



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

علی متولی‌زاده اردکانی^{۱*}، مهسا شیرانی^۱، احمد هاشمی^۱، زهره بصیری^۱، یزدان رحمتی^۱،
نوین نیک‌بخش^۲، سحر ادریسی^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 یافته شده در نمونه‌های توموری و در پلاسمما، کاربرد بالقوه شناسایی مولکولی سرطان پستان، بر پایه خون را نشان می‌دهد. هدف از این بررسی ارزیابی قابلیت متیلاسیون پرومотор برای تشخیص بالینی سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی متیلاسیون پرومotor برای تشخیص بالینی سرطان پستان ۲۱ بافت توموری و ۲۱ بافت نرم‌الموارد مطالعه قرار گرفتند. وضعیت متیلاسیون ۶ ژن (SFN، RASSF1A، NANOG1، CASP8، WIF1 و CTSL2) با استفاده از روش PCR مخصوص 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 نرم‌الموار کافی نبوده است. این مطالعه مشکلات متداول‌گزین (MSPCR) استفاده شده در ارزیابی مارکرهای متیلاسیون برای ارزیابی وضعیت متیلاسیون به عنوان بیومار کرهای تشخیصی را نشان می‌دهد.

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

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

مقدمه

الگوهای متیلاسیون DNA علاوه بر تشخیص زودهنگام می‌توانند به طور بالقوه به عنوان بیومارکر برای پیش‌بینی خطر ابتلا، رده‌بندی 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 منطقه‌ای ژن‌های اختصاصی و هایپومتیلاسیون عمومی می‌باشند. هایپرمتیلاسیون، ژن‌های تنظیم کننده رشد را خاموش می‌کند و باعث رشد خارج از کنترل می‌شود در حالی که هایپومتیلاسیون به فعالیت ژن‌های مورد نیاز برای متاستاز می‌انجامد (۸).

مطالعات قبلی متیلاسیون ژن‌هایی مانند ژن‌های درگیر در تنظیم چرخه سلولی (p14ARF، p16INK4A)، ترمیم MGMT، DAPK، CCDN2، p15، hMLH1، متابولیسم زنوپیوتیک (GSTP1)، انتقال پیام RAR β 2 (ER β ، APC)، چسبندگی و متاستاز (CDH1)، CDH13، CDH1) را نشان داده است (۹-۱۱). این تغییرات در مراحل اولیه سرطان اتفاق می‌افتد که نشان می‌دهد متیلاسیون DNA می‌تواند بیومارکری در تشخیص زودهنگام این بیماری باشد. در این مطالعه متیلاسیون ۶ ژن NANOG1 و CTS1L در RASSF1A و SFN، CASP8 و CTS1L در نمونه‌های توموری و بافت سالم افراد مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. NANOG1 فاکتور رونویسی را کد می‌کند که در حفظ ویژگی خودسازی و چندتوانی سلول‌های بنیادی جنینی عمل می‌کند (۱۲-۱۴)، ژن RASSF1A یک ژن سرکوبگر تومور است (۱۵ و ۱۶)، ژن SFN در تنظیم چرخه سلولی (۱۷)، ژن Ctsl1 در CASP8 آپوپتوز و بلوغ سیتوکین‌ها (۱۸)، ژن Ctsl1 در تخریب پروتئین‌های داخل سلولی و خارج سلولی

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان و دومین عامل مرگ و میر زنان است (۱). در ایران نیز سرطان پستان عمومی‌ترین سرطان در بین زنان است، ۲۴/۴ درصد کل سرطان‌های زنان در ایران را سرطان پستان تشکیل می‌دهد. 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 رایج‌ترین 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 می‌دهد که باعث درمان اضافی می‌شود. 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 ۷۶ تا ۶۲ درصد تخمین زده می‌شود. بنابراین ماموگرافی بیشتر متوجه زنان مسن تر (۵۰ تا ۶۹ سال) می‌شود. اما ۲۰ درصد سرطان‌های پستان در زنان جوان‌تر از ۵۰ سال رخ می‌دهد 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 اپیژنوم هستند که بیان ژن را تنظیم می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که الگوی متیلاسیون DNA در سلول‌های توموری دارای تفاوت‌های اساسی نسبت به بافت نرمال است. همچنین فعالیت نادرست DNA متیل ترانسفرازها نیز در سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده است (۵ و ۶).

