مقاله پژوهشی

بررسی متیلاسیون جزایر CpG واقع در نواحی پروموتر ژن *P16/Ink4* و تأثیر پلی‌مورفیسم اینترلوکین ۱۷ بر این متیلاسیون در بیماران مبتلا به سرطان پستان

سیروس نعیمی*

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۸/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات نشان داده است که افزایش متیلاسیون در جزایر CpG یا (CIHM،CpG island hyper methylation)، یکی از مکانیسم‌های مهم در خاموش شدن ژن است. پروتئین P16/Ink4 نقش مهمی را در فرآیند تنظیم منفی سیکل سلولی ایفا می‌نماید. التهاب، ازجمله عواملی است که بر متیلاسیون ژن‌ها تأثیرگذار بوده و اینترلوکین ۱۷ می‌تواند نقش مهمی در این مورد داشته باشد. ژن این سایتوکاین، دارای چندین پلی‌مورفیسم است که بر میزان بیان این سایتوکاین دخالت دارد. با توجه به مطالب گفته‌شده، هدف از این تحقیق بررسی پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ بر متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4* و ارتباط آن با بیماری سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق موردی – شاهدی که در مهرماه ۱۳۹۴ انجام گرفت، از بافت سرطانی ۴۰ بیمار مبتلا به بیماری سرطان پستان و ۴۰ زن سالم، DNA استخراج گردید. جهت بررسی پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷، از روش PCR-RFLP و جهت بررسی متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4*، از روش MSPCR استفاده گردید.

نتایج: نتایج نشان دادند که، میان عدم متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4* و مقاومت نسبت به بیماری ارتباط معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). از طرف دیگر ارتباط معنی‌داری میان پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ و متیلاسیون ژن *P16/Ink4* مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که عدم متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4* با احتمال مقاومت به ابتلا به این بیماری در ارتباط است.

کلمات کلیدی: پلی مورفیسم، سرطان پستان، اینترلوکین ۱۷، متیلاسیون، *P16/Ink4*

مقدمه

دومین سرطان شایع بعد از سرطان ملانومایی در ایالات‌متحده امریکا، سرطان پستان است که دومین عامل مرگ‌ومیر زنان در این کشور محسوب می‌گردد (۱). بر اساس مطالعات انجام‌شده، در ایران، سالانه حدود شش تا یک‌صد و شش نفر به این بیماری مبتلا می‌گردند و این بیماری، عامل مرگ ۱۰۶۳ نفر در سال است (۲). سرطان یک بیماری ژنتیکی است که تغییرات ژنی چندگانه و پیاپی باعث بروز آن می‌شود. در اثر وقوع جهش ژنی جبران‌ناپذیر در سلول، سیستم‌های کنترلی سلول فعال‌شده و نهایتاً سلول جهش‌یافته به‌واسطه فرآیند آپوپتوزیس از بین می‌رود. اپی ژنتیک به معنای تغییر در بیان ژن بدون تغییر در سکانس ژن است. اپی ژنتیک نقش‌های متعددی در فرآیندهای بیولوژیکی ایفا می‌کند که ازجمله می‌توان به غیرفعال شدن کروموزوم X، تداخل RNA و برنامه‌ریزی مجدد ژنومی در خلال تمایز که منجر به خاموش شدن ژن می‌گردد، اشاره نمود (۳). نقصان در هر یک از این عملکردها ممکن است منجر به اختلالاتی در انسان گردد که ازجمله این اختلالات می‌توان به سرطان پستان اشاره نمود. نشان داده شده است که سرطان پستان، همچون دیگر سرطان‌ها با تغییرات اپی ژنتیکی همراه است که این تغییرات، بدون این‌که تغییری در توالی اولیه DNA به وجود آورند (۴، ۵)، باعث تغییر در تنظیم غیرطبیعی فاکتورهای نسخه‌برداری و به دنبال آن تغییر در تکثیر سلولی، بقای سلولی و همچنین تمایز سلولی می‌گردد (۸-۵). در سلول‌های ترانسفورم شده به سلول‌های سرطانی، تغییرات اپی ژنتیکی در سطح کروموزومی رخ می‌دهد که ازجمله می‌توان به

*نویسنده مسئول: **سیروس نعیمی**، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
E-mail:naeimis@kau.ac.ir

متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و تغییرات به وجود آمده در عملکرد و بیان فاکتورهای دخیل در تنظیم فرآیندهای بازآرائی نوکلئوزوم، اشاره نمود (۳، ۷، ۹ و ۱۰). در حدود ۶-۳ درصد از واحدهای سیتوزین در پستانداران متیله است. این متیلاسیون باعث تأثیر بر روی بیان ژن می‌گردد، خصوصاً وقتی‌که این دای نوکلئوتیدها در جزایر CpG (CpG Island) در نواحی پروموتری، واقع‌شده باشند متیلاسیون DNA باعث ناپایداری ژنتیکی گردیده و می‌تواند منجر به ایجاد سرطان شود. بااین‌حال ذکر این نکته ضروری است که همه جزایر CpG CpG (Island) در نواحی پروموتری قرار نداشته و تعدادی از آن‌ها در بدنه ژنی واقع‌شده‌اند که متیله شدن این نواحی می‌تواند باعث افزایش نسخه‌برداری گردد (۱۱) که این کار به چند طریق ممکن است انجام پذیرد. در اولین روش ۵ متیل سیتوزین ممکن است دآمینه شده و باعث ایجاد یک موتاسیون نقطه‌ای از نوع جابجایی پورین، پورین گردد[1] که این اتفاق در فاکتور P53 که یک ژن سرکوب‌کننده تومور است، رخ می‌دهد (۱۲). همین اتفاق در چندین ژن دیگر از قبیل رتینوبلاستوما و c-H-ras-1 نیز اتفاق می‌افتد (۱۳). مکانیسم پیشنهادی دیگر به این صورت است که اپی ژنتیک با متیلاسیون پروموتر چند ژن دخیل در سرطان می‌تواند باعث ناپایداری ژنتیکی شده و منجر به ایجاد بیماری گردد (۱۴) مثلاً متیلاسیون فاکتور *MLH1* (ژن دخیل در mismatch repair) باعث ایجاد فنوتیپ MIN+ در سرطان قولون، گاستریک و اندومتریال می‌گردد (۱۵). از مولکول‌های دخیل در تنظیم سیکل سلولی می‌توان به پروتئین P16(INK4a) اشاره نمود. پروتئین ARF یا P14/ARF یک فرم نسخه‌برداری آلترناتیو از لوکوس مهارکننده سرطان، یعنی *ARF/INK4a* است (۱۶). این لوکوس ژنی باعث کد دهی پروتئین P16(INK4a) می‌شود که در اصل یک مهارکننده کیناز وابسته به سیکلین‌ها است. بسته به این‌که اگزون شماره یک لوکوس ژنی ذکرشده توسط کدام پروموتر نسخه‌برداری شود، منجر به ایجاد نسخه‌برداری آلترناتیو گردیده و باعث ساخته‌شدن پروتئین‌های ذکرشده می‌گردد (۱۷). پروتئین‌های سرکوب‌کننده ARF، باعث سرکوب رشد سلولی از مسیر P53 می‌گردد. القا P53 توسط ARF از طریق دو آنزیم لیگاز به نام‌های mdm2 و ARF/BPI صورت می‌گیرد. هر دو این فاکتورها به‌عنوان یک لیگاز یوبی کوتئیته کننده اختصاصی E3 برای فاکتور P53 عمل می‌کند که در بسیاری از تیپ‌های سرطانی افزایش می‌یابد (۱۷، ۱۸). از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهد که التهاب با تأثیر بر روی محیط اطراف تومور باعث تکثیر، مهاجرت و پایداری سلول‌های توموری می‌گردد (۱۹). IL17 برجسته‌ترین سایتوکاین ترشح‌شده از سلول‌های Th17 است. این سایتوکاین یکی از سایتوکاین‌های پیش التهابی است که در بیماری‌های خودایمنی انسان و موش، نقش ایفا می‌کند. خانواده IL-17 نقش مهمی در پاسخ‌های نرمال ایمنی و بیماری‌های ایمونولوژیک دارند. خانواده IL-17 دارای 6 عضو IL-17 A-F است (۲۰). افزایش بیان شدت این سایتوکاین در سلول‌های اپیتلیال ریه منجر به التهاب راه‌های هوایی و هیپر پلازی مخاطی می‌شود (۲۱). این سایتوکاین به‌وسیله سلول‌های ارتشاح یافته به محل تومور[2] (TIL) تولید می‌شود و خاصیت تومورزایی تومورهای گردنی را در موش‌های Nude افزایش می‌دهد (۲۲). ژن *IL-17A* و *IL-17F* بر روی کروموزوم P12 6 قرار گرفته. همراهی پلی‌مورفیسم ژن *IL17 A G197A (rs2275913)* و *IL17F A7488G (rs763780)* موجود در پروموتور ژن این سایتوکاین‌ها در بیماری‌هایی از قبیل روماتیسم مفصلی، التهاب قولون، سرطان معده و سرطان ریه گزارش شده است (۲۶-۲۳).

