

## مطالعه الگوی متیلاسیون DNA در پروموتور ژن بازدارنده تومور RASSF1A در دو رده سلولی سرطان پستان

فریما مقدس‌خو: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
 سید حمیدالله غفاری\*: مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
 محسن قدمی: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
 کامران علی‌مقدم: مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
 اردشیر قوام‌زاده: مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** سرطان پستان یک تهدید عمده برای سلامتی زنان سراسر جهان می‌باشد و پیشرفت‌هایی در توانایی ما برای جلوگیری، تشخیص و درمان این بیماری نیاز به درک بیشتری از پایه و اساس مولکولی ایجاد سرطان پستان دارد. بررسی متیلاسیون ژن‌های چرخه سلولی می‌تواند به‌عنوان یک شیوه برای شناسایی کردن ژن‌های مهم در تومورزایی استفاده شود و ارزش تشخیصی/پیش‌آگهی‌دهنده داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتور RASSF1A، به عنوان یک ژن تنظیم‌کننده چرخه سلولی، در دو رده سلولی سرطان پستان است.

**روش بررسی:** در این پژوهش بنیادی از تکنیک MSP (PCR اختصاصی متیلاسیون) که روشی کیفی است، به منظور تعیین الگوی متیلاسیون پروموتور RASSF1A در دو رده سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-231) استفاده شد. این روش مستلزم تغییر اولیه DNA به وسیله سدیم بی‌سولفیت، تبدیل همه سیتوزین‌های غیرمتیله، اما نه متیله، به اوراسیل و پس از آن تکثیر با پرایمرهای اختصاصی برای DNA متیله و غیرمتیله می‌باشد.

**یافته‌ها:** نتایج MSP نشان می‌دهند که در هر دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231، بدون توجه به زیرگروه مولکولی آنها، پروموتور ژن سرکوب‌گر تومور RASSF1A کاملاً متیله می‌باشد. فقدان باند غیرمتیله در هر دو رده سلولی مذکور نیز نشان‌دهنده این امر است.

**نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها تأیید می‌کنند که هیپرمتیلاسیون ناحیه پروموتور RASSF1A ممکن است نقش مهمی را در پاتوژنز سرطان پستان ایفا کند. با در نظر گرفتن اینکه تغییرات اپی‌ژنتیکی برگشت‌پذیر هستند، غربالگری برای الگوهای متیلاسیون ناهنجار جایگاه‌های CpG در پروموتور ژن‌های ضروری در طی فرآیند تومورزایی، مانند ژن‌های چرخه سلولی، می‌تواند در توسعه و کاربرد عوامل درمانی هدف‌گیری‌کننده این تغییرات در سرطان‌های پستان انسانی مؤثر باشند.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، ژن‌های چرخه سلولی، الگوهای متیلاسیون ناهنجار، پروموتور ژن سرکوب‌گر تومور RASSF1A

\* نشانی نویسنده پاسخگو: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، سیدحمیدالله غفاری. نشانی الکترونیک: shghaffari200@yahoo.com

## مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی و علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در میان زنان سراسر جهان محسوب می‌شود (۱)، به طوری که ۲۵٪ از کل موارد سرطان و ۱۴/۷٪ از مرگ‌های ناشی از سرطان را در جامعه‌ی زنان دربرمی‌گیرد (۲). در طول دهه‌های اخیر تعداد بیماران مبتلا به سرطان پستان و بروز این سرطان در سراسر جهان افزایش پیدا کرده و از این رو به عنوان یک مشکل مهم تهدیدکننده سلامتی در سراسر جهان مطرح است (۳). همراه با افزایش جهانی وقوع سرطان پستان، در ایران نیز یک روند صعودی در بروز سالانه این سرطان مشاهده می‌شود، به طوری که بیماران مبتلا به سرطان پستان در ایران به طور متوسط ۱۰ سال جوان‌تر از هم‌تایان غربی خود هستند (۴). با توجه به فقدان درمان قطعی برای مقابله با این سرطان، تشخیص سریع و زودهنگام بیماری در کاهش مرگ‌ومیر و بهبود پیش‌آگهی بیمار بسیار مهم و کمک‌کننده است (۱).

