



## مقاله پژوهشی

## بررسی تغییرات متیلاسیون راهانداز ژن ویمنتین در سرطان پستان

ناهید نجات<sup>۱</sup>، سید احمد آل یاسین<sup>۲\*</sup>، سید عبدالحمید انگجی<sup>۱</sup>، سعید آیریان<sup>۱</sup>

۱- دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیستفناوری، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۰۶

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۰۹

## چکیده

زمینه و هدف: تغییرات اپی-ژنتیکی از رایج‌ترین تغییرات در ایجاد انواع سرطان‌هاست. این تغییرات در سلول باعث کاهش یا افزایش بیان ژن‌های خاصی می‌شوند که در سبب‌شناسی سرطان نقش مهمی دارند. افزایش بیان ژن ویمنتین به علت تغییرات اپی-ژنتیکی در انتقال از مرحله اپیتلیال به مزانشیمال (EMT) در سرطان پستان به خوبی مشخص شده است. ویمنتین نشانگر اصلی EMT است که این وظیفه را از طریق افزایش بیان ژن‌های مرتبط با EMT در طی تهاجم انجام می‌دهد. هدف این تحقیق بررسی متیلاسیون راهانداز ژن ویمنتین در یک جایگاه مشخص است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی الگوی متیلاسیون راهانداز ژن ویمنتین در یک جایگاه خاص در افراد سالم و بیمار بررسی شد. خون‌گیری از ۳۰ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۳۰ فرد سالم انجام شد. جهت بررسی متیلاسیون، از روش Restriction Enzyme PCR استفاده گردید. DNA نمونه‌ها مورد تیمار آنژیمی قرار گرفت. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت بررسی کیفی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی جهت بررسی کمی متیلاسیون انجام شد.

نتایج: با استفاده از Ct value و فرمول  $(e^{(Ct - C_0)} - 1) / Me\% =$  می‌توان متیلاسیون نمونه‌ها به دست آمد. در نرمافزار SPSS ارتباط متیلاسیون با بیان گیرنده‌های استروژن (ER)، پروژسترون (PR) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) بررسی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که راهانداز ژن ویمنتین در جایگاه موردنظری به صورت قابل ملاحظه‌ای متیلاسیون خود را ازدستداده و با ER همبستگی داشته ولی با PR و HER2 همبستگی ندارد ( $p = 0.05$ ). درنتیجه می‌توان متیلاسیون ژن ویمنتین در این جایگاه به عنوان یک نشانگر مولکولی پیشنهاد کرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، متیلاسیون، ویمنتین، هضم آنژیمی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی

## مقدمه

این تغییرات منجر به بروز آن می‌شود. دلایل غیرژنتیکی مانند سابقه قاعدگی و تولیدمثلى، وزن بالای بدن، مصرف الکل، دوز بالای استروژن و کاهش فعالیت فیزیکی در بروز این سرطان مؤثراند. دلایل ژنتیکی با جهش در ژن‌های مستعد کننده خاصی از جمله BRCA1 و BRCA2 همراهی نشان می‌دهند (۱). تغییرات اپی-ژنتیکی از رایج‌ترین تغییرات در انواع سرطان‌ها هستند. این تغییرات در سلول باعث کاهش یا افزایش بیان ژن‌های خاصی می‌شوند که در سبب‌شناسی سرطان نقش مهمی دارند. از تغییرات اپی-ژنتیکی می‌توان به متیلاسیون DNA، تغییرات هیستون‌ها و RNA‌های مداخله‌گر اشاره کرد (۲).

متیلاسیون DNA یک تغییر پس از همانندسازی است که تقریباً همیشه در پنجمین موقعیت حلقه پیرمیدین نوکلئوتیدهای سیتوزین در جزایر CpG اتفاق می‌افتد. در انسان،

سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در بین زنان و دومین دلیل رایج مرگ ناشی از سرطان در دنیا است (۱). بر اساس آمارهای سازمان جهانی بهداشت در دنیا از هر ۱۰ زن، یک نفر و در ایران از هر ۱۵ زن یک نفر احتمال ابتلاء به این نوع سرطان را دارد (۲). این بیماری از نظر ویژگی‌های مولکولی و الگوهای بیان ژن به پنج گروه شامل لومینال A، لومینال B، غنی از HER2، شبه بازال و کلودین کاهش‌یافته تقسیم می‌شود که هر کدام از آن‌ها ویژگی‌های زیست‌شناسی و تشخیصی خاصی دارند (۳). سرطان پستان یک بیماری چندعاملی است که در اثر تأثیر متقابل عوامل ژنتیکی و غیرژنتیکی/محیطی ایجاد می‌شود و تجمع پیش‌رونده