با توجه به اهمیت نقش ژن *P16/Ink4* در تنظیم سیکل سلولی و نقش التهاب در متیلاسیون این ژن و همچنین پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ در بیان مولکول مربوطه، در این مطالعه به بررسی متیلاسیون ژن *P16/Ink4* و ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۷ با متیلاسیون ژن *P16/Ink4* در بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداخته شد.

مواد و روش ها

گروه موردمطالعه شامل ۴۰ نفر مبتلا به سرطان پستان با میانگین سنی ۱۱/۶±۴۹/۳ بود که در طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳ به بیمارستان‌های شهید فقیهی و نمازی شیراز مراجعه نموده و ابتلای به سرطان آن‌ها با بررسی‌های پاتولوژیک تائید شده بود. گروه کنترل شامل ۴۰ نفر با میانگین سنی ۱۲/۹±۵۱/۸ که ازنظر سن با گروه بیمار مطابقت داشتند و فاقد

1. Transition mutation
2. Tumor Infiltrating Lymphocytes

هرگونه سابقه سرطان و بیماری‌های خودایمنی در خود و بستگان درجه اول خود بودند. در این بررسی، تمامی شرایط اخلاقی پزشکی رعایت گردید و از بیماران رضایت‌نامه کتبی گرفته شده است. حجم نمونه با استفاده از نرم‌افزار GPower 3.1.9.2 محاسبه گردید. حجم نمونه لازم برای آزمون مجذور کای (x^2)، تفاوت نسبت وجود پلی‌مورفیسم موردنظر در دو گروه مستقل (گروه‌های مورد و شاهد) محاسبه گردید. شیوع پلی‌مورفیسم موردنظر در جمعیت گروه کنترل ۱۰٪ در نظر گرفته شد. میزان خطای آلفا و بتا به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۱۰ در نظر گرفته شد. حجم نمونه موردنظر برای تعیین تفاوتی برابر ۱۰٪ در دو جمعیت مورد و شاهد حدود ۴۰ نفر در هر گروه محاسبه گردید. جهت استخراج DNA از بافت پارافینه فریز شده افراد مبتلا به سرطان پستان استفاده گردید. به این صورت که بافت‌های جراحی‌شده توسط متخصص جراحی در فرمالین قرار داده شده و سپس در آزمایشگاه آسیب‌شناسی مبادرت به پارافینه نمودن بافت‌های مذکور نموده و با استفاده از دستگاه میکروتوم قطعاتی از بافت مذکور برش خورده و نهایتاً تا انجام مرحله استخراج در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد، نگهداری گردید. در ادامه با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت، ساخت شرکت پارس سنتر، مبادرت به استخراج DNA شد. اساس کارکرد این کیت بر پایه کروماتوگرافی تعویض یونی طراحی شده است. در مورد افراد کنترل، از بافت افرادی که برای جراحی‌های زیبایی مراجعه کرده بودند، استفاده گردید.

متیلاسیون اختصاصی زنجیره‌ای پلی مراز برای تعیین متیلاسیون جزایر CpG در پروموتر ژن *P16/Ink4* برای بررسی متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون ژن *P16/Ink4*، از روش متیلاسیون اختصاصی زنجیره‌ای پلی مراز استفاده گردید (MSPPCR[3]). در این روش ابتدا، ژنوم افراد موردمطالعه با استفاده از کیت بیوسولفیت ساخت شرکت QIAGEN آلمان با (Lot No: 142339708) و با توجه به نحوه دستورالعمل کیت، آماده‌سازی گردید؛ که در انتها، این اعمال باعث شدند که بازهای آلی سیتوزینی که متیله شده، دست‌نخورده باقی‌مانده ولی اگر متیله نشده باشند به باز آلی اوراسیل تبدیل گردند. برای بررسی متیلاسیون نواحی پروموتور ژن *P16/Ink4* از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. لازم به ذکر است که برای هر ژن نیاز به دو زوج پرایمر اختصاصی بود. یکی برای بررسی متیلاسیون و دیگری برای بررسی عدم متیلاسیون. همچنین برای کنترل مثبت و منفی متیلاسیون واکنش‌های انجام‌شده از نمونه‌های کنترل منفی Human HCT116DKO با (Lot N: ZRC174904) ساخت شرکت Zymoresearch آمریکا و برای کنترل مثبت آن از نمونه کنترل مثبت Human HCT116DKO با (Lot N: ZRC175286) ساخت شرکت Zymoresearchآمریکا، استفاده شد. جهت واکنش MSPCR برای هر نمونه نیاز به دو تیوب جداگانه برای بررسی متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون ژن‌های موردمطالعه برای هر فرد است که محتویات و مقادیر هر تیوپ اپندورف مشابه هم بوده، منتها پرایمرهای اختصاصی آن‌ها متفاوت بود. توالی پرایمرهای مورداستفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. برای انجام واکنش در هر تیوب، ۹/۶۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۴۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۶