مسئله بسیار مهمی که در رابطه با انواع سرطان‌ها و از جمله سرطان پستان مطرح است، ماهیت پیچیده و هتروژن این بیماری است به طوری که توده سرطانی را نمی‌توان در قالب یک ماهیت منفرد و ثابت تعریف کرد و در واقع، مجموعه‌ای ناهمگون از تظاهرات پاتولوژیک مولکولی و سیتولوژیکی سلول‌ها به شمار می‌رود. میزان بقا و پاسخ به درمان کاملاً متفاوت بین بیمارانی با تشخیص پاتولوژی ظاهراً یکسان به وفور گزارش شده که خود گواه آشکاری بر ماهیت هتروژن ناشناخته و منحصر به فرد هر تومور در هر فرد بیمار بوده است. با وجود آنکه هتروژن بودن ماهیت سرطان پستان مشکلات بسیاری را در زمینه بالین ایجاد کرده است، در عین حال اهداف مولکولی بسیاری را جهت توسعه‌ی روش‌های درمانی در اختیار محققان قرار داده است که بر شناسایی و تعریف بیومارکرهای تشخیصی و درمانی به عنوان اهداف مناسب درمانی استوار است (۵).

براساس بررسی پروفایل‌های مولکولی و الگوهای مختلف بیان ژنی رده‌های سلولی سرطان پستان، سه زیرگروه، یک لومینال و دو بازال (A و B)، تعیین شده است. به طور کلی، زیرگروه‌های رده‌های سلولی مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهند که بیشتر (اما نه همه) ناهمگونی‌های قابل توجه ژنومی، بیانی (از نظر رونویسی) و زیستی یافت شده در

تومورهای پستان را نشان می‌دهند؛ که این درک ما را از مکانیسم‌های تومورزایی افزایش داده و محرکی برای ایجاد درمان‌های جدید است. در این مطالعه از دو رده سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-231) به منظور شناسایی تغییرات نابه‌جا در الگوی متیلاسیون ژن موردنظر استفاده شده است. سلول‌های MCF-7 که سطوح پایینی از تهاجم را نشان می‌دهند در زیرگروه لومینال قرار دارند. رده سلولی MDA-MB-231 (بسیار مهاجم) به زیرگروه بازال B تعلق دارد. پس این رده‌های سلولی به دلیل قرار گرفتن در دو زیرگروه مختلف تا حدی می‌توانند نابه‌هنجاری‌های موجود در تومورهای پستان را منعکس کنند (۶).

سرطان اغلب به عنوان یک بیماری چرخه سلولی در نظر گرفته می‌شود. به این ترتیب، تعجب‌آور نیست که اختلال در تنظیم چرخه سلولی یکی از معمول‌ترین تغییرات در طی ایجاد تومور باشد (۷). رخداد‌های اولیه در شروع فرآیند تومورزایی با کسب توانایی در راستای فرار از مکانیسم‌های تنظیم رشد بستر وقوع حوادث بیشتری را در این زمینه مهیا می‌کنند. بخشی از اطلاعات کاربردی راجع به سرطان و چرخه سلولی در مطالعات مختلف، از بررسی همپوشانی‌های این دو زمینه به دست آمده‌اند که خود، نشانگر ارتباط تنگاتنگ بین ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی و ایجاد بدخیمی می‌باشد (۸). سرطان از بیان نابه‌هنجار یا فعال‌سازی تنظیم‌کننده‌های مثبت چرخه سلولی (پروتوآنکوژن‌ها) و سرکوب عملکردی تنظیم‌گرهای منفی (ژن‌های سرکوب‌گر تومور) سرچشمه می‌گیرد. بنابراین، درک مکانیسم‌های مولکولی مربوط به اختلال در تنظیم پیشروی چرخه سلولی در سرطان می‌تواند دیدگاه‌های مهمی را در مورد چگونگی تبدیل سلول‌های سالم به توموری و همچنین طراحی روش‌های درمانی جدید ارائه کند (۷).

رویدادهای اپی‌ژنتیکی منجر به تغییرات قابل توارث در بیان ژن و ساختار کروماتین بدون تغییر در توالی DNA می‌شوند (۹). متیلاسیون DNA تنها تغییر اپی‌ژنتیکی است که مستقیماً DNA را تحت تأثیر قرار می‌دهد که این تغییر حاصل انتقال یک گروه متیل از S-آدنوزیل متیونین به کربن شماره ۵ باز سیتوزین می‌باشد. در پستانداران متیلاسیون سیتوزین در موقعیت‌های 5'-CpG-3' توالی DNA صورت می‌گیرد. جزایر CpG