\*نویسنده مسئول: سید احمد آل یاسین، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیستفناوری، تهران، ایران  
Email: Sogand@nigeb.ac.ir  
https://orcid.org/0000-0003-0224-9726



اختصاصی در سیتوپلاسم سلول‌های مزانشیمال است؛ یعنی جایی که شبکه اسکلت سلولی خود را تشکیل می‌دهد (۱۴). ویمتنین در پایداری mRNA کلژن، پروتئین Scrib و گیرنده Tirozین کینازی Axl1 نیز نقش‌های مهمی دارد. Scrib پروتئینی است که در مهاجرت سلول نقش دارد و تا زمانی که با ویمتنین تعامل دارد از تخریب توسط پروتئازوم محافظت می‌شود، این پروتئین واسطه نقش ویمتنین در افزایش ظرفیت تهاجم سلول توموری است (۱۵). ویمتنین با القا و تحریک Axl1 نیز مهاجرت سلولی را افزایش می‌دهد (۱۶). ویمتنین یکی از پروتئین‌های اصلی روی غشا است که باعث اتصال سلول به بستر ماتریکسی بافت می‌شود. این پروتئین نوعی پروتئین لنگر انداز است. هایپومتیلاسیون ویمتنین با افزایش بیان آن در ارتباط بوده و در اتصال سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر و متاستاز در سلول‌های مهاجم نقش اساسی دارد (۱۷).

با توجه به پیش‌آگهی ضعیف در سرطان‌های پستان بایان بالای ویمتنین، تشخیص زنانی که در معرض ریسک بالای ابتلا به سرطان پستان هستند و دادن مشاوره ژنتیکی مناسب به آن‌ها امری ضروری است. در صورتی که کاهش متیلاسیون ویمتنین با افزایش بیان ژن و متاستاز مرتبط باشد، اگر در فرد مبتلا به سرطان پستان الگوی متیلاسیون ژن ویمتنین در جایگاه مشخصی بررسی و با افراد سالم مقایسه شود و تفاوت معناداری بین آن‌ها دیده شود، می‌توان از متیلاسیون این نقطه به عنوان یک نشانگر مولکولی در پیش‌آگهی استفاده کرد. در این مطالعه مورد-شاهدی، متیلاسیون راهانداز ژن ویمتنین با فرض نشانگر، در یک جایگاه مشخص در افراد بیمار و سالم بررسی شده و ارتباط آن با گیرنده‌های استروژن (ER)، پروژسترون (PR) و فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) تعیین گردیده است.

## مواد و روش‌ها

**استخراج DNA:** از ۳۰ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان و ۳۰ زن سالم، نمونه خون محیطی (در لوله‌های حاوی EDTA) گرفته شد. نمونه‌گیری بیماران از بیمارستان امام خمینی تهران با کسب رضایت کتبی آگاهانه انجام شد. DNA نمونه‌های تازه با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (شرکت یکتا تجهیز آزمای، ایران) طبق روش ذکر شده کیت، استخراج و کیفیت DNA‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودارپ (شرکت Thermo fisher، آمریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ nm بررسی شد.

جزایر CpG در انتهای ۵' ژن‌ها قرار دارند و دارای سه نوع الگوی متیلاسیون هستند: کاملاً متیله در کروموزوم X یا ژن-هایی که در مقطع خاصی بیان شده و دیگر بیان نمی‌شوند، کاملاً هیپومتیله در ژن‌های خانه‌دار و متیله ناهمگن در بافت‌های مختلف بدن و سلول‌های سرطانی (۶). هایپومتیلاسیون با فعل شدن ژن و ناپایداری کروموزوم مرتبط است و ممکن است به بیان بیش از حد پروتو انکوژن‌ها، افزایش نوترکیبی، افزایش نرخ جهش، از دست رفتن مهرگذاری‌های ژنومی و غیرفعال شدن منحرف شده کروموزوم X منجر شود (۷). هایپرمتیلاسیون باعث سرکوب و خاموشی ژن‌های سرکوبگر تومور، ژن‌های ترمیمی DNA و ژن‌های مهارکننده تهاجم و رگزایی می‌شود (۸). این تغییرات را می‌توان به عنوان نشانگرهای سرطان در انسان در نظر گرفت. شناخت تغییرات اپی‌ژنتیکی و ارتباط آن‌ها با سرطان پستان در زمینهٔ تشخیص، پیش‌آگهی و درمان از اهمیت زیادی برخوردار است (۹).