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش MSPPCR ژن *P16/ Ink4*

نام پرایمر	سکانس پرایمر	
5'TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC3'	p16	*MF
5'GACCCCGAACCGCGACCGTAA3'	p16	* MR
5'TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT3'	p16	*UMF
5'CAACCCCAAACCACAACCATAA3'	p16	*UMR

*MF: Methylation Forward, *MR: Methylation Reversed, *UMF: Unmethylation Forward, *UMR: Unmethylation Reversed

3. Methylation specific PCR

میکرولیتر آغازگر رفت، ۰/۶ میکرولیتر آغازگر برگشت، یک میکرولیتر DNA الگو و ۲ میکرولیتر آنزیم استفاده شد. برنامه PCR با دمای اتصالی با ۵۵/۸ درجه سانتی‌گراد جهت متیلاسیون و ۵۳ درجه سانتی‌گراد جهت بررسی عدم متیلاسیون و با ۳۲ سیکل انجام گرفت. پس از پایان واکنش MSPCR، ۷ میکرولیتر از محصول PCR برداشته شد و با ۴ میکرولیتر، loading dye مخلوط گردیده و در ژل آگارز ۲ درصد حاوی ژل رد در بافر TAE[4] با غلظت یک برابر، با ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز شد. برای تعیین ژنوتیپ ژن اینترلوکین ۱۷ افراد موردمطالعه از روش PCR - RFLP استفاده شد. قطعات DNA حاوی هر جایگاه با ترموسایکلر قرارگرفته و قطعات موردنظر با دمای هم سرشته شدن (annealing temperature) برابر ۶۵ درجه سانتی‌گراد و تعداد ۳۰ سیکل تکثیری، تکثیر گردیدند. سپس محصولات PCR به ترتیب تحت تأثیر آنزیم‌های محدودکننده XagI و NlaIII و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفتند. محصولات حاصل از شکست آنزیمی، در ژل آگارز ۲ درصد تحت تأثیر نیروی الکتروفورز از هم جدا شدند. مقادیر و نحوه انجام واکنش و قطعات حاصل از هضم آنزیمی در جدول ۲ آمده است. مطالعه آماری با استفاده از برنامه‌های آماری SPSS 15 و EPI Info 2000 و آرلی کویین و با آزمون‌های مجذور کای (x^2)[5] و

جدول ۲- دمای هم سرشته شدن، آنزیم‌های محدودکننده و جایگاه شکست این آنزیم‌ها و قطعات حاصل از شکست آنزیمی

قطعات حاصل از شکست	جایگاه شناسایی	آنزیم محدودکننده	دمای هم سرشته شدن	پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی
GG (68 and 34 bp) GA(102, 68 and 34 bp) AA (102 bp)	5'...CCTNN↓NNNAGG...3' 3´…GGANNN↑NNTCC…5´	XagI	65	IL-17A G197A rs2275913
AA (63 and 80 bp) AG (143, 80 and 63bp) GG (143 bp)	5'...CATG↓...3' 3´…↑GTAC …5´	NlaIII	65	IL-17F A7488G rs763780

استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شدند جهت موقعیت *IL-17A G197A* از زوج پرایمر Forward primer: 5-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3 و Reverse primer: 5-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3 و جهت موقعیت *IL-17F A7488G* از پرایمرهای Forward primer: 5-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3 و Reverse primer: 5-GGTAAGGAGTGGCATTTCTA-3 استفاده گردید که قطعات حاصل از انجام واکنش به ترتیب ۱۰۲ و ۱۴۳ جفت باز است. برای انجام واکنش PCR برای هر دو موقعیت به هر تیوب ۱۱/۱ میکرولیتر آب، ۱/۷ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت ۲۵ میلی مولار، ۰/۶ میکرولیتر از مخلوط ۱۰ میلی مولار dNTP، ۰/۶ میکرولیتر Forward Primer، ۰/۶ میکرولیتر Reverse Primer که پرایمرها با غلظت (۲۰ پیکومولار) بودند، ۰/۷ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۰/۳ میکروگرم/ میکرولیتر و ۱/۵ میکرولیترآنزیم Taq پلی مراز با غلظت (۱u/µl) افزوده شد. تیوب‌ها در دستگاه فیشر Kappa بسته به مورد انجام گرفت. برای بررسی اینکه گروه‌های موردمطالعه در جایگاه‌های موردبررسی از تعادل هاردی واینبرگ تبعیت می‌کنند یا خیر از آزمون آماری مربع کای و برنامه آرلی کویین ویرایش ۲۰۰۰ استفاده شد که بر اساس این نتایج می‌توان اظهار کرد که جایگاه‌های موردبررسی در این مطالعه در تعادل هاردی _ واینبرگ قرار دارد (P>۰/۰۵).