پروتئین RASSF1A برای پاسخ به آسیب DNA توسط ATM فسفریله می‌شود (۱۸). پس این پروتئین می‌تواند به عنوان تنظیم‌کننده منفی تکثیر سلولی از طریق مهارگذار G1/S عمل کند. در طی پروموتافاز RASSF1A با اتصال به Cdc20 که محرک APC/C<sup>2</sup> می‌باشد باعث تنظیم منفی آن و پایداری میکروتوبول‌ها می‌شود (۱۳). کمپلکس APC/C<sup>Cdc20</sup> باعث آغاز جدا شدن کروماتیدها و ورود به آنافاز می‌شود. به این ترتیب RASSF1A در نقطه واری می‌توزی نیز دارای عملکرد می‌باشد. خاموش شدن بیان این ژن بیشتر توسط متیلاسیون رخ می‌دهد (۱۹). هدف این مطالعه بررسی الگوی متیلاسیون DNA در ناحیه پروموتور ژن RASSF1A در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 است.

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع بنیادی است که گاهی به عنوان پژوهش تجربی<sup>۳</sup> نیز شناخته می‌شود.

#### کشت سلولی:

رده‌های سلولی سرطان پستان، MCF-7 و MDA-MB-231 جهت بررسی در این مطالعه‌ی سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در محیط RPMI1640 (Invitrogen, Carsbad, CA, USA) همراه با سرم جنین گاوی (FBS) با غلظت ۱۰٪، پنی‌سیلین (۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شدند و درون یک انکوباتور مرطوب دارای دمای ۳۷°C و حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub>، نگهداری شدند. هر دو رده سلولی نام برده شده نماینده آدنوکارسینوما پستان هستند. رده سلولی MCF-7 در مدل‌های حیوانی - تحقیقاتی قادر به ایجاد تومورهای به خوبی تمایز یافته (well-differentiated) می‌باشد. سلول‌های این رده از نظر گیرنده‌های استروژن (ER<sup>+</sup>) و پروژسترون (PR<sup>+/-</sup>)، مثبت می‌باشند. رده سلولی MDA-MB-231 درون بدن موجود زنده (شرایط In vivo) تومورهایی با تمایز ضعیف (poorly differentiated) تشکیل داده و فاقد بیان گیرنده‌های استروژن (ER<sup>-</sup>) و پروژسترون (PR<sup>-</sup>) می‌باشد، در نتیجه

که مناطقی غنی از دی‌نوکلئوتیدهای CpG می‌باشند به عنوان خصوصیت بارز نواحی پروموتوری ژن‌ها به شمار می‌روند. تجزیه و تحلیل‌های گسترده ژنومی بیان کرده‌اند که تقریباً ۵۶٪ از پروموتورهای ژن‌های انسانی همراه با جزایر CpG هستند. متیلاسیون با اثر بر روی پروموتور ژن باعث تنظیم بیان ژن می‌شود (۱۰). پیچیدگی تنظیم الگوهای متیلاسیون DNA به واسطه تعدد و عملکرد متنوع DNA متیل‌ترانسفرازها (MTDNها) و پروتئین‌های برهم‌کنش‌دهنده با ۵- متیل‌سیتوزین آشکار می‌شود. تغییرات در الگوی متیلاسیون می‌توانند منجر به تومورزایی شوند. بر این اساس این تغییرات به دو دسته، هیپرمتیلاسیون و هیپومتیلاسیون، تقسیم می‌شوند (۱۱). مطالعات متعدد بیان می‌کنند که تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون نابهنجار DNA، ممکن است در ایجاد تومور بر تغییرات ژنتیکی مقدم بوده و باعث القای این تغییرات شوند (۱۲). تغییراتی غیرطبیعی در بیان ژن‌های کنترل‌کننده چرخه سلولی به وسیله متیلاسیون نابهنجار در ایجاد تومور نقش دارد. بنابراین بررسی تغییرات الگوی متیلاسیون پروموتور ژن‌هایی که به طور مثبت و یا منفی چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند، می‌تواند برای شناسایی، تشخیص، پیش‌آگهی و جلوگیری از پیشروی تومور و درمان سرطان پستان در مراحل اولیه آن استفاده شود.

