

بررسی وضعیت متیلاسیون ژن سرکوبگر تومور CKN2A در سرطان پستان تک گیر

صادق ولیان بروجنی: متخصص ژنتیک پزشکی، دانشیار ژنتیک، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک
ماندانا صداقت: فوق لیسانس زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه تهران، دانشکده زیست شناسی
ایثار نصیری: دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)
علی فرازمنند: استادیار دانشگاه تهران، گروه زیست شناسی
فریبرز مکاریان: فوق تخصص هماتولوژی، استادیار گروه داخلی، مرکز آموزشی درمانی سید الشهداء، دانشکده پزشکی اصفهان
مژگان عبدالمهدی: استادیار گروه داخلی، دانشکده پزشکی اصفهان

چکیده

مقدمه: ژن سرکوبگر تومور CKN2A پروتئینی را رمزگذاری می‌کند، که در مهار Cdk4/6 و کاهش سطح فسفریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما pRb نقش دارد. ژن CKN2A به وسیله ساز و کارهای ژنتیک و اپی‌ژنتیک مختلف مانند هیپرمتیلاسیون، غیر فعال می‌شود.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی فراوانی متیلاسیون ژن CKN2A در بیماران مبتلا به سرطان پستان در ایران، سطح متیلاسیون آگزون ۱ به وسیله دو روش PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) و PCR وابسته به آنزیم محدود کننده (REP) بررسی شد. **نتایج:** پس از بررسی ۶۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان تک گیر به وسیله MSP و REP، هیپرمتیلاسیون به ترتیب در ۲۹ درصد (۱۹/۶۵) و ۳۵ درصد (۲۳/۶۵) موارد یافت شد.

بحث: بررسی پیشینه پاتولوژی نمونه‌های بافت سرطانی بیماران نشان داد که غیرفعال شدن ژن CKN2A احتمالاً در مراحل اولیه بروز سرطان انجام می‌گیرد و یکی از عوامل اپی‌ژنتیک مؤثر در پیشرفت سرطان می‌باشد.

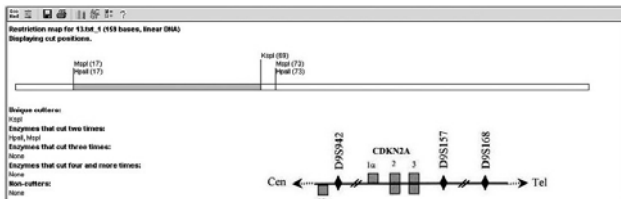
واژه های کلیدی: سرطان پستان، جمعیت ایران، متیلاسیون، ژن سرکوبگر تومور CKN2A، MSP، REP

مقدمه

شایع‌ترین سرطان‌ها در ایران بر اساس جمع کل مرد و زن به ترتیب شامل سرطان‌های پوست (۱۵/۷ درصد)، پستان (۱۵ درصد) و معده (۱۱ درصد) می‌باشند. در ایران سرطان پستان با فراوانی برابر ۱۵/۹ شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان است [۱]. اختلال در عملکرد طبیعی حداقل ۴ تا ۶ ژن به وسیله ساز و کارهای ژنتیک و اپی‌ژنتیک منجر به بروز سرطان پستان می‌گردد. این ژن‌ها در حفظ تعادل میان تکثیر، آپتوز و تمایز، تنظیم ظهور گیرنده‌های استروئیدی، اتصال سلول‌ها و رگ‌زایی نقش دارند [۲]. در اکثر موارد ابتلا به سرطان پستان (بیش از ۸۵ درصد) اختلال در الگوی متیلاسیون (تغییرات اپی‌ژنتیک) مشاهده می‌شود. یکی از تغییرات اپی‌ژنتیک اصلی که در تومورهای انسانی، سرکوب ظهور ژن‌ها به وسیله متیلاسیون جزایر CpG است، که در انتهای 5' بسیاری از ژن‌ها قرار دارند. جزایر CpG که در پروموتور یا اولین اگزون‌های ژن‌ها قرار دارند، معمولاً غیر متیله هستند. افزایش سطح متیلاسیون در این نواحی منجر به تأخیر در همانندسازی، متراکم شدن کروماتین و مهار آغاز رونویسی می‌گردد. اختلال در تنظیم الگوی متیلاسیون DNA در سلول‌های سرطانی منجر به افزایش سطح متیلاسیون جزایر CpG ژن‌های مؤثر در بروز سرطان می‌گردد. ژن‌های مؤثر در تنظیم چرخه تقسیم سلول از جمله ژن‌هایی هستند که اختلال در الگوی متیلاسیون ناحیه پروموتوری آنها، موجب کاهش ظهور ژن و بروز سرطان پستان می‌گردد [۳].

چرخه یاخته در یاخته‌های طبیعی و سرطانی به وسیله انواع مختلفی از مولکول‌های تنظیم کننده شامل سیکلین‌ها^۱، مهار کننده کینازهای وابسته به سیکلین^۲ (CDKI) و کینازهای وابسته به سیکلین^۳ (CDK) انجام می‌شود. پیشرفت چرخه یاخته از G1 به S به وسیله سیکلین D متصل به CDK4/6 القا می‌گردد. این مجموعه به وسیله گروهی از آنزیم‌های CDKI به نام مهار کننده کیناز وابسته به سیکلین نوع ۴ (INK4) غیر فعال می‌شود [۴]. خانواده ژن‌های مهار کننده تومور INK4 شامل INK4A، INK4B، INK4C و

شکل ۱- تعیین جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده حساس به متیلاسیون (KspI و HpaII) و غیر حساس به متیلاسیون (MspI) در ناحیه ۱۵۹ جفت بازی از اگزون ۱ ژن CKN2A (عدد دسترسی در GenBank: NT_008413) که در روش RE-PCR به وسیله پرایمرهای اختصاصی تکثیر می‌گردد. همانطوری که در شکل دیده می‌شود آنزیم‌های محدود کننده MspI و HpaII ایزوشیزومر هستند و جایگاه یکسانی را برش می‌دهند. تعیین جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده و مشخص ساختن ناحیه تکثیر شده به وسیله RE-PCR به وسیله نرم افزار CodonCode Aligner انجام گرفت. در بخش پائین شکل آرایش اگزون‌های ژن CKN2A نشان داده شده است.