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، ۵ ثانیه در ۵۵/۵ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه و طویل‌سازی 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 سنجدیده 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 نانودرایپ و ژل آگارز سنجدیده شد (شکل ۱). وضعیت متیلاسیون در پروموتور ژن‌های RASSF1A، SFN، CASP8 و WIF1 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).

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 AccuPrep Genomic DNA Extraction استخراج شد. سپس DNA در Kit شرکت Bioneer معرف سدیم بی‌سولفاتیت قرار گرفت و بعد آزمایش MSPCR انجام شد. مرحله تیمار با سدیم بی‌سولفاتیت، سیتوزین غیرمتیله را در DNA به یوراسیل تبدیل می‌کند. سپس تست PCR برای تشخیص وضعیت متیلاسیون در منطقه‌ی مورد نظر انجام می‌شود.

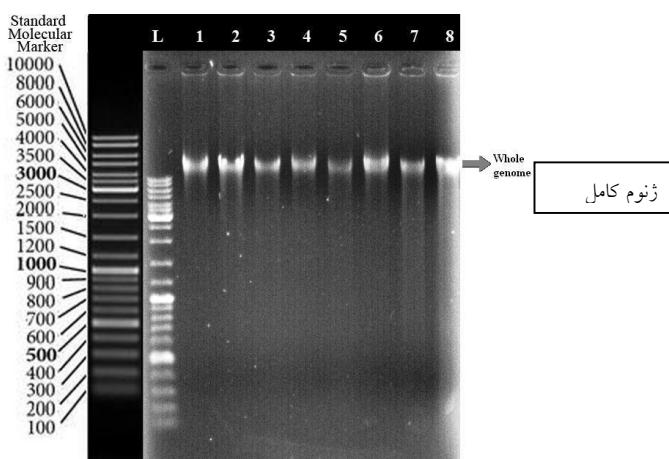
برای انجام این مرحله محلول بی‌سولفاتیت با اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر آب به یک واحد پوردر بی‌سولفاتیت به ۳۵ دست آمد. سپس ۸۵ میکرولیتر محلول بی‌سولفاتیت و ۱۲ میکرولیتر محلول محافظ DNA به محلول حاوی DNA اضافه شد. تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری حاوی ۱-۲ میکروگرم DNA، ۸۵ میکرولیتر محلول DNA و بی‌سولفاتیت، ۳۵ میکرولیتر 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 rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد.

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در **CASP8 .SFN .RASSF1A .NANOG .MSPCR**
CTSL2 .WIF1

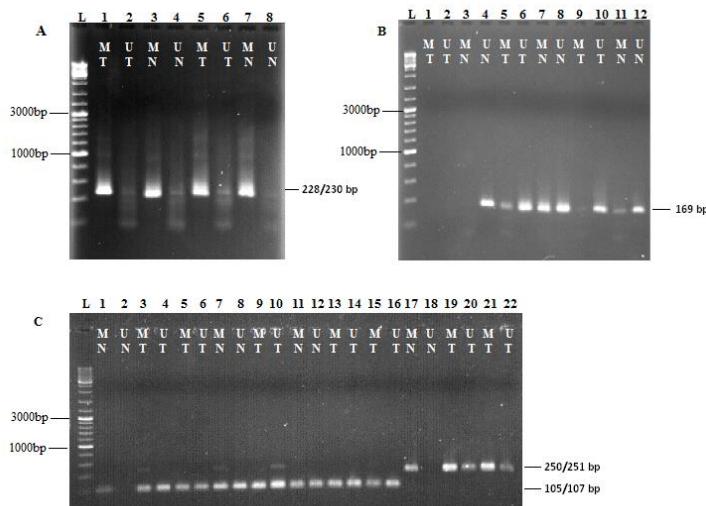
PCR(bp)	محصول	توالی (5' → 3')	اسامی ژن‌ها
۲۲۸		TTAGGTTGGAGTATAAGTGGCGC	NANOG(M)-F
۲۲۸		CAATAAATTAAAAACCGTAACAAACGA	NANOG(M)-R
۲۳۰		TTTAGGTTGGAGTATAAGTGGGTGTGA	NANOG(U)-F
۲۳۰		CCAATAAATTAAAAACCATAACAAACA	NANOG(U)-R
۱۶۹		GGGTTTGCAGAGCGCG	RASF1A(M)-F
۱۶۹		GCTAACAAACCGCGAACCG	RASSF1A(M)-R
۱۶۹		GGTTTGTGAGAGTGTGTAG	RASSF1A(U)-F
۱۶۹		CACTAACAAACACAAACCAAG	RASSF1A(U)-R
۲۵۰		TGGTAGTTTTATGAAAGGCGTC	SFN M(F)
۲۵۰		CCTCTAACCGCCCACACAG	SFN(R)
۲۵۱		ATGGTAGTTTTATGAAAGGCGTC	SFN U(F)
۲۵۱		CCCTCTAACCAACCCACCA	SFN U(R)
۱۰۵		TGTTGTTGGGTAAACGTATCGA	Caspase8 M(F)
۱۰۵		CCCTACTTAACCTAACCTACTCGAC	Caspase8 M(R)
۱۰۷		TTGTTGTTGGGTAAATGTATTGA	Caspase8 U(F)
۱۰۷		CAACCCACTTAACCTAACCTACTCA	Caspase8 U(R)
۱۳۵		TTTGTGGGTTGAAGTCGGATCG	CTSL2 M(F)
۱۳۵		GAACCGAAACAAACAACCTCCG	CTSL2 M(R)
۱۳۵		TTTGTGGGTTGAAGTTGGATTG	CTSL2 U(F)
۳۵		GAACCAAAACAAACAACCTCCA	CTSL2 U(R)
۱۴۴		CGTTTATTGGCGTATCG	WIFI M(F)
۱۴۴		ACTAACCGGAACGAAATACGA	WIFI M(R)
۱۴۵		GGGTGTTTATTGGGTGTATTGT	WIFI U(F)
۱۴۵		AAAAAAACTAACACAAACAAAATACAAAC	WIFI U(R)