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش MSPCR در مورد ژن *P16/Ink4* و با شرایط ذکرشده در قسمت مواد و روش‌های آزمایش منجر به تولید محصولی به طول ۱۵۰ جفت باز به‌عنوان پروموتر متیله شده و ۱۵۱ جفت باز به‌عنوان پروموتری که متیلاسیون در آن رخ نداده است، گردید. نتایج حاصله از تست Chi square با استفاده از نرم‌افزار Spss برای بررسی ارتباط میان متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4* استخراج‌شده از بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل، مؤید این مطلب بود که میان متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4* و مقاومت به بیماری ارتباط

4 .Tris base, acetic acid and EDTA
5. Chi-Square

معنی‌داری وجود دارد بدین‌صورت که عدم متیلاسیون پروموتر ژن مذکور در افراد کنترل، افزایش چشمگیری را نسبت به بیماران مبتلا به سرطان نشان می‌دهد. نتایج حاصله در جدول ۳ آورده شده است. در ادامه تجزیه‌وتحلیل اطلاعات به بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن *IL-17A G197A* و *IL17 F A7488G* بر متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4* استخراج‌شده از بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداخته شد. نتایج حاصله نشانگر این مطلب بود که میان پلی‌مورفیسم‌های ذکرشده با میزان متیلاسیون پروموتر ژن *P16/Ink4* ارتباط معنی‌دار وجود نداشته است (P>۰/۰۵). (جداول ۴ و ۵).

بحث و نتیجه گیری

سرطان یک بیماری ژنتیکی است که تغییرات ژنی چندگانه و پیاپی باعث بروز آن می‌شود. امروزه سرطان بعد از بیماری‌های قلبی دومین علت مرگ‌ومیر انسان به‌واسطه بیماری است. به‌استثنای موارد معدودی از سرطان‌ها که به‌واسطه یک جهش خاص ایجاد می‌شوند، عمده این بیماری‌های بدخیم با تغییرات ژنتیکی زمینه‌ای متعدد همراه هستند. این تغییرات به‌طور غیرمستقیم زمینه بروز سرطان را ایجاد می‌نمایند یا با تضعیف سیستم ایمنی و تقویت تهاجم تومور به پیشرفت آن کمک می‌کنند (۲۷). مطالعات نشان می‌دهد که رخ دادن متیلاسیون

جدول ۳- مقایسه متیلاسیون پروموتر ژن *P16/ Ink4* در بیماران و گروه کنترل

P16/ Ink4	افراد موردمطالعه		Pv
	بیماران	گروه کنترل	
M	۷(٪۱۷/۵)	۸(٪۲۰)	۰/۳
UM	۵(٪۱۲/۵)	۱۳(٪۳۲/۵)	۰/۰۱
M/UM	۲۸(٪۷۰/۰)	۱۹(٪۴۷/۵)	۰/۱
Total	۴۰	۴۰	

M: methylation; UM: un methylation

جدول ۴- بررسی پلی‌مورفیسم ژن *IL-17A G197A* بر متیلاسیون پروموتر ژن *P16/ Ink4* در بیماران

IL-17A	P16/ Ink4				Pv
	M	UM	M/UM	Total	
AA	۱۵	۹	۴	۲۸	۰/۳۳
AG	۸	۱	۲	۱۱	
Total	۲۳	۱۰	۶	۳۹	

M: methylation; UM: un methylation

جدول ۵- بررسی پلی‌مورفیسم ژن *IL17 F A7488G* بر متیلاسیون پروموتر ژن *P16/ Ink4* در بیماران

IL-17F	P16/ Ink4				Pv
	M	UM	M/UM	Total	
GG	۷	۸	۷	۲۱	۰/۶۶
GA	۷	۳	۴	۱۵	
AA	۱	۲	۱	۴	
Total	۱۴	۱۳	۱۲	۴۰	