پروتئین CKN2A به وسیله مهار مجموعه پروتئینی cyclinD-Cdk4/6 موجب توقف چرخه یاخته در فاز G0 یا G1 می‌گردد. مهار Cdk4/6 به وسیله CKN2A همچنین موجب کاهش سطح فسفریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما (pBb) می‌شود [۹]. ساز و کارهای غیر فعال کننده ژن CKN2A شامل جهش‌های نقطه‌ای، حذف‌های هموزیگوت و هیپرمتیلاسیون جزایر CpG در پروموتور و اگزون ۱ می‌باشند. هیپرمتیلاسیون اگزون ۱ CKN2A در سرطان‌های مختلف شایع بوده و به تنهایی می‌تواند منجر به آغاز تومورزایی گردد [۱۰ و ۱۱]. تغییرات اپی‌ژنتیک، ساز و کار غالب غیرفعال کننده ژن CKN2A در سرطان پستان می‌باشد و جهش در آن ژن نادر می‌باشد [۳].

ساز و کارهای مولکولی مختلفی در مهار ظهور ژن‌های دارای ناحیه هیپر متیله شناسایی شده است. برای مثال،

- 1- Cyclins
- 2- Cyclin-dependent kinase inhibitor
- 3- Cyclin-dependent kinases

سیدالشهدا (ع) شهر اصفهان جمع آوری شدند. مرحله تومورها به وسیله بررسی پاتولوژی بر روی نمونه بافت بدست آمده از جراحی تعیین شد. به منظور بررسی وضعیت متیلاسیون از DNA سرم یا پلاسما استفاده گردید. مقدار DNA موجود در سرم افراد طبیعی معمولاً ناچیز بوده اما برای انجام PCR کافی است. در برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری خود ایمنی و عفونت، مقدار DNA در سرم افزایش می‌یابد [۱۶ و ۱۷]. به منظور استخراج DNA از سرم افراد مبتلا و سالم پس از خون‌گیری، پلاسما یا سرم به وسیله سانتریفیوژ در $250 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شد. $1/5 \text{ mL}$ از سرم یا پلاسما بیمار به همراه مقدار برابر 1X SDS پروتاز K در دمای 55°C به مدت یک شب انکوبه شد. سپس $1/5 \text{ mL}$ از محلول فنل/کلروفرم به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. تخلیص با محلول فنل/کلروفرم سه بار تکرار شد. بخش رویی جداسازی گردید و به آن $5 \mu\text{L}$ (10 mg/L)، 1 mL آمونیوم استات ($7/5 \text{ M}$ (NH_4OAc)) و 8 mL اتانل ۱۰۰٪ اضافه شد. پس از سانتریفیوژ رسوب حاصله با 10 mL اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد و پس از سانتریفیوژ رسوب حاصل در $30 \mu\text{L}$ (1 M , 0.2 M , NaCl) Tris EDTA، 4 M , pH 8.0 TE حل گردید. غلظت DNA به وسیله اندازه گیری OD260 و خلوص آن با بررسی نسبت OD260/OD280 تعیین شد. نمونه‌های تازه پیش از استخراج DNA در دمای 20°C - نگهداری شدند.

روش PCR اختصاصی متیلاسیون^۶ (MSP)

وضعیت متیلاسیون اگزون ۱ ژن CKN2A با استفاده از روش PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) انجام شد. در این روش ابتدا DNA به وسیله بی‌سولفیت سدیم تیمار داده می‌شود که موجب تبدیل سیتوزین غیر متیله به یوراسیل می‌شود. در روش MSP از دو جفت پرایمر اختصاصی توالی‌های هدف در حالت سیتوزین‌های متیله شده^۷ (M) و غیر متیله شده^۸ (U) استفاده می‌گردد و واکنش PCR جداگانه‌ای برای هر حالت انجام می‌شود. برای مثال در حالت متیله، پرایمرهای اختصاصی وضعیت متیله (عدم تبدیل سیتوزین‌ها به یوراسیل در جایگاه

پروتئین‌های متصل شونده به جایگاه‌های متیله^۴ (MBDs) و پروتئین متصل شونده به CpG متیله شده نوع ۲ (MeCP2) موجب بارگیری هیستون داستیلازها بر روی نواحی تنظیمی هیپرمتیله و مهار رونویسی می‌گردند [۱۲].

از آنجایی که غیر فعال شدن ژن‌ها با ساز و کار هیپرمتیلاسیون با فراوانی بالایی در سلول‌های سرطان پستان مشاهده می‌شود. می‌توان از آن به عنوان نشانگر پاسخ بالینی بهینه داروهای استفاده کرد که بر مسیرهای پیام رسانی مرتبط با CKN2A تأثیر می‌گذارند [۱۳]. برای مثال داروی 5-aza-2'deoxyctidine (5-Aza-CdR) مهار کننده متیلاسیون DNA می‌باشد که موجب فعال سازی دوباره ظهور ژن CKN2A مهار شده در سلول‌های سرطانی می‌گردد. فعال سازی دوباره ظهور ژن CKN2A به وسیله این دارو در سلول‌هایی که این ژن در آنها متیله شده است، موجب بازیابی کنترل تکثیر طبیعی سلول می‌گردد و در درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان کاربرد دارد [۱۴ و ۱۵].

