PLC) هایپومتیله شده است (به ترتیب ۱۸، ۸ و ۱۴ درصد). همچنین آنها مشاهده کردند متیلاسیون NANOG در سلول‌های سرطانی خون K-۵۶۲، K-۳۹ درصد بود که بیش از دو برابر نسبت به سلول‌های نرمال خون کاهش داشت (۸۱ درصد). در این مطالعه رده‌های سلولی دیگر سرطان‌ها متیلاسیون متفاوت پروموتور NANOG را نشان دادند. AGS، HCT116، MCF7 و Hela به ترتیب ۹۱، ۹۲، ۷۱ و ۲۵ درصد متیله بودند (۳۱).

باربی (Burbee) و همکاران در سال (۲۰۰۱) متیلاسیون پروموتور ژن RASSF1A را در ۲۲ رده سلولی سرطان پستان و در ۳۹ بافت توموری پستان بررسی کردند. آنها در ۶۴ درصد رده‌های سلولی سرطان پستان و در ۴۹ درصد بافت‌های توموری پستان، هایپرمتیلاسیون ژن RASSF1A را شناسایی کردند (۳۲).

دامان (Dammann) و همکاران در یک مطالعه مشاهده کردند جزایر CpG پروموتور ژن RASSF1A در ۵ رده سلولی سرطان پستان (MCF7، MDA-MB-157، MDA-MB-231، T47D، ZR75-1) کاملاً متیله بودند و در ۶۲ درصد تومورهای ۴۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان نیز پروموتور این ژن متیله بود (۳۳).

ویک (Veeck) و همکاران در سال ۲۰۰۹ الگوی

متیلاسیون ژن WIF1 را در نمونه‌های بیماران سرطان پستان مطالعه کردند، یافته‌های آنها حاکی از وجود متیلاسیون در راه‌انداز این ژن در ۶۳/۳ درصد از نمونه‌ها بود (۳۴).

نتایج بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های NANOG1، CASP8، SFN، RASSF1A و CTSL2 در مطالعه حاضر نشان داد، ژن NANOG در ۹۴/۷ درصد نمونه‌های توموری و ۱۰۰ درصد نمونه‌های سالم، ژن RASSF1A در ۹/۵ درصد بافت‌های توموری و صفر درصد بافت‌های سالم، ژن SFN در ۱۴/۳ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم، ژن CASP8 در ۳۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم، ژن WIF1 در ۸۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم و ژن CTSL2 در ۲۸/۶ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم، متیله بود، که هیچ‌کدام از این نتایج معنی‌دار نبود.

با وجود اینکه مطالعات قبلی تغییر در وضعیت متیلاسیون این ۶ ژن را در سرطان‌های مختلف نشان می‌دهد (۲۱-۳۴)، اما در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری میان میزان متیلاسیون این ژن‌ها و سرطان پستان دیده نشد. این امر می‌تواند به دلیل وجود مشکلات تکنیکی در این روش باشد. از جمله اینکه بافت‌هایی که از آنها DNA استخراج شده ممکن است حاوی سلول‌های توموری و سالم باشند. در نتیجه پس از استخراج DNA مخلوطی از DNA سلول‌های سالم و توموری به دست می‌آید که می‌تواند دارای پروموتور متیله و یا غیرمتیله‌ی ژن مورد نظر باشد. هتروژنوس بودن متیلاسیون برخی ژن‌ها در مطالعات قبلی دیده شده است (۳۵-۳۸). دلیل دیگر می‌تواند مربوط به هتروژنوس بودن آلل‌های این ژن‌ها برای متیلاسیون

پروموتور باشد. علاوه بر این، در یک بافت تومور، سلول‌های توموری در مراحل متفاوت سرطانی شدن قرار دارند. ممکن است تعدادی از سلول‌ها از نظر زمانی زودتر وارد مسیر سرطانی شدن شوند و بعد از آن در اثر پیشرفت سرطان، سلول‌های مجاور نیز فرایند سرطانی شدن را آغاز کنند. در نتیجه سلول‌های اولیه نسبت به سلول‌های مجاور در مراحل پیشرفته‌تر سرطان هستند. سلول‌هایی که در مراحل مختلف سرطان هستند می‌توانند متیلاسیون متفاوتی داشته باشند و این در چندین مطالعه نشان داده شده است (۴۳-۳۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه به محققین حوزه تشخیص زودرس سرطان در کشور نشان می‌دهد تا در طراحی مطالعه و استفاده از نمونه‌های بافتی بسیار دقت کنند، چرا که مطالعه وضعیت متیلاسیون با روش MSPCR می‌تواند با مشکلاتی مواجه شود که در بالا توضیح داده شد.