در مطالعات متعددی ارتباط بین انتقال از مرحله اپیتلیال به مزانشیمال (EMT) و فرآیند تهاجم در بدخیمی‌ها تائید شده است (۱۰). EMT در مراحل اولیه تکامل رویان (امبریوژن)، در سلول‌های اپی‌تلیال برای ایجاد اولین لایه‌ی مزودرمی اتفاق می‌افتد و متعاقباً، اکتودرم با روش‌های متعددی منجر به ایجاد ماهیچه، استخوان، عصب و بافت همبند می‌شود (۱۱). در طی EMT سلول‌های اپیتلیالی در یک واحد مجتمع سازماندهی می‌شوند و با از دست دادن پروتئین‌های اتصال سلولی و عناصر اسکلت سلولی (مانند اتصالات کاده‌رین/اده‌رین، اتصالات سخت و دسموزومی، اینتگرین‌های جانبی و سیتوکراتین) به از دست آوردن جنبش و کاده‌رین‌های مزانشیمالی و غنی شدن از ویمتنین به سلول‌های مزانشیمال تبدیل می‌شوند (۱۲).

افزایش بیان ویمتنین به علت تغییرات اپی‌ژنتیکی در EMTs در سرطان پستان به خوبی مشخص شده است و از طرفی ارتباط بین EMT و تهاجم و متاستاز نیز تائید شده است. در ابتدا تصور می‌شد که ویمتنین تنها به عنوان مارکری در مرحله مزانشیمال عمل می‌کند اما یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که این پروتئین نقش مهمی در ایجاد فنوتیپ مزانشیمالی دارد (۱۳). ژن ویمتنین روی کروموزوم ۱۳ p1۱۰ ۱۰ قرار دارد و یک فیلامنت حد واسط نوع III را کد می‌کند. این پروتئین ۴۶۶ اسید‌آمینه داشته و ۵۷-kDa وزن دارد، غنی از مارپیچ‌های  $\alpha$  محافظت شده بوده و ساختار Coiled-coil دارد. ویمتنین فیلامنت حد واسط



تیمار نشده در گروه بیمار و سالم با شرایط دمایی قبل انجام شد. درصد متیلاسیون در نمونه‌های DNA با توجه به مقادیر value  $\Delta Ct = (e^{-0.7})^{(\Delta Ct)}$ ٪ تعیین می‌شود.  $\Delta Ct = 2$  نشان‌دهنده ۷۵ درصد شکست در نمونه‌های تیمار شده توسط آنزیم است.

**محاسبات آماری:** داده‌های Real time PCR با استفاده از نرمافزار LinReg برای هر واکنش تجزیه و تحلیل شدند. محاسبات آماری با استفاده از نرمافزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گردید. مقایسه بین ۳۰ نمونه بیمار و ۳۰ نمونه سالم با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) صورت گرفت. سپس ارتباط

بررسی جزایر CpG در راهانداز ژن ویمنتین و طراحی پرایمر: توالی راهانداز ژن ویمنتین با استفاده از پایگاه داده (Transcriptional Regulatory Element Database) TRED مشخص شد. مناطق CpG با احتمال متیلاسیون نزدیک به ۱۰۰ توسط پایگاه داده CpG plot تعیین گردید. جایگاه‌های برش برای آنزیم‌های محدود کننده حساس به متیلاسیون در توالی راهانداز در این مناطق با کمک پایگاه داده NEB Cutter NED بررسی شد. از بین آنزیم‌های موجود آنزیم SacII با جایگاه برش CCGCGG انتخاب شد. با استفاده از نرمافزار Gene Runner برای دو طرف جایگاه برش آنزیم، پرایمر طراحی گردید و توالی پرایمرها در سایت Primer BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرها و دمای ذوب آن‌ها

Primers	Sequence	Tm
Forward	5'-GACCATGCCAGTCCAG-3'	59.73°C
Reverse	3'-CAGGTCAAGAGACGGTGAGA-5'	60.61°C

متیلاسیون ویمنتین با HER2، PR و Eta با همبستگی PR بررسی شد، زیرا متیلاسیون داده‌ای کمی و مارکرهای ER، HER2 داده‌هایی کیفی هستند. ( $p = 0.05$ ) به عنوان حد آماری معنادار در نظر گرفته شده است.