در این مطالعه فراوانی هیپرمتیلاسیون اگزون ۱ ژن CKN2A در سرطان پستان در جهت امکان بکارگیری داروهای جدید ارائه شده، در درمان بیماران ایرانی بررسی شده است. به دلیل سهولت دسترسی به خون بیماران مبتلا یا افراد مشکوک به ابتلای سرطان پستان و قابلیت بکارگیری آن در غربالگری‌ها و بررسی فارماکوژنتیک بیماران، در این بررسی از بافت خون استفاده شد. امروزه مشخص شده است که DNA سلول‌های توموری پس از ماستکتومی نیز در سرم یا پلاسمای خون بیماران قابل شناسایی و بررسی است [۱۶ و ۱۷]. ساز و کار زیستی آزاد شدن DNA ژنومی از سلول‌های سرطانی به درون خون هنوز به طور کامل روشن نشده است. ممکن است DNA پس از فروپاشی سلول‌های نئوپلازی در بافت سرطانی DNA آنها به درون خون محیطی آزاد گردد [۱۸].

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و استخراج DNA از سرم یا پلاسما

نمونه‌ها شامل خون محیطی بودند، که از ۶۵ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۶۵ فرد سالم از بیمارستان

6- Methylation specific PCR

7- Methylated

8- Unmethylated

4- Methyl binding proteins

5- Methyl-CpG binding protein 2

نتایج بدست آمده به وسیله روش REP نیز بررسی گردید.

PCR وابسته به آنزیم محدود کننده^۱ (REP)

در این روش با بکارگیری آنزیم‌های محدود کننده حساس و غیرحساس به متیلاسیون توالی‌های حاوی CpG و سپس تکثیر قطعه هدف، وضعیت متیلاسیون ناحیه دلخواه بررسی می‌شود. با افزایش تعداد جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدود کننده حساس به متیلاسیون در قطعه‌ای از DNA که به وسیله PCR تکثیر می‌شود، حساسیت این روش نیز افزایش می‌یابد. در این تحقیق هر یک از نمونه‌های DNA ژنومی به وسیله دو آنزیم حساس به متیلاسیون (KspI و HpaII) و یک آنزیم غیر حساس به متیلاسیون (MspI) برش داده شد. آنزیم‌های حساس به متیلاسیون در صورت متیله بودن توالی‌های CpG هم‌پوشان با جایگاه برش، قادر به هضم توالی DNA هدف نیستند. آنزیم محدود کننده MspI با HpaII از روش‌های حساس است. هنگامی که C خارجی در توالی C/CGG متیله باشد، هیچ یک از این دو آنزیم قادر به برش جایگاه اثر خود نیستند، اما هنگامی که C داخلی متیله شده باشد MspI بر خلاف HpaII قادر به برش توالی خواهد بود. آنزیم محدود کننده KspI جایگاه CCGC/GG را برش می‌دهد و متیلاسیون جایگاه CpG مانع از عملکرد آن می‌شود.

قطعه‌ای که به وسیله پرایمرهای اختصاصی تکثیر می‌شود ۱۵۹ جفت باز طول داشته و دارای یک جایگاه برش برای آنزیم محدود کننده KspI و دو جایگاه برش برای آنزیم HpaII و MspI است. هنگامی که توالی هدف پس از هضم با آنزیم‌های حساس به متیلاسیون به وسیله PCR تکثیر شده و محصول تولید شود وضعیت متیلاسیون قطعه مورد بررسی مثبت قلمداد می‌گردد. در حالت متیله و غیر متیله نمونه هضم شده به وسیله آنزیم MspI تکثیر نمی‌شود. به این ترتیب به وسیله روش REP سه CpG موجود در ناحیه‌ای به طول ۱۵۹ جفت باز در اگزون ۱ ژن CKN2A بررسی شد (شکل ۱) [۲۰]. توالی جفت پرایمر بکار گرفته شده در روش REP در جدول ۱ آورده شده است.

اتصال پس از تیمار با بی‌سولفیت سدیم) قادر به اتصال به توالی هدف بوده و محصول PCR ایجاد می‌شود [۱۹].

تیمار با بی‌سولفیت سدیم پس از بهینه سازی برخی از مراحل، به ترتیب زیر انجام شد. ۱-۲ μg از DNA ژنومی با اضافه کردن ۳/۵ μl محلول ۳ هیدروکسیدسدیم (NaOH) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ °C واسرشت گردید. ۳۰ μl هیدروکوینون ۱۰ mM و ۵۲۰ μl سدیم بی‌سولفیت ۳ M (PH= ۵) به DNA واسرشت شده اضافه گردید و سطح آن به وسیله چند قطره روغن معدنی پوشیده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در ۹۵ °C قرار داده شد. DNA تغییر یافته به وسیله کیت خالص سازی DNA شرکت فرمنتاز^۱ خالص سازی گردید. پس از آن ۵/۵ μl هیدروکسید سدیم ۳ M به DNA تغییر یافته اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. محلول به وسیله اضافه کردن ۱۰۰ μl آمونیوم استات (NH₄OAc) ۵ M خنثی شد. DNA در اتانول رسوب داده شد و در ۲۰ μl (Tris 1M,) TE (EDTA 0.2M, NaCl 4M, pH 8.0) دوباره معلق گردید.