سپاس و قدردانی

این مقاله بخشی از مطالعه‌ای است که توسط گرانت تحقیقاتی شماره CRP/13/001 از طرف مرکز بین‌المللی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (ICGEB) به نویسنده مسئول این مقاله در سال ۲۰۱۳ تعلق گرفته و تحت حمایت مالی آن سازمان قرار داشت. همچنین از آقای آروتین غریبیان برای پیشنهادهاشان در مراحل مختلف انجام پروژه قدردانی می‌شود. نتایج این مطالعه در قالب پایان‌نامه دانشجویان ارشد در پژوهشگاه ارایه شد.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسنده بیان نشده است.

References:

1. Pal R, Srivastava N, Chopra R, et al. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. *Mol Cancer* 2010; 9: 303-9.
2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
3. Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, et al. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(1): 367-70.
4. Debal M, Franken S, Heukamp LC, et al. Identification of specific nuclear structural protein alterations in human breast cancer. *J Cell Biochem* 2011; 112(11): 3176-84.
5. Daniel FI, Cherubini K, Yurgel LS, et al. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* 2011; 117(4): 677-87.
6. Pogribny IP. Epigenetic events in tumorigenesis: putting the pieces together. *Exp Oncol* 2010; 32(3): 132-6.
7. Van De Voorde L, Speeckaert R, Van Gestel D, et al. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer. *Mutat Res* 2012; 751(2): 304-25.
8. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1187-97.
9. Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64(13): 4442-52.
10. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Ine J Cancer* 2003; 107(6): 970-5.
11. Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16): 5349-54.
12. Ahmed IA, Pusch CM, Hamed T, et al. Epigenetic alterations by methylation of RASSF1A and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 199(2): 96-100.
13. Bai L, Deng X, Li Q, et al. Down-regulation of the cavin family proteins in breast cancer. *J Cell Biochem* 2012; 113(1): 322-8.
14. Jeter CR, Badeaux M, Choy G, et al. Functional evidence that the selfrenewal gene NANOG regulates human tumor development. *Stem Cells* 2009; 27(5): 993-1005.
15. Brooks JD, Cairns P, Shore RE, et al. DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: Results of a nested case-control study. *Cancer Epidemiol* 2010; 34(6): 717-23.
16. Brooks J, Cairns P, Zeleniuch-Jacquotte A. Promoter methylation and the detection of breast cancer. *Cancer Causes Control* 2009; 20(9): 1539-50.
17. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(12): 931-43.
18. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End". *IUBMB Life* 2000; 50(2): 85-90.
19. Santamaría I, Velasco G, Cazorla M, et al. Cathepsin L2, A novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58(8): 1624-30.
20. Shepelev MV, Korobko EV, Korobko IV. WIF1: perspectives of application in oncology. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 2005; (4): 3-7.
21. Bae YK, Shim YR, Choi JH, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and plasma of breast cancer patients. *Cancer Res Treat* 2005; 37(4): 233-40.
22. Bardowell SA, Parker J, Fan C, et al. Differential methylation relative to breast cancer subtype and matched normal tissue reveals distinct patterns. *Breast Cancer Res Treatment* 2013; 142(2): 365-80.
23. Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the cpG island of Ras