جدول ۲) آنالیز آماری داده‌های متیلاسیون ژن‌های **CTSL2 .WIF1 .CASP8 .SFN .RASSF1A .NANOG**
(UN): نامعلوم، M: حالت متبیله، U: حالت غیر متبیله، M/U: حالت متبیله و غیر متبیله همزمان)

P مقدار	گروه‌ها	بافت نرم (۱۹ نمونه)						بافت تومور (۲۱ نمونه)						نام ژن‌ها
		جمع	UN (نامعلوم)	M (حالت متبیله)	U (حالت غیر متبیله)	M/U (حالت متبیله و غیر متبیله همزمان)	جمع	UN (نامعلوم)	M (حالت متبیله)	U (حالت غیر متبیله)	M/U (حالت متبیله و غیر متبیله همزمان)			
۱	M vs U	۱۹	۳	۱۶	۰	۰	۲۱	۲	۱۸	۰	۱	۱	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	۰	۰	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	۰	۰	SFN
۰/۶۹	M vs M/U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
۰/۳۷	U vs M/U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
۰/۲۳	M vs U	۱۹	۲	۴	۰	۱۳	۲۱	۱	۶	۵	۹	۰	۰	CASP8
۰/۴۵	M vs M/U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
۰/۰۴	U vs M/U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
۱	M vs U	۱۹	۱	۰	۷	۶	۲۱	۱	۰	۱۶	۴	۰	۰	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	۰	۰	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 محصول‌های MSPCR در تست متیلاسیون نمونه‌های بافت تومور و نرمال برای چهار ژن *SFN*, *CASP8*, *RASSF1A* و *NANOG*. (A) محصول *NANOG* MSPCR (طول محصول PCR در حالت متیله ۲۲۸ bp و در حالت غیرمتیله ۲۳۰ bp است) (B) محصول ژن *RASSF1A* (طول محصول PCR در هر دو حالت متیله و غیرمتیله ۱۶۹ bp است). (C) محصول *CASP8* و *SFN* و *MCPCCR* در ژن *CASP8* (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 bp و در حالت غیرمتیله ۱۰۷ bp است). L: مارکر Standard Molecular Marker. M: مارکر مخصوص حالت متیله. U: نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر مخصوص حالت غیرمتیله. T: نمونه‌های مربوط به بافت نرمال. N: نمونه‌های مربوط به بافت توموری.