## نتایج

**بررسی متیلاسیون ژن ویمنتین با روش Restriction Enzyme PCR (REP):** نتایج PCR نشان می‌دهد که محصولات تکثیر در گروه سالم تیمار شده با آنزیم به صورت کامل تکثیر شده ولی در گروه بیمار تیمار شده، در ۴۰٪ نمونه‌ها تکثیر اصلًا انجام نشده و ۶۰٪ دیگر به طور نسبی تکثیر شده‌اند. نمونه‌های تیمار نشده در هر دو گروه به طور کامل تکثیر شده‌اند. با توجه به این نکته که آنزیم SacII فقط توالی‌های غیرمتیله را می‌برد بنابراین جایگاه موربد بررسی در افراد بیمار متیلاسیون خود را یا به طور کامل یا نسبی از دست داده است (شکل ۱). نتایج الکتروفوروز با نرمافزار Gel Analyser نیز بررسی و از دست رفتن متیلاسیون تائید شد. این نتایج با فرض اولیه که هایپومتیله شدن ویمنتین با افزایش بیان آن در EMT مرتبط است، هم راست است.

**تائید نتایج متیلاسیون با SYBR green Real time PCR:** به منظور تجزیه و تحلیل کمی متیلاسیون نمونه‌ها، DNA تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم، با روش PCR زمان واقعی تکثیر و داده‌ها با نرمافزار Linreg بررسی شدند. با توجه به بیشتر بودن

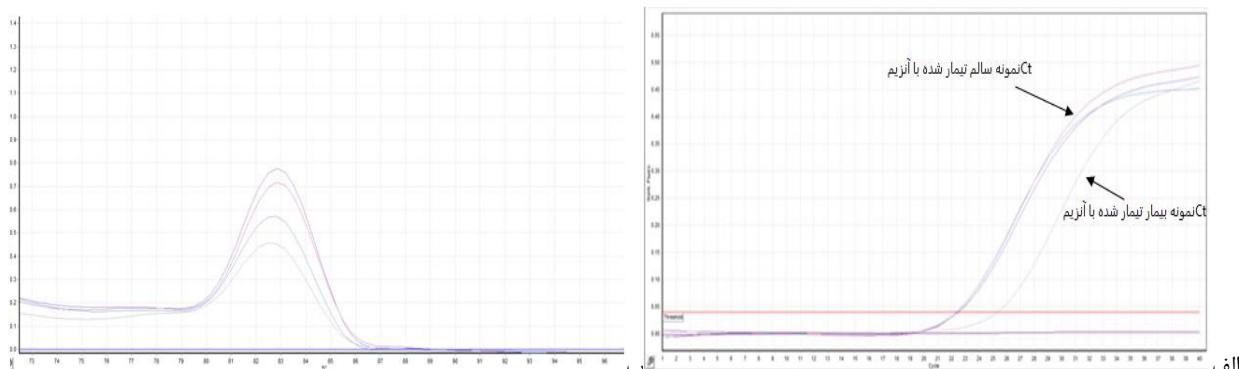
آمده‌سازی نمونه‌های DNA با واکنش هضم آنزیمی: واکنش هضم آنزیمی برای نمونه‌های بیمار و سالم برای توالی CCGCGG با استفاده از آنزیم حساس به متیلاسیون SacII (شرکت TaKaRa، ژاپن) انجام شد. هضم‌های آنزیمی در دو تیوب مجزا یکی دارای آنزیم و دیگری بدون آنزیم به عنوان کنترل انجام گردید. برای اطمینان از هضم کامل واکنش‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه عمل آنزیم است، طبق دستور شرکت سازنده، انکوبه شدند. برش در جایگاه شناسایی آنزیم در صورت غیرمتیله بودن انجام خواهد شد و عدم انجام برش به معنای متیله بودن جایگاه است.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):** واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (شرکت امپلیکون، دانمارک) در ۳۵ سیکل برای نمونه‌های هضم شده و کنترل (بدون