- association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61(7): 3105-9.
24. Martínez-Galán J, Torres B, Del Moral R, et al. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biol Therapy* 2008; 7(6): 958-65.
25. Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M, et al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR β 2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132(1): 165-73.
26. Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, et al. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 σ locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(11): 6049-54.
27. Zurita M, Lara PC, del Moral R, et al. Hypermethylated 14-3-3-sigma and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. *BMC Cancer* 2010; 10: 217.
28. Mhawech P, Benz A, Cerato C, et al. Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Mod Pathol* 2005; 18(3): 340-8.
29. Wu Y, Alvarez M, Slamon DJ, et al. Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. *BMC Cancer* 2010; 10: 32.
30. Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, et al. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Diff* 2003;10(3): 356-64.
31. Wang XQ, Ng RK, Ming X, et al. Epigenetic regulation of pluripotent genes mediates stem cell features in human hepatocellular carcinoma and cancer cell lines. *PLoS One* 2013; 8(9): e72435.
32. Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61(7): 3105-9.
33. Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(9): 691-9.
34. Veek J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(1): 5-17.
35. Zare M, Rastgar Jazii F, Alivand MR, et al. Qualitative analysis of Adenomatous Polyposis Coli promoter: hypermethylation, engagement and effects on survival of patients with esophageal cancer in a high risk region of the world, a potential molecular marker. *BMC Cance* 2009; 9: 24.
36. Rasti M, Arabsolghar R, Azmand S. Methylation Status of Tumor-Related Genes in Mcf7, Mda-Mb-468 and Bt-474 Breast Cancer Cell Lines with Different Estrogen Receptor Status. *Middle East J Cancer* 2014; 5(4): 207-13.
37. 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.
38. Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, et al. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61(3): 900-2.
39. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1187-97.
40. Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65(4): 1141-5.
41. Kloten V, Becker B, Winner K, et al. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and

- RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Res* 2013; 15(1): R4.
42. Mirza S, Sharma G, Parshad R, et al. Clinical Significance of Promoter Hypermethylation of ERb and RARb2 in Tumor and Serum DNA in Indian Breast Cancer Patients. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(9): 3107-15.
43. 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): 809-18. (Persian)

Original Article

Methylation Status of *NANOG1*, *RASSF1A*, *SFN*, *CASP8*, *WIF1*, *CTSL2* Genes in Iranian Breast Cancer Patients

A. Motevalizadeh Ardekani ^{1*}, M. Shirani ¹, A. Hashemi ¹, Z. Basiri ¹,
Y. Rahmati ¹, N. Nikbakhsh ², S. Edrisi ², S. Mohammadganji ¹

¹ Department of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

² Cancer Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received 20 Oct, 2015 Accepted 23 Jan, 2016)

Abstract

Background: Mammographic screening to diagnose the breast cancer shows false-negative and false-positive results in young women and therefore a non-invasive and low cost method is needed, to diagnose the breast cancer in the early stages. DNA methylation changes are the most common molecular changes in human cancers and including breast cancer. Therefore, The pattern of tissues methylation can be used in the early diagnosis of cancer. Also similar methylation patterns found in tumors and in plasma shows potential application of molecular detection of breast cancer, based on blood. The aim of this study was to assess the promoter methylation for the clinical diagnosis of breast cancer.

Material and Methods: To examine the promoter methylation 21 tumor tissues and 21 normal tissues have been studied for clinical diagnosis of breast cancer. 6 gene methylation status (*NANOG1*, *RASSF1A*, *SFN*, *CASP8*, *WIF1* and *CTSL2*) was analyzed by methylation specific PCR (MS-PCR).

Results: The results show that *NANOG* gene was methylated in 94.7% of tumor specimen and 100% of normal specimen, *RASSF1A* gene was methylated in 9.5% of tumor specimen and 0% of normal specimen, *SFN* gene was methylated in 14.3% of tumor specimen and 27.8% of normal specimen, *CASP8* gene was methylated in 30% of tumor specimen and 23.5% of normal specimen, *WIF1* gene was methylated in 80% of tumor specimen and 27.8% of normal specimen, *CTSL2* gene was methylated in 28.6% of tumor specimen and 23.5 % of normal specimen were methylated. Data analysis did not show a significant relationship between these results. ($P > 0.05$).

Conclusion: The results of this study demonstrate that 6 gene methylation status was not enough to differentiate between the cancer and normal groups. This study demonstrates the methodological problems (MS PCR) which was used to assess the methylation markers to evaluate the methylation status as diagnostic biomarkers.

Key words: DNA methylation, breast cancer, MS-PCR, *NANOG1*, *RASSF1A*, *SFN*, *CASP8*, *WIF1*, *CTSL2* genes

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Motevalizadeh Ardekani A, Shirani M, Hashemi A, Basiri Z, Rahmati Y, Nikbakhsh N, Edrisi S, Mohammadganji S. Methylation Status of NANOG1, RASSF1A, SFN, CASP8, WIF1, CTSL2 Genes in Iranian Breast Cancer Patients. Iran South Med J 2017; 19(6): 940-950.

Copyright © 2017 Motevalizadeh Ardekani, et al. 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 Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran; E-mail: Ardekani@nigeb.ac.ir.

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>