یک جفت پرایمر به منظور تکثیر DNA غیر متیله و جفت دیگر جهت تکثیر DNA متیله بکار گرفته شد (جدول ۱). برای انجام یک واکنش PCR به حجم ۵۰ μl، از ۲ μl DNA الگو (۲۰۰-۱۰۰ ng)، ۱ μl از هر پرایمر (۱۰۰ ng)، ۲/۵ μl MgCl₂ (۲/۵ mM)، ۵ μl بافر ۱۰X PCR، ۱ μl dNTP (۲۰۰ μM) و ۰/۴ μl آنزیم SmarTaq (۲U) استفاده شد. شرایط واکنش PCR شامل مرحله اولیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل شامل ۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ °C به مدت ۱ دقیقه (برای پرایمر غیر متیله) و ۶۱ °C به مدت ۱ دقیقه (برای پرایمر متیله) و ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محصول PCR به طور مستقیم بر روی ژل آگارز ۳ درصد تفکیک شد و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید.

از DNA ژنومی متیله شده (Intergen) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. از واکنش PCR بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به منظور تأیید و انتخاب روش مناسب جهش بررسی متیلاسیون،

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در بررسی متیلاسیون ژن CKN2A. M: پرایمر اختصاصی DNA ژنومی متیله، U: پرایمر اختصاصی DNA ژنومی غیر متیله

منبع	طول قطعه تکثیر شده (bp)	توالی	نوع پرایمر
۷	۱۵۱	5-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	U-forward
		5-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'	U-reverse
	۱۵۰	5-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	M-forward
		5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'	M-reverse
		پرایمرهای استفاده شده در روش REP	
	۱۵۹	5-GGGAGCAGCATGGAGCCG-3'	forward
5-CTGGATCGGCCTCCGACCGTA-3'		reverse	

۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR حاصل از تکثیر نمونه‌های توموری به وسیله پرایمرهای اختصاصی روش RE-PCR (۱۵۹ bp) به همراه ۱۰ میکرولیتر بافر SSCP حاوی فرمامید، بر روی ژل آکریل آمید ۱۰ درصد غیر دناتوره حاوی ۵ درصد گلیسرول برده شد. ژل در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با ولتاژ ۱۷۵ به مدت ۱۸ ساعت ران گردید و سپس به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد. به این ترتیب احتمال وجود تغییرات نوکلئوتیدی و ارتباط آنها با الگوی متیلاسیون ژن CKN2A بررسی گردید. الگوی بندهای محصولات PCR نمونه‌های سرطانی با نمونه‌های دارای توالی طبیعی مقایسه شد. تفاوت در جایگاه و تعداد بندهای مربوط به DNA تک رشته‌ای نشانگر وجود تغییرات نوکلئوتیدی و در نتیجه تغییر در ساختار فضایی DNA تک رشته‌ای بر روی ژل آکریل آمید غیر دناتوره می‌باشد. حذف و درج‌شدگی به وسیله تغییر در جایگاه بند مربوط به DNA دو رشته‌ای در مقایسه با الگوی قرار گیری بند در DNA نمونه نرمال مشخص می‌گردد (شکل ۲).

نتایج

متیلاسیون DNA یک پدیده ژنومی است که نقش مهمی در تنظیم ظهور ژن‌ها دارد. در این مطالعه، وضعیت متیلاسیون اگزون ۱ CKN2A ژن در ۶۵ DNA ژنومی بدست آمده از سرم یا پلاسما افراد مبتلا به سرطان پستان و ۶۵ فرد طبیعی با دو روش PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) و PCR وابسته به آنزیم محدود کننده (REP) بررسی شد (به بخش مواد و روش‌ها مراجعه شود).

پیش از انجام PCR، DNA به وسیله روش فنل/کلروفرم خالص سازی شده و با اتانل ۱۰۰ درصد رسوب داده شد. برای انجام یک واکنش PCR به حجم ۵۰ μl از ۲ μl DNA الگو (۲۰۰-۱۰۰ ng)، ۱ μl از هر پرایمر (۱۰۰ ng)، ۲ μl MgCl₂ (۲/۵mM)، ۵ μl بافر ۱۰X PCR، ۱ μl dNTP (۲۰۰ μM) و ۰/۴ μl آنزیم Smar Taq (۲u) استفاده شد. شرایط واکنش PCR شامل مرحله اولیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل شامل ۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، ۵۷ °C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محصول PCR به طور مستقیم بر روی ژل آگارز ۳ درصد تفکیک شد و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. هضم به وسیله آنزیم غیر حساس به متیلاسیون MspI به عنوان کنترل منفی و DNA غیر هضم شده به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

بررسی محصولات PCR به وسیله SSCP^{۱۱}:

از روش SSCP به منظور شناسایی تغییرات تک نوکلئوتیدی در DNA ژنومی بدون نیاز به توالی‌یابی استفاده می‌گردد. SSCP قادر به شناسایی تقریباً ۹۰ درصد جهش‌های تک نوکلئوتیدی در محصولات PCR به طول کمتر از ۳۰۰ جفت باز است. در این تحقیق به منظور بررسی وجود جهش یا پلی‌مرفیسم‌ها تک نوکلئوتیدی^{۱۲} (SNP) در ژن CKN2A از روش SSCP غیر رادیواکتیو استفاده شد. به منظور بررسی وجود جهش،

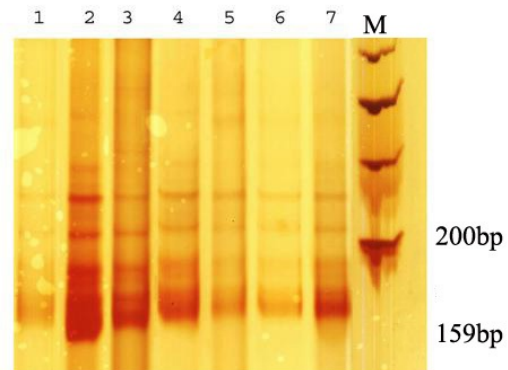
11- Single strand conformation polymorphism
12- Single nucleotide polymorphism

ویژه، نشانگر وضعیت متیلاسیون در نظر گرفته شد. بررسی MSP نشان داد که ژن CKN2A در ۱۳٪ از نمونه‌ها (۸/۶۵) متیله به صورت هموزیگوت (-/u+)، در ۱۶ درصد (۱۱/۶۵) متیله به صورت هتروزیگوت (+/u+) در تقریباً ۷۰ درصد (۴۶/۶۵) غیر متیله (+/u+) بودند (شکل ۳).