M: methylation; UM: Un methylation

نامناسب در نواحی جزایر CpG که غیر متیله می‌باشند، منجر به نامیرا شدن و ترانسفورم شدن سلول‌ها می‌شود (۲۸)؛ که این کار، از طریق غیرفعال شدن نسخه‌برداری ژن‌های سرکوب‌کننده تومور، انجام می‌گیرد (۳۱-۲۹). بنابراین نقشه‌برداری از الگوهای متیلاسیون در جزایر CpG، می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مهم در درک وقایع بیان ژن در سلول‌ها، هم در حالت نرمال و هم در حالت پاتولوژیکی (مثل سرطان) مورداستفاده قرار گیرد. در مطالعه‌ای که در ایران توسط ایرانشاهی و همکاران بر روی سرطان پستان انجام گرفته شده است، به این نتیجه رسیده‌اند تغییرات اپی ژنتیکی ژن‌های E-cadherin و ER-α، ازجمله عوامل مؤثر در ایجاد این بیماری است (۳۲). نشان داده شده است که افزایش متیلاسیون در جزایر CpG یا (CpG island CIHM:hyper methylation)، یکی از مکانیسم‌های مهم در خاموش شدن ژن است. در بسیاری از سرطان‌ها، ژن‌های مختلفی دچار این CIHM می‌گردند (۳۳). مطالعات نشان‌دهنده این موضوع است که در سرطان‌های زیادی ازجمله سرطان پستان و معده، ژنوم فاکتورهای تنظیمی *DAP-Kinase, CDH1, p16/INK4a* و *p14/ARF* با افزایش متیلاسیون همراه بوده است که این فاکتورها در تنظیم منفی سیکل سلولی از طریق تأثیر بر مسیر فاکتورهای رتینوبلاستوما و فاکتور P53 به ترتیب دخالت دارند (۳۴). از طرف دیگر، مطالعات انجام شده نشان‌دهنده این موضوع است که التهاب و ایجاد واکنش‌های اکسیداتیو در سلول‌ها می‌تواند منجر به افزایش متیلاسیون DNA شود (۳۵). خانواده اینترلوکین ۱۷ (IL-17) که به‌عنوان فاکتورهای پیش التهابی عمل می‌نمایند، شامل گروهی از پروتئین‌های سایتوکاینی می‌باشند که مهم‌ترین و شناخته‌ترین آن‌ها شامل IL-17A و IL-17F است (۳۶). در این تحقیق ما به بررسی متیلاسیون پروموتر ژن P16/*INK4* استخراج‌شده از بافت توموری افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل پرداختیم. نتایج نشان‌دهنده این مطلب است که تفاوت معنی‌داری در میزان عدم متیلاسیون در پروموتر ژن مذکور در افراد سالم نسبت به افراد مبتلا به سرطان پستان وجود دارد که این منجر به افزایش بیان این ژن می‌گردد؛ و با توجه به این مطلب که پروتئین P16/INK4، ازجمله فاکتورهای دخیل در تنظیم سیکل سلولی و سرکوب‌کنندگی سلول‌های توموری از مسیر فاکتور P53 نقش مهمی را ایفا می‌نماید، به نظر می‌رسد که متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون پروموتر این ژن می‌تواند نقش مهمی در مقاومت و یا مستعد شدن افراد به بیماری سرطان پستان را ایفا نماید. از طرف دیگر، تأثیر فاکتور التهابی اینترلوکین ۱۷ بر روی متیلاسیون پروموتر ژن *P14/ARF*، مؤید این نکته بوده که فاکتورهای التهابی مذکور، نقش مؤثری در افزایش متیلاسیون پروموتر ژن‌های تنظیمی سیکل سلولی را ایفا نمی‌نماید. مطالعات انجام‌شده قبلی هم براین موضوع صراحت دارد که افزایش متیلاسیون در پروموتر ژن‌ها با کاهش بیان این ژن‌ها در ارتباط است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ و با استفاده از روش Micro array بر روی خون محیطی ۱۴ نفر از بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام گردید، مشاهده شد که از بین ۱۷ ژن کاندید در سرطان پستان که موردبررسی قرار گرفت، میزان متیلاسیون ATM با بیماری ارتباط مستقیمی داشته و این‌طور استنباط گردید که می‌توان از آن به‌عنوان یک بیومارکر استفاده نمود (۳۷). Askari و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که افزایش متیلاسیون ژن‌های *P14/ARF* و *P16/Ink4* با بیماری سرطان پستان در ارتباط است (۳۸). Manel و همکاران در سال ۱۹۹۹ در سرم و پلاسمای افراد مبتلا به سرطان ریه به دنبال ژن متیله شده P16 بوده و با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، این‌طور پیشنهاد نمودند که می‌توان از آن به‌عنوان یک بیو مارکر برای تشخیص استفاده نمود (۳۹). Tao و همکاران در سال ۲۰۱۱ به اثر دریافت ویتامین‌های خانواده B بر روی تغییرات متیلاسیون ایجادشده بر روی ژنوم *P16, E-cadherin* پرداخته و با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، این‌طور استنباط کردند که دریافت این ویتامین‌ها، تأثیری بر روی میزان متیلاسیون این ژن‌ها نداشته است (۴۰). در مطالعه انجام شده توسط Tao و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی ارتباط توده بدنی با متیلاسیون ژن‌های *p16, E-cadherin* در سرطان پستان پرداخته و با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، استنباط نمودند که توده بدنی و میزان بافت چربی می‌تواند در متیلاسیون ژن‌های مذکور در سنین یائسگی دخیل باشد (۴۱). در این تحقیق برای اولین بار به بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ بر روی متیلاسیون ژن *P16/INK4* پرداخته شد که تاکنون در این مورد تحقیقی صورت نگرفته است. تنها مورد انجام شده توسط تاهارا و همکاران بوده که به این موضوع در بیماری سرطان معده پرداخته و نتایجی مشابه با نتایج این تحقیق به‌دست‌آمده است (۴۲). در مطالعه دیگری که توسط تومی یاسو و همکاران در سرطان معده انجام گرفته شده است، محققین به این نتیجه