ژن سرکوب‌گر تومور RASSF1A<sup>1</sup> در تنظیم تکثیر، آپوپتوز، چسبندگی و تحرک سلولی نقش دارد (۱۵-۱۳). پروتئین RASSF1A با مهار تجمع پروتئین سیکلین D1 باعث توقف چرخه سلولی قبل از ورود به مرحله S می‌شود. RASSF1A می‌تواند باعث القای توقف چرخه سلولی از طریق تعامل با پروتئین‌های خانواده‌ی رتینوبلاستوما که نگهبانان اصلی نقطه واری G1 چرخه سلولی هستند، بشود (۱۶). این پروتئین توانایی فاکتور رونویسی p120<sup>E4F</sup> را برای سرکوب سیکلین A2 افزایش می‌دهد و برای القای توقف چرخه‌ی سلولی در مرحله G1 با p120<sup>E4F</sup> همکاری می‌کند (۱۷). از آنجایی که MDM2 یک تنظیم‌کننده منفی مهم p53 می‌باشد، RASSF1A با تحریک یوبی‌کوئیتیناسیون پروتئین MDM2 می‌تواند باعث فعالیت مؤثر پروتئین p53 شود.

<sup>2</sup> Anaphase-Promoting complex/cyclosome

<sup>3</sup> Experimental research

<sup>1</sup> Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1

مخلوط موجود در هر میکروتیوب به یک spin column انتقال داده شده و سپس سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر BW (برای شستشوی DNA، نمک‌زدایی از آن و خارج کردن سدیم بی‌سولفیت باقی‌مانده) به هر spin column اضافه شده و سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر بافر BD (برای دسولفوناسیون) به هر spin column اضافه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس سانتریفیوژ گردید. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر بافر BW اضافه و سانتریفیوژ شد و این مرحله یک بار دیگر تکرار گردید. spin columnها داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شده، سپس ۴۰ میکرولیتر بافر EB (DNA تخلیص شده از طریق این بافر شستشو از ستون خارج می‌شود) در طی دو مرحله ریخته شده و DNA خالص شده توسط سانتریفیوژ از ستون خارج گردید. DNAهای بی‌سولفیت شده در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - ذخیره شدند. پس تیمار با سدیم بی‌سولفیت به منظور تمایز بین توالی‌های DNA متیله و غیرمتیله صورت گرفت و با تکنیک MSP دنبال شد.

در این مطالعه از EpiTect® Control DNA (human), methylated and bisulfite converted, که توسط شرکت کیازن تهیه شده و شامل مولکول‌های DNA کاملاً متیله (-in vitro) methylated DNA و تیمار شده با بی‌سولفیت می‌باشد، به عنوان کنترل مثبت برای جفت پرایمر متیله و از DNA لنفوسیت‌های افراد سالم نیز به عنوان کنترل مثبت برای آل‌های غیرمتیله استفاده شد. جداسازی لنفوسیت‌ها (سلول‌های تک هسته‌ای) از خون محیطی به وسیله سانتریفیوژ گرادیان غلظت فایکول صورت گرفت، سپس DNA آنها با روش نمک اشباع استخراج شده و با سدیم بی‌سولفیت تیمار شد.

#### PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP)<sup>۴</sup>:

برای تعیین الگوی متیلاسیون DNA در جزیره CpG موجود در ناحیه پروموتور ژن RASSF1A از تکنیک MSP که یک روش کیفی است، استفاده شد. توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر DNA متیله یا غیرمتیله (۱۸) و اندازه مورد انتظار محصولات PCR در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

رشد، متابولیسم و فعالیت سلول‌ها مستقل از سیگنال‌دهی و کنترل هورمون‌های مذکور است. لازم به ذکر است که هر دو رده سلولی فاقد بیان گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ( $\text{HER2}^{-}$ ) می‌باشند (۶).