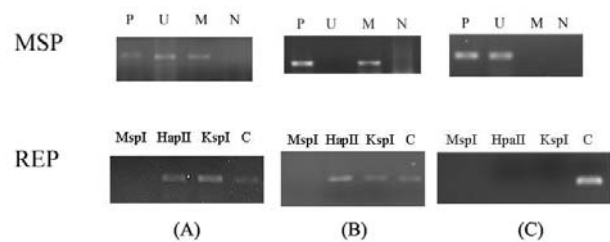
در روش RE-PCR نمونه‌های DNA ژنومی به وسیله دو آنزیم حساس به متیلاسیون (HpaII و KspI) و یک آنزیم غیر حساس به متیلاسیون (MspI) تیمار داده شد و پس از تکثیر قطعه هدف با پرایمرهای اختصاصی وضعیت متیلاسیون بر روی ژل آگارز ۳ درصد بررسی گردید. آنزیم‌های حساس به متیلاسیون KspI و HpaII در صورت متیله بودن توالی‌های CpG هم‌پوشان با جایگاه برش، قادر به هضم توالی DNA هدف نیستند. آنزیم MspI در حالت غیر متیله و متیله نوکلئوتید سیتوزین داخلی در توالی C/CGG قادر به برش جایگاه اختصاصی خود می‌باشد. تولید محصول به وسیله واکنش PCR پس از هضم توالی هدف با آنزیم‌های حساس به متیلاسیون نشانگر متیلاسیون قطعه مورد بررسی است. در حالت متیله و غیر متیله نمونه هضم شده به وسیله آنزیم MspI تکثیر نمی‌شود. در بررسی REP، هیپرمتیلاسیون در ۳۵ درصد از نمونه‌ها (۲۳/۶۵) مثبت و در ۶۰ درصد (۴۲/۶۵) منفی بود (شکل ۳).

از میان نمونه‌های بررسی شده، ۲۵ نمونه وضعیت متیلاسیون اگزون ۱ ژن CKN2A را در هر دو روش نشان دادند (REP⁺/MSP⁺). در ۴ مورد وضعیت متیله تنها به وسیله RE-PCR شناسایی شد و در روش MSP بند مربوط به محصول PCR حاصل از تکثیر به وسیله پرایمرهای اختصاصی حالت متیله مشاهده نگردید (REP⁺/MSP⁻). این وضعیت به دلیل متیلاسیون جزئی اگزون ۱ ژن CKN2A است. در موارد (REP⁺/MSP⁺) تمامی سیتوزین‌ها در جایگاه‌های CpG به صورت کامل متیله شده‌اند. در حالت (REP⁺/MSP⁻) برخی از سیتوزین‌ها در جایگاه‌های CpG هم‌پوشان با جایگاه اتصال پرایمرهای M در روش MSP متیله نشده‌اند که مانع اتصال پرایمر و انجام واکنش PCR می‌شود. همچنین در نمونه‌ها، متیله منفی بررسی شده به روش REP گاهی بند بسیار ضعیفی از واکنش مربوط به حالت غیرمتیله حاصل می‌گردد، که نشانگر وجود مقادیر ناچیز

شکل ۲- بررسی تغییرات تک نوکلئوتیدی به وسیله ژل عمودی پلی آکریل آمید ۱۰ درصد حاوی ۵ درصد گلیسرول. در شکل محصول تکثیر بخشی از پروموتور ژن CKN2A به وسیله PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بکار گرفته شده در روش RE-PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید نمایش داده شده است. تغییرات تک نوکلئوتیدی موجب تغییر در الگو بندهای DNA تک رشته‌ای بر روی ژل پلی آکریل آمید می‌گردد که این تغییرات با توجه به الگو بندها در نمونه طبیعی قابل شناسایی می‌باشند. نمونه قرار گرفته در چاهک شماره ۴ نمونه کنترل مثبت دارای توالی پروموتور طبیعی و نمونه‌های قرار گرفته در چاهک‌های ۱، ۲ و ۳ محصولات PCR حاصل از تکثیر اگزون ۱ ژن CKN2A هستند که دارای متیله می‌باشند. مقایسه الگو بندهای نمونه‌های سرطانی با نمونه طبیعی نشان می‌دهد که نمونه‌ها فاقد جهش هستند (M: نشانگر ۱۰۰ bp DNA).



شکل ۳- نتایج حاصل از بررسی وضعیت متیلاسیون ژن CKN2A به وسیله روش MSP و REP در سه بیمار مبتلا به سرطان پستان. در روش MSP، اگزون ۱ ژن CKN2A پس از تیمار با بی‌سولفیت سدیم به وسیله پرایمرهای اختصاصی توالی غیر متیله (U) و متیله (M) تکثیر شد. از DNA ژنومی متیله شده به عنوان کنترل مثبت و از واکنش PCR بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در روش REP DNA ژنومی در معرض هضم به وسیله آنزیم‌های حساس به متیلاسیون HpaII و KspI قرار گرفت و سپس به وسیله پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. از آنزیم محدود کننده غیر حساس به متیلاسیون MspI به عنوان کنترل منفی و از DNA ژنومی غیر هضم شده به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نمونه a متیله هتروزیگوت، نمونه b متیله هموزیگوت و نمونه c غیر متیله است. (M: محصول ناحیه متیله، U: محصول ناحیه غیر متیله، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی، C: کنترل).