پستان نشان داده‌اند و بر اهمیت این موضوع در تشخیص زودهنگام سرطان تأکید کرده‌اند (۲۱-۲۵). 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 تیال در

بحث

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

متیلاسیون همراه با کاهش بیان ژن‌های مربوطه می‌باشد، آنها همچنین نشان دادند تیمار این تومورها با ۵-azadeoxyctidine تا حدی موجب بازگشت بیان این ژن‌ها شد (۳۰).

وانگ (Wang) و همکاران در بررسی تغییرات اپیژنتیک ژن‌های چند تواني 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 (PLC, 97L, 97H) هایپومنیله شده است (به ترتیب ۱۸، ۸ و ۱۴ درصد). همچنین آنها مشاهده کردند متیلاسیون NANOG در سلول‌های سرطانی خون-K₅₆₂ 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 پرومومتر NANOG را نشان دادند. AGS، MCF7، HCT116 و Hela به ترتیب ۹۱، ۹۲، ۷۱ و ۲۵ درصد متیله بودند (۳۱).

باربی (Burbee) و همکاران در سال (۲۰۰۱) متیلاسیون پرومومتر 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 پرومومتر ژن RASSF1A در ۵ رده سلولی سرطان پستان (MCF7، MDA-MB-157، MCF7-ZR75-1، T47D، MDA-MB-231) کاملاً متیله بودند و در ۶۲ درصد تومورهای ۴۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان نیز پرومومتر این ژن متیله بود (۳۳).

ویک (Veeck) و همکاران در سال ۲۰۰۹ الگوی

بافت سالم پستان است و این در حالی است که تغییرات ژنتیکی در این ژن مانند از دست رفتن هتروزیگوستی تنها در یک بیستم موارد و جهش در هیچ یک از موارد دیده نشد. تیمار رده‌های سلولی فاقد بیان با ۵-azaCDR با متیلاسیون پرومومتر و بیان مجدد SFN (14-3-3 σ) همراه بود (۲۶).

зорیتا (Zurita) و همکاران با استفاده از تکنیک QMSP و BSP متیلاسیون ژن (σ SFN (14-3-3 σ) 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 در گروهی که دچار متاستاز شده‌اند (σ SFN(14-3-3 σ) بیشتر از افراد سالم و بیماران مراحل اولیه است (۲۷).

ماهاوچ (Mhawech) و همکاران نشان دادند، کاهش بیان ژن (σ SFN (14-3-3 σ) در سرطان تخمدان، پرومومتر و اندومتریال با متیلاسیون جزایر CpG در پرومومتر 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 و MCF10 و MCF12A توسط MSPCR بررسی و مقایسه کردند. نتایج حاکی از کاهش بیان هر دو ژن در اثر متیلاسیون پرومومتر در هر ۴ رده سرطانی بود، در حالی که دو رده غیر سرطانی غیر متیله بودند (۲۹).

هایپکینز (Hopkins) و همکاران نیز وضعیت متیلاسیون پرومومتر ۳ ژن TRAIL-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

پرومومتر 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 (۳۹-۴۳).

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 غربیان برای پیشنهادهایشان در مراحل مختلف انجام پژوهه 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.

متیلاسیون ژن WIF1 را در نمونه‌های بیماران سرطان پستان مطالعه کردند، یافته‌های آنها حاکی از وجود متیلاسیون در راهانداز این ژن در $63/3$ درصد از نمونه‌ها بود (۳۴).

نتایج بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های NANOG1، CASP8، SFN، RASSF1A و CTS12 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 $27/8$ درصد نمونه‌های سالم، ژن CASP8 در ۳۰ درصد نمونه‌های توموری و $23/5$ درصد نمونه‌های سالم، ژن WIF1 در ۸۰ درصد نمونه‌های توموری و $27/8$ درصد نمونه‌های سالم و ژن CTS12 در $28/6$ درصد نمونه‌های توموری و $23/5$ درصد نمونه‌های سالم، متیله بود، که هیچ‌کدام از این نتایج معنی دار 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 محلولی از سلول‌های سالم و توموری به دست می‌آید که می‌تواند دارای پرومومتر 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 هتروزیگوس بودن آلل‌های این ژن‌ها برای متیلاسیون

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.Debald 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 self-renewal 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 Cancer* 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 ER β and RAR β 2 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. Nikbakhtsh 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 showe 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, CTS2 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, Nikbakhtsh N, Edrisi S, Mohammadganji S. Methylation Status of *NANOG1*, *RASSF1A*, *SFN*, *CASP8*, *WIFI*, *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.