#### استخراج DNA و تیمار با سدیم بی‌سولفیت:

DNA ژنومی از هر رده سلولی با استفاده از روش salting out (نمک اشباع) استخراج شد. در این روش از بافر لیز کننده (حاوی NaCl ۵ مولار، Tris-HCl ۱ مولار و EDTA ۰/۵ مولار) جهت لیز نمودن سلول‌ها، از SDS ۱۰٪ به عنوان دترجنت برای حل کردن چربی‌های غشاء و مختل کردن ارتباط بین پروتئین‌ها و فسفولیپیدهای سازنده غشاء، از پروتئیناز K برای لیز کردن پروتئین‌ها و از NaCl اشباع (۶ مولار) جهت رسوب دادن پروتئین‌ها و بقایای سلولی استفاده می‌شود. از آنجایی که DNA در الکل‌ها نامحلول است، با اضافه نمودن ایزوپروپانول، DNA به صورت کلاف جدا شده و قابل برداشت است. برای شستشوی DNA استخراج شده نیز اتانول ۷۰٪ مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰). پس از استخراج، میکروتیوب حاوی DNA در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - ذخیره گردید. تیمار DNA با سدیم بی‌سولفیت با استفاده از کیت کیازن (EpiTect Bisulfite Kit) و براساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و منجر به تبدیل سیتوزین غیرمتیله به اوراسیل شد در حالی‌که سیتوزین متیله تغییر نیافته باقی ماند. به‌طور خلاصه به ۲- ۱ میکروگرم از DNA هر رده سلولی ۸۵ میکرولیتر مخلوط بی‌سولفیت (Bisulfite Mix) و ۳۵ میکرولیتر بافر محافظت‌کننده از DNA اضافه گردید. بافر محافظت‌کننده پس از اضافه شدن باید از سبز به آبی تغییر رنگ دهد، که این نشان دهنده pH مناسب برای تبدیل سیتوزین غیرمتیله می‌باشد. این بافر از خرد شدن DNA جلوگیری کرده و دناتوراسیون کارآمد DNA را میسر می‌سازد. تبدیل DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برنامه دمایی و زمانی ترموسایکلر یک مجموعه بهینه از مراحل انکوباسیون لازم برای واسرشتی حرارتی DNA و سولفوناسیون و دآمیناسیون سیتوزین را فراهم می‌کند. برای شستشو و خالص‌سازی DNA، ابتدا ۵۶۰ میکرولیتر بافر BL (به اتصال DNA تک‌رشته‌ای به غشای spin column کمک می‌کند) به هر نمونه اضافه و به مدت کوتاهی سانتریفیوژ شد. کل

<sup>4</sup> Methylation Specific PCR

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته و اندازه محصولات برای ژن‌های هدف.

R: reverse ;F: forward primer ;U: unmethylated-specific primers ;M: methylated-specific primers)

اندازه محصول (bp)	توالی (5'→3')	نام پرایمر
۱۶۹	F: GGGTTTTGCGAGAGCGCG R: GCTAACAAACGCGAACCG	RASSF1A-M
۱۶۹	F: GGGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG R: CACTAACAAACACAAACCAAAC	RASSF1A-U

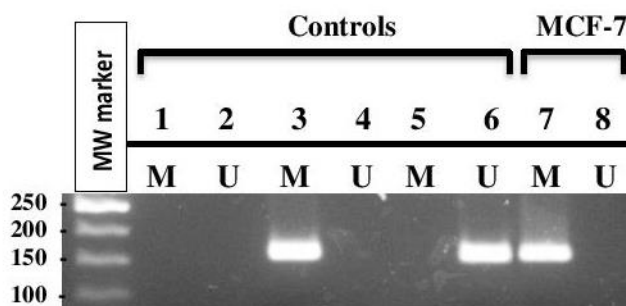
استفاده شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCRهای مربوطه بر روی ژل آگارز ۳٪ برده شدند و برای رنگ‌آمیزی نوکلئیک‌اسیدها در ژل آگارز از SYBR® Safe DNA (Invitrogen) Gel Stain استفاده گردید. همه واکنش‌های MSP حداقل سه بار تکرار شدند.

#### یافته‌ها

DNAهای تخلیص شده‌ای که نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) یا (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) آنها بین ۱/۸ تا ۲ بود (به این معنا که این DNAها برای استفاده در PCR به اندازه کافی خالص و عاری از نمک و پروتئین بودند و در مراحل مختلف استخراج آسیب چندانی به آنها وارد نشده بود)، جهت تیمار با سدیم بی‌سولفیت و انجام MSP استفاده شدند. در این مطالعه متیلاسیون یک ژن دخیل در چرخه سلولی به نام RASSF1A در رده‌های سلولی MCF-7 و 231 MDA-MB- مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جزایر CpG در نواحی پرموتری ژن‌ها یک هدف عمده برای هیپرمتیلاسیون DNA می‌باشند. با در نظر گرفتن جزیره CpG‌ای که در ناحیه پرموتر ژن RASSF1A وجود دارد، روش MSP برای تعیین وضعیت متیلاسیون پرموتر آن مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی متیلاسیون در این ژن، بعد از تیمار نمونه‌های DNA با سدیم بی‌سولفیت، به وسیله دو نوع پرایمر متیله و غیرمتیله واکنش‌های MSP انجام شدند و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۳٪ برده شدند. نتایج بدست آمده از واکنش‌های MSP در شکل ۱ قابل مشاهده‌اند.