همچنین وجود جهش و پلی مرفیسم‌های نوکلئوتیدی به وسیله روش PCR-SSCP بررسی گردید.

در روش MSP پرایمرهای اختصاصی برای توالی‌های متیله و غیر متیله در ناحیه مشابهی از اگزون ۱ CKN2A بکار گرفته شد و محصولات حاصل، به منظور مقایسه در کنار یکدیگر بر روی ژل برده شدند. حضور یا عدم حضور نوار مربوط به محصول PCR با یک پرایمر

دارای هیپرمتیلاسیون در ژن CKN2A، ۱۸ مورد در مراحل ابتدایی سرطان پستان شامل DCIS، LCIS و کارسینومای تهاجمی اولیه (مرحله I یا II) قرار داشتند که عارضه نئوپلازی ایجاد شده در این افراد، سرطان پستان اولیه یا بیماری خفیف پستان نامیده می‌شود. مقایسه بین الگوی متیلاسیون و ویژگی‌های پاتولوژی بافت توموری بدست آمده از افراد مبتلا به سرطان پستان، تک‌گیری این احتمال را مطرح می‌سازد که غیرفعال‌سازی ژن CKN2A به‌وسیله هیپرمتیلاسیون می‌تواند در مراحل اولیه بروز سرطان پستان اتفاق افتد.

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق امکان بکارگیری داروهای مهارکننده الگوی غیرطبیعی متیلاسیون ژن CKN2A مانند داروی 5-Aza-CdR را در بخشی از بیماران مبتلا به سرطان پستان در جمعیت ایران مطرح می‌سازد. در حال حاضر از شیمی درمانی تنها جهت درمان مراحل اولیه سرطان پستان استفاده می‌شود. در بیماران سنین قبل یا بعد یائسگی که دچار سرطان پستان با اندازه تومور کمتر از ۱ سانتیمتر می‌باشند، میزان بقاء بعد از درمان موضعی ۹۰ درصد بوده و شیمی درمانی ضروری نمی‌باشد. تومور بزرگ‌تر از ۱ سانتیمتر صرف نظر از وضعیت گره‌های لنفاوی به شیمی درمانی پاسخ مناسبی می‌دهد [۲۱].

بحث

در این تحقیق فراوانی مهار ظهور ژن سرکوبگر تومور CKN2A به وسیله ساز و کارهای اپی‌ژنتیک در سرطان پستان تک گیر مطالعه شد. برای این منظور، متیلاسیون اگزون ۱ ژن CKN2A در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان پستان با دو روش PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) و PCR وابسته به آنزیم محدود کننده (REP) بررسی شد. با استفاده از روش MSP ۲۹ درصد و با استفاده از روش REP ۳۵ درصد هیپرمتیلاسیون ژن CKN2A در DNA بدست آمده از سرم یا پلاسما ۶۵ بیمار ایرانی مبتلا به سرطان پستان تک گیر شناسایی شد. بررسی ویژگی‌های پاتولوژی تومورها نشان داد که نمونه‌های دارای متیلاسیون در ژن CKN2A در مراحل ابتدایی بروز سرطان پستان قرار دارند. همچنین روش MSP ارتقا داده شد و انجام آن در یک روز امکان پذیر گشت.

DNA الگوی متیله و یا عدم هضم کامل به وسیله آنزیم حساس به متیلاسیون می‌باشد.

بررسی وضعیت متیلاسیون ژن CKN2A در ۶۵ نمونه DNA بدست آمده از سرم یا پلاسما افراد نرمال به وسیله روش‌های MSP و REP بررسی گردید. در تمامی نمونه‌ها اثری از متیلاسیون مشاهده نگردید. این نشانگر این واقعیت است که فعال شدن ساز و کار اپی‌ژنتیک غیر فعال‌سازی ژن CKN2A از ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود.

تمامی ۶۵ نمونه افراد سرطانی پس از تکثیر به وسیله پرایمرهای بکار گرفته شده در روش RE-PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد حاوی ۵ درصد گلیسرول، بررسی شدند. در هیچ یک از نمونه‌ها تغییری در الگوی بندها که نشانگر وجود تغییرات نوکلئوتیدی است مشاهده نشد. عدم وجود تغییرات نوکلئوتیدی شامل جهش یا پلی‌مرفیسم‌های نوکلئوتیدی نشانگر عدم وجود ارتباط بین عوامل ژنتیک در بروز تغییرات اپی‌ژنتیک مؤثر در تنظیم ظهور ژن CKN2A می‌باشند (شکل ۲).

در بخش دوم مطالعه ویژگی‌های هیستولوژی و درجه همه بافت‌های توموری پستان به وسیله متخصص پاتولوژی مشخص گردید و با الگوی متیلاسیون نمونه DNA توموری بدست آمده از سرم یا پلاسما بیماران مقایسه گردید. تعیین مرحله^{۱۳} بافت‌های توموری بر اساس سیستم TNM^{۱۴} و درجه بندی^{۱۵} بر اساس معیارهای ارائه شده به وسیله سازمان بهداشت جهانی^{۱۶} انجام گرفت. همه تومورهای دارای متیلاسیون در ژن CKN2A در مراحل اولیه سرطان پستان شامل کارسینوم مجرای درجا^{۱۷} (DCIS)، کارسینوم لوبولار درجا^{۱۸} (LCIS) و مرحله I، II یا III هیستولوژی تومور قرار داشتند. سن بیماران مبتلا به سرطان پستان بررسی شده در این تحقیق بین ۱۹ تا ۶۸ سال بود. در بیمارانی که سن آنها کمتر از ۴۵ سال بود متیلاسیون ژن CKN2A با فراوانی بیشتری نسبت به بیمارانی با سن بیش از ۴۵ سال مشاهده گردید (۶۱/۲ درصد در برابر ۳۸/۷ درصد). از میان ۲۳ نمونه