رسیدند که پلی مورفیسم اینتر لوکین ۱۷ بر روی متیلاسیون ژن‌های *DAP-Kinase* و *E-cadherin* تأثیرگذار بوده است (۴۳). درمجموع با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، به نظر می‌رسد که عدم متیلاسیون در پروموتر ژن *P16/INK4*، احتمالاً می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن مذکور در افراد کنترل گردیده که این امر ممکن است باعث مقاومت افراد به بیماری سرطان پستان گردد از طرف دیگر با توجه به نقش التهاب در ایجاد متیلاسیون ژن‌ها، به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ (به‌عنوان یک سایتوکاین التهابی)، نقش مهمی را در متیلاسیون پروموتر ژن *P16/INK4* ایفا نمی‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی، تشکر و قدردانی صورت می‌پذیرد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012.CA Cancer J Clin. 2012;62(1):10-29.
2. Asgarian F, Mirzaei M, Asgarian S, Jazayeri M. Epidemiology of Breast Cancer and the Age Distribution of Patients over a Period of Ten Years. IJBD. 2016;9(1):31-6.
3. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome-components and functional correlates. Genes & development. 2006;20(23):3215-31..
4. Gerstung M, Eriksson N, Lin J, Vogelstein B, Beerenwinkel N. The temporal order of genetic and pathway alterations in tumorigenesis. PLoS One. 2011;6(11):e27136..
5. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. Oncogene. 2002;21(35):5462-82.
6. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. J Clin Invest. 2007;117(11):3155-63..
7. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nature reviews Cancer. 2006;6(2):107-16.
8. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nature reviews Genetics. 2007;8(4):286-98.
9. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature reviews Genetics. 2002;3(6):415-28..
10. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007;128(4):683-92.
11. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet. 2012;13(7):484-92.
12. Magewu AN, Jones PA. Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. Molecular and cellular biology. 1994;14(6):4225-32..
13. Ghazi H, Magewu AN, Gonzales F, Jones PA. Changes in the allelic methylation patterns of c-H-ras-1, insulin and retinoblastoma genes in human development. Dev Suppl. 1990:115-23.
14. Herman JG, Baylin SB. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. Curr Top Microbiol Immunol. 2000;249:35-54..
15. Esteller M, Catasus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, et al. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. The American journal of pathology. 1999;155(5):1767-72..
16. Duro D, Bernard O, Della Valle V, Berger R, Larsen CJ. A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. Oncogene. 1995;11(1):21-9.
17. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. Mutation research. 2005;576(1-2):22-38..
18. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. Cell. 2005;121(7):1085-95..
19. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nature immunology. 2005;6(11):1133-41..
20. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. The Journal of experimental medicine. 2008;205(5):1063-75..
21. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. Cancer Res. 1999;59(15):3698-704..
22. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. The Journal of biological chemistry. 1998;273(42):27467-73.