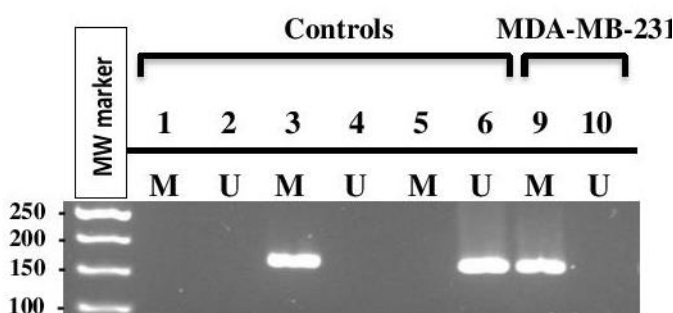
لازم به ذکر است که به منظور ارزیابی کیفیت و تأیید پرایمرها از نرم‌افزار Gene Runner و ابزارهای آنالین مانند OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator) استفاده شد. با این نرم‌افزارها ساختار ثانویه پرایمرها مورد بررسی قرار گرفته و همچنین اطلاعاتی از جمله دمای ذوب (Tm) و درصد GC پرایمرهای مستقیم و معکوس بدست آورده شد. پس از حصول اطمینان از طراحی پرایمرها، توالی آنها جهت ساخت به شرکت پیشگام بیوتکنولوژی تهران-ایران ارسال گردید.

برای انجام MSP از کیت FastStart Taq DNA Polymerase (Roche, Germany) استفاده شد. مخلوط واکنش PCR حاوی PCR buffer ۲×، PCR Grade Nucleotide Mix، MgCl<sub>2</sub> میلی‌مولار (۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، FastStart Taq DNA Polymerase (2 U)، ۱۰ پیکومول از هر جفت پرایمر و ۱۰۰-۳۰ نانوگرم DNA تیمار شده با بی‌سولفیت در یک حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می‌باشد. بعد از گذاشتن میکروتیوب‌های حاوی واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Verriti, ABI, USA)، دما و مدت زمان انجام هر یک از مراحل PCR به این ترتیب تنظیم شد: یک انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵°C و به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل یک دناتوراسیون ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵°C، ۲۵ ثانیه در دمای اتصال پرایمرها به DNA هدف (۶۴°C) برای پرایمر متیله و ۶۰°C برای جفت پرایمر غیرمتیله، یک پلیمریزاسیون ۲۵ ثانیه‌ای در دمای ۷۲°C و پس از اتمام ۴۰ سیکل یک پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲°C برای ۱۰ دقیقه. یک واکنش بدون DNA به عنوان کنترل منفی برای هر واکنش PCR



M: 169 bp

U: 169 bp



شکل ۱: بررسی MSP پروموتور ژن RASSF1A در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231.

می‌شود. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، واکنش‌های MSP نشان دادند که دی‌نوکلئوتیدهای CpG بررسی شده در هر دو رده سلولی سرطان پستان کاملاً متیله می‌باشند. این نتیجه به‌وسیله‌ی نبود باند غیرمتیله‌ی RASSF1A نیز در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 نشان داده شده است. جدول ۲ خلاصه‌ای از نتایج MSP پروموتور ژن RASSF1A را در دو رده سلولی مطالعه شده نشان می‌دهد.

### بحث

با توجه به هتروژنیسیته بالای سرطان پستان، رویکردهای درمانی متعدد فعلی، بسته به وضعیت مولکولی و میزان پیشرفت بیماری در بیماران مختلف نتایج متفاوتی دربرداشته است. از این رو با توجه به عدم وجود درمانی قطعی برای مقابله با این سرطان، لزوم درک بیشتر پایه و اساس مولکولی سرطان پستان، بررسی و شناخت بیومارکرهای تشخیصی جهت تشخیص زود هنگام و در نهایت بهبود و توسعه روش‌های نوین درمانی از ضروریات تحقیق می‌باشد (۵).