- 13- Stage
- 14- Tumor, Nodes, Metastasis System
- 15- Grade
- 16- World Health Organization recommendations
- 17- Ductula carcinoma In situ
- 18- Lobular carcinoma In situ

تقریباً مشابه این دو روش است. با این وجود در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بکارگیری استفاده از MSP توصیه می‌شود چرا که راه اندازی آن آسان‌تر بوده و به زمان و هزینه کمتری احتیاج دارد. MS-PCR روش حساسی است که قادر به شناسایی مقادیر ناچیز متیلاسیون (۰/۱ درصد) در جزایر CpG می‌باشد [۱۹]. روش MSP از حساسیت کافی به منظور بررسی متیلاسیون در نمونه DNA سرمی برخوردار بوده و قادر به شناسایی یک نمونه متیله در میان هزاران نمونه غیرمتیله می‌باشد. اطلاعات بدست آمده به وسیله MSP با روش REP مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت.

از آنجایی که نمونه‌های توموری دارای هیپرمتیلاسیون در ژن CKN2A از دیدگاه خصوصیات پاتولوژیک تومور سرطانی پستان در مراحل اولیه قرار داشتند احتمالاً هیپرمتیلاسیون یک واقعه اپی‌ژنتیک اولیه در بیماران ایرانی است. هیپرمتیلاسیون در هیچ یک از نمونه‌های طبیعی مشاهده نشد از این رو نتیجه گیری می‌شود که متیلاسیون ژن CKN2A از ویژگی‌های اختصاصی یاخته‌های سرطانی است. وجود تغییرات نوکلئوتیدی به دلیل جهش یا پلی‌مرفیسم‌ها و ارتباط آنها با متیلاسیون و غیرفعال‌سازی ژن CKN2A به وسیله روش PCR-SSCP بررسی گردید. مقایسه نمونه‌های توموری با الگو بندها در نمونه نرمال تغییر نشان نداد. این امر نشانگر این حقیقت است که هیپرمتیلاسیون ژن CKN2A در سرطان پستان تک گیر در جمعیت ایرانی با تغییرات نوکلئوتیدی در ناحیه بررسی شده همبند^{۱۹} ندارد.

فراوانی نسبتاً بالای غیر فعال شدن ژن CKN2A به وسیله متیلاسیون در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان پستان ایرانی امکان استفاده از وضعیت متیلاسیون این ژن را به عنوان نشانگر پاسخ بالینی بهینه داروهایی که بر مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با CKN2A تأثیر می‌گذارند مطرح می‌سازد [۲۸]. برای مثال مشتقات دارویی Diarylureas (مهار کننده پروتئین CDK4) و داروی 5-Aza-CdR (مهار کننده متیلاسیون DNA و فعال کننده ظهور CKN2A) نامزد درمان بیماران سرطانی دارای ژن CKN2A غیر فعال محسوب می‌شوند [۱۵] و [۳۰]. نتایج بدست آمده در این تحقیق و تحقیقات پیشین،

هیپرمتیلاسیون نواحی تنظیمی ژن یکی از ساز و کارهای غیرفعال‌سازی ژن‌های سرکوبگر تومور در سرطان پستان است [۲۲]. یکی از مهمترین ژن‌های سرکوبگر تومور که متیلاسیون نواحی تنظیمی از ساز و کارهای اصلی غیرفعال‌سازی آن محسوب می‌شود CKN2A می‌باشد. ژن CKN2A یک مهار کننده کیناز وابسته به سیکلین ۴ (CDK4) است که به صورت غیرمستقیم فعالیت پروتئین Rb را تنظیم کرده و با پروتئین p53 در القا آپتوز همکاری می‌کند [۲۳]. این ژن یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی گذار چرخه تقسیم یاخته از فازهای G0 یا G1 است. ژن سرکوبگر تومور، یکی از ژن‌های اصلی است که در بروز انواع مختلف سرطان‌ها نقش دارد و غیر فعال شدن آن معمولاً در مراحل اولیه تومورزائی اتفاق می‌افتد [۲۴]. تغییرات اپی‌ژنتیک CKN2A امکان تکثیر کنترل نشده رده یاخته‌ای اولیه و تبدیل آن به توده یاخته‌ای سرطانی را فراهم می‌آورد [۲۵]. در سال ۱۹۹۶ Brenner و همکاران پس از بررسی ۲۳ نمونه تومور پستان به وسیله روش REP در ۱۷ درصد موارد هیپرمتیلاسیون ژن CKN2A را شناسایی کرد [۲۶]. در سال ۲۰۰۳ Dominguez و همکاران پس از بررسی ۱۰۰ نمونه به وسیله روش MSP در ۱۹ درصد موارد هیپرمتیلاسیون شناسایی نمود [۲۷]. در سال ۲۰۰۶ Li و همکاران پس از بررسی ۱۹۳ تومور سرطان پستان به وسیله روش MSP در ۲۷ درصد موارد هیپرمتیلاسیون ژن CKN2A را شناسایی کردند [۲۸]. در همان سال Munot و همکاران پس از بررسی ۲۰۰ نمونه با روش MSP در ۵۰ درصد از موارد هیپرمتیلاسیون را شناسایی نمودند [۲۹]. تنوع در اندازه نمونه‌های بررسی شده، تنوع در درجه پاتولوژی بافت توموری پستان و نیز پیش زمینه ژنتیکی و محیطی اختصاصی جمعیت مورد بررسی از موارد قابل ذکر در توضیح تنوع مشاهده شده در فراوانی هیپرمتیلاسیون ژن CKN2A در تحقیقات متفاوت می‌باشد.