23. Shibata T, Tahara T, Hirata I, Arisawa T. Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis. Hum Immunol. 2009;70(7):547-51..
24. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, et al. Association between IL-17A,17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer. International journal of molecular medicine. 2010;25(3):471-7.
25. Wu X, Zeng Z, Chen B, Yu J, Xue L, Hao Y, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. International journal of cancer Journal international du cancer. 2010;127(1):86-92..
26. Zhou B, Zhang P, Wang Y, Shi S, Zhang K, Liao H, et al. Interleukin-17 gene polymorphisms are associated with bladder cancer in a Chinese Han population. Mol Carcinog. 2013;52(11):871-8.
27. Turnpenny P, Ellard S. Emery`s elements of medical genetics.13th,United Kingdome,Elsvier, 2017:322-3.
28. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(24):11995-9..
29. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(21):9700-4..
30. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, 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..
31. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. Cancer Res. 1996;56(4):722-7..
32. Iranshahi N, Zafari P, Yari KH, Alizadeh E. The most common genes involved in epigenetics modifications among Iranian patients with breast cancer: A systematic review. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2016;62(12):116-122.
33. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. Nature genetics. 1994;7(4):536-40..
34. Rizos H, Darmanian AP, Mann GJ, Kefford RF. Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization. Oncogene. 2000;19(26):2978-85..
35. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. Curr Top Microbiol Immunol. 2000;249:101-18.
36. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. The Journal of allergy and clinical immunology. 2004;114(6):1265-73.
37. Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, Tang T, Sun P, Johnson N, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. Human molecular genetics. 2009;18(7):1332-42..
38. Askari M, Sobti RC, Nikbakht M, Sharma SC. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes (p14/ARF and p16/INK4a): case-control study in North Indian population. Molecular biology reports. 2013;40(8):4921-8..
39. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. Cancer Res. 1999;59(1):67-70..
40. Tao MH, Mason JB, Marian C, McCann SE, Platek ME, Millen A, et al. Promoter methylation of E-cadherin, p16, and RAR-beta(2) genes in breast tumors and dietary intake of nutrients important in one-carbon metabolism. Nutrition and cancer. 2011;63(7):1143-50..
41. Tao MH, Marian C, Nie J, Ambrosone C, Krishnan SS, Edge SB, et al. Body mass and DNA promoter methylation in breast tumors in the Western New York Exposures and Breast Cancer Study. The American journal of clinical nutrition. 2011;94(3):831-8..
42. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, et al. Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. Int J Mol Med. 2009;24(4):563-9..
43. Arisawa T, Tahara T, Tsutsumi M, Shibata T. Influence of IL17A polymorphisms on the aberrant methylation of DAPK and CDH1 in non-cancerous gastric mucosa. BMC Med Genet. 2012;13:59.

Original Article

Investigating CpG islands Methylation in *P16/Ink4* Gene Promoter Regions and the Effect of *Interleukin-17* Gene Polymorphism on this Methylation in Patients with Breast Cancer

Naeimi S*

Department of Genetics, Colleague of science, Kazerun branch,Islamic Azad University,Kazerun, Iran

Received: 16 Apr 2017 Accepted: 01 Nov 2017

Abstract

Background & objective: Studies have shown that increased methylation of CpG islands is one of the important mechanisms in gene silencing. Protein P16 / Ink4 plays an important role in the negative regulator of cell cycle process. Inflammation, including factors that affect gene methylation and IL-17, as an inflammatory cytokine, can play a role in this case. This cytokine gene has several polymorphisms which are involved in the expression of it. According to the statement, the purpose of this study is to investigate IL-17 gene polymorphism on gene promoter methylation of *P16 / Ink4* and its relation to breast cancer diseases.

Material & Methods: In this case - control study, a total of 40 Women with Breast cancer and 40 healthy women on September 2015 were examined. DNA was extracted and for gene promoter methylation, MSPCR method was used. Single nucleotide Polymorphisms of the IL-17 gene were analyzed by the PCR-RFLP method. Data were compared in both groups by using Pearson's chi-square and Hardy-Weinberg equilibrium test.

Results: Results confirm the fact that, there is a relationship between *P16/Ink4* gene promoter methylation and breast cancer disease So that, the promoter of *P16/Ink4* gene in healthy individuals was much more unmethylated than patients ($p<0.05$). On the other hand there is no significant difference between *IL-17* gene polymorphisms and DAP-kinase gene methylation ($P>0.05$).

Conclusion: It seems that increases of *P16/Ink4* gene promoter unmethylation in control subjects is associated with the likelihood of being resistant to breast cancer.

Keywords: Polymorphism, Breast Cancer, IL-17, Methylation, P16/*Ink4*

***Corresponding Author: Sirous Naeimi,** Department of Genetics, Colleague of science, Kazerun branch,Islamic Azad University,Kazerun, Iran.

E-mail: naeimis@kau.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 628-636