در این شکل ستون‌های ۱ و ۲ در عکس‌های هر دو ژل، کنترل منفی بدون DNA (water blank) به منظور بررسی وجود آلودگی و به ترتیب برای پرایمرهای متیله و غیرمتیله می‌باشد؛ ستون‌های ۳ و ۴، In vitro-methylated DNA (IVD) به عنوان کنترل مثبت برای آل‌های متیله RASSF1A بوده که به ترتیب با پرایمرهای متیله و غیرمتیله تکثیر شده است؛ چاهک‌های ۵ و ۶ نیز نتایج تکثیر DNA لنفوسیت فرد سالم (به عنوان کنترل مثبت برای پرایمر غیرمتیله) را به ترتیب با پرایمرهای متیله و غیرمتیله نشان می‌دهند؛ ستون‌های ۷ و ۸ نمایانگر وضعیت متیلاسیون ژن RASSF1A در رده سلولی MCF-7 در تکثیر DNA این رده به ترتیب با پرایمرهای متیله و غیرمتیله بوده و چاهک‌های ۹ و ۱۰ نیز MSP ژن RASSF1A را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای DNA متیله و غیرمتیله در رده سلولی MDA-MB-231 نشان می‌دهند. تکثیر با جفت پرایمر متیله یا غیرمتیله منجر به حضور یا فقدان یک محصول PCR بسته به وضعیت متیلاسیون دی‌نوکلئوتیدهای CpG مورد بررسی توسط جفت پرایمر

جدول ۲: نتایج بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن RASSF1A با استفاده از روش MSP در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231

نام رده سلولی	باند متیله (M)	باند غیرمتیله (U)
MCF-7	+	-
MDA-MB-231	+	-

مشخص شود تا بتوان از این یافته‌ها برای کارهای تشخیصی استفاده کرد. متیلاسیون RASSF1A یک رویداد متداول در بسیاری از سرطان‌ها، از جمله سرطان ریه، پستان، گلیوما، کارسینوم سلول کلیوی و کولورکتال (۲۸-۲۵، ۱۵) می‌باشد. براساس مطالعات قبلی (۱۴، ۱۸)، هیپرمتیلاسیون در ناحیه پروموتور این ژن در بافت سالم پستان رخ نمی‌دهد، پس متیلاسیون پروموتور RASSF1A یک پدیده خاص تومور می‌باشد. یافته‌های ما نشان می‌دهند که در هر دو رده سلولی سرطان پستان بدون در نظر گرفتن زیرگروه مولکولی آنها، پروموتور ژن سرکوب‌کننده تومور RASSF1A کاملاً متیله می‌باشد و تفاوتی میان سطح متیلاسیون این ژن در بین دو رده سلولی سرطان پستان با خاصیت تهاجمی مختلف، وجود ندارد. پس هیپرمتیلاسیون در ناحیه پروموتور این ژن شاید بتواند یک مارکر مولکولی کارآ برای شناسایی زودهنگام و جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان باشد. از طرفی می‌توان رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 را با داروهای دمتیله‌کننده مختلف تیمار کرده و پاسخ این دو رده سلولی به عوامل درمانی یکسان را با هم مقایسه کنیم. شاید این عوامل دمتیله‌کننده تأثیر شاخصی بر فرآیند متیلاسیون DNA گذاشته و با دمتیله کردن DNA در ناحیه پروموتور RASSF1A و دیگر ژن‌های متیله و غیرفعال در سرطان پستان، باعث برگشت یا افزایش بیان آن‌ها شوند.

### نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر (هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن RASSF1A در دو رده سلولی سرطان پستان با درجات بدخیمی متفاوت) و نتایج مطالعات قبلی به نظر می‌رسد که هیپرمتیلاسیون ژن RASSF1A در سرطان پستان فرآیندی متداول باشد. تعیین نقش دقیق متیلاسیون این ژن در پاتوژنز سرطان پستان به عنوان یک

از آنجایی که اختلال در تنظیم چرخه سلولی یک پیش‌نیاز ضروری برای آغاز شکل‌گیری تومور می‌باشد و با توجه به نقش رویدادهای اپی‌ژنتیکی نابه‌جا و به‌خصوص متیلاسیون نابهنجار DNA در مراحل اولیه‌ی تومورزایی (۲۱) و تبدیل سلول‌های طبیعی به وضعیت سلول‌های ناهنجار توموری (۲۲)، به نظر می‌رسد که غربالگری برای الگوهای متیلاسیون نابهنجار در پروموتور ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی، به‌عنوان رویدادهای اولیه در ایجاد و توسعه سرطان پستان، بتواند برای تشخیص سریع و زودهنگام و جلوگیری از پیشرفت سرطان در مراحل اولیه آن استفاده شود.