در این تحقیق، بررسی وضعیت متیلاسیون ژن CKN2A بر روی DNA ژنومی بدست آمده از سرم یا پلاسما بیماران انجام گرفت. استفاده از سرم یا پلاسما بیمار امکان بررسی غیر تهاجمی را در غربالگری‌ها و آزمایش‌های تشخیصی فراهم می‌سازد. مقایسه نتایج بدست آمده از دو روش MSP و REP نشانگر حساسیت

همچنین پاسخ بالینی بیماران دارای هیپرمتیلاسیون در ژن CKN2A به داروی 5-Aza-CdR بررسی و با جمعیت کنترل مقایسه گردد.

سپاسگزاری

هزینه این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان تأمین شده است که بدینوسیله تشکر می‌شود.

نشانگر این است که غیر فعال‌سازی ژن CKN2A به وسیله متیلاسیون، احتمالاً در ساز و کار تومورزایی در سرطان پستان نقش مهمی بر عهده دارد.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده تعداد و تنوع نمونه‌های توموری سرطان پستان از نظر محل سکونت بیمار، ویژگی‌های پاتولوژی و سن افزایش یابد. همچنین با بررسی بر روی نمونه‌های بافت توموری نتایج با نتایج حاصل از بررسی سرم یا پلاسمای بیماران مقایسه گردد.

منابع

- 1- مرکز مدیریت بیماری‌ها معاونت غیر واگیر، اداره سرطان. گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی. چاپ اول تهران ۱۳۸۴.
- 2- Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 276–85.
- 3- Parrella P, Luana Poeta M, Gallo P, Scintu M, Prencipe M. Adolfo Apicella, Nonrandom Distribution of Aberrant Promoter Methylation of Cancer-Related Genes in Sporadic Breast Tumors. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5349–54.
- 4- James W, Sidransky R, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Cell Res* 2001; 264: 42–55.
- 5- Serrano M, Hannon G.J, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704–7.
- 6- Nielsen N H, Roosa G, Emdinc O, Landberg G. Methylation of the p16Ink4a tumor suppressor gene 5'-CpG island in breast cancer. *Cancer Let* 2001; 163(1): 59–69.
- 7- Baur A, Shaw P, Burri N, Delacré'taz F, Bosman F, Chaubert P. Frequent Methylation Silencing of p15 INK4b (MTS2) and p16 (MTS1) in B-Cell and T-Cell Lymphomas. *Blood* 1999; 94(5): 1773–81.
- 8- Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro G.I, Edwards C.D, Rollins B.J, Sidransky D.A. Novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* 1995; 55: 2995–7.
- 9- Kannan K, Sharpless N, Xu J, O'Hagan R, Bosenberg M, Chin L. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *PNAS* 2003; 100(3):1221–5.
- 10- Baylin B, Herman G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168–74.
- 11- Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995; 55: 4531–5.
- 12- Shaker S, Bernstein M, Momparler LF, Momparler RL. Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leukemia Res* 2003; 27: 437–44.
- 13- Li S, Rong M, Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lt* 2006; 237: 272–80.
- 14- Bender CM, Pao M, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58(1):95–101.
- 15- Bo Z, Tao H, Ke L, Jianying C, Guobin W. Effects of 5-Aza-CdR on cell proliferation of breast cancer cell line MDA-MB-435S and expression of maspin gene. *Journal of Huazhong University of Science* 2007; 27(5): 543–6.
- 16- Silva J, Garcia J, Dominguez G, Silva J. Persistence of Tumor DNA in Plasma of Breast Cancer Patients After Mastectomy. *Annals of Surgical Oncology* 2002; 9(1):71–6.
- 17- Chen X, Bonnefoi H, Diebol-Berger S, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2297–303.
- 18- Sanchez-Cespedes M, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head

- and neck cancer patients, *Cancer Res* 2002; 60: 892-5.
- 19- Shames D, Minna J, Gazdar S. Methods for detecting DNA methylation in tumors: From bench to bedside. *Can Letters* 2007; 251: 187-98.
- 20- Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, and Chaubert P. Frequent silencing of p15INK4b(MTS2) and p16INK4a(MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood* 1999; 94: 1773-81.
- 21- Gustafsson A, Tartter P, Brower S. Prognosis of patients with bilateral carcinoma of the breast. *J Am Surg* 1994; 178: 111-6.
- 22- Li S, Rong M, Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Let* 2006; 237: 272-80.
- 23- Lukas J, Parry D, Aagaard L. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 1995; 375: 503-6.
- 24- Rocco J, Sidransky D. P16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Experimental Cell Res* 2001; 264: 42-55.
- 25- Voorhoeve M, Agami R. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell*. 2003; 4: 311-9.
- 26- Brenner A, Wang A, Olopade O, Dreyling M, Aldaz C. Preferential Loss of Expression Of 16INK4a Rather Than p14 in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 993-8.
- 27- Dominguez G, Silva J, Garcia J, Silva J, Rodriguez R, Muñoz K, Chacón I, Sanche R. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mut Res* 2003; 530: 9-17.
- 28- Li S, Rong M, Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Let* 2006; 237: 272-80.
- 29- Munot K, Bell K, Lane S, Horgan K. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer. *Hum Pathol* 2006; 37: 989-99.
- 30- Karissa L, Betty A, Michael J, Margaret L, Robinson L, Schow S, Kerner J, Goldfine I.D., Youngren J. Diarylureas are small-molecule inhibitors of insulin-like growth factor I receptor signaling and breast cancer cell growth. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(4): 1079-86.