متیلاسیون از طریق یک تغییر کووالان پایدار روی مولکول DNA و عمدتاً در جزایر CG خاص، در ارتباط با پروموتور ژن‌های سرکوب‌گر تومور رخ می‌دهد، درحالی‌که جهش‌ها اغلب در جاهای مختلف یک ژن معین در تومورهای مجزا ظاهر می‌شوند. اغلب جزایر CpG درون پروموتور ژن‌ها در بافت‌های نرمال غیرمتیله می‌باشند و متیلاسیون آنها در برخی تومورها رخ می‌دهد که سبب سرکوب بیان ژن‌های بازدارنده تومور می‌شود (۲۳). با توجه به این دلایل هیپرمتیلاسیون DNA به‌عنوان یک بیومارکر نویدبخش برای کاربردهای بالینی در مدیریت سرطان معرفی شده است (۲۴). یک وجه تمایز مهم دیگر بین تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سرطان این است که تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA برگشت‌پذیر بوده و به‌وسیله استفاده از مداخلات درمانی می‌توانند برگردانده شوند و به همین جهت اهداف درمانی مهمی محسوب می‌شوند. پس اپی ژنتیک با ایجاد تغییرات برگشت‌پذیر راه نوینی را برای درمان انواع تومورها باز کرده است (۹).

سعی ما بر این بوده است که با انجام این طرح یکی از ژن‌های چرخه سلولی که در سرطان پستان دارای متیلاسیون نابهنجار در ناحیه پروموتور خود می‌باشد،

درمانی با ایجاد تغییرات در الگوی متیلاسیون نابهنجار DNA ممکن است بتوانند یک کاندیدای مناسب برای درمان سرطان پستان به‌خصوص سرطان‌های پستان Triple-negative بوده و در کاهش مرگ‌ومیر بیماران مؤثر باشند.

ژن بازدارنده تومور به انجام مطالعات گسترده‌تری نیاز دارد. با توجه به برگشت‌پذیر بودن متیلاسیون DNA، بررسی وضعیت متیلاسیون تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی و دیگر ژن‌های مهم در کارسینوم‌ز پستان و شناسایی ژن‌های هیپرمتیل‌می‌توانند در کشف و توسعه داروهای هیپومتیل‌کننده کارآمد، تأثیرگذار باشند. این عوامل

## References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5):E359-86.
3. Mousavi SM, Harirchi I, Ebrahimi M, Mohagheghi MA, Montazeri A, Jarrahi AM, et al. Screening for breast cancer in Iranian a challenge for healthy policy markes. *Breast J* 2008; 14(6):605-6.
4. Attarian H, Pirzadeh A, Rezvani H, Esfahani F, Tabarrai M, Ghadiani M. Clinico-pathologic manifestations of Iranian patients with breast cancer. *Pak J Med Sci* 2011; 27 (1):182-5.
5. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 360(8):790-800.
6. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006; 10(6):515-27.
7. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. See comment in PubMed Commons below *J Biochem Mol Biol* 2003; 36(1):60-5.
8. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(7):2776-8.
9. Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 2007; 23(8):413-8.
10. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(24): 11995-9.
11. Daniel FI, Cherubini K, Yurgel LS, de Figueiredo MA, Salum FG. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* 2011; 17(4):677-87.
12. Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res* 2008; 642(1-2):1-13.
13. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers* 2007; 23(1-2):73-87.
14. Jiang Y, Cui L, Chen WD, Shen SH, Ding LD. The prognostic role of RASSF1A promoter methylation in breast cancer: a meta-analysis of published data. *PLoS One* 2012; 7(5):e36780.
15. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25(3):315-9.
16. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 2002; 22(12):4309-18.
17. Donniger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 18):3163-72.
18. Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B,

- et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(9):691-9.
19. Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-Association Domain Family 1 Tumor Suppressor Gene in Human Cancers. *Cancer Res* 2005; 65(9):3497-508.
20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
21. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(11):1148-59.
22. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128(4):683-92.
23. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48(5):880-8.
24. Widschwendter M, Jones PA. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8(1):17-21.
25. 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.
26. Hesson L, Bièche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 2004; 23(13):2408-19.
27. Morrissey C, Martinez A, Zatyka M, Agathangelou A, Honorio S, Astuti D, et al. Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61(19):7277-81.
28. van Engerland M, Roemen GM, Brink M, Pachen MM, Weijnenberg MP, de Bruïne AP, et al. K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene* 2002; 21(23):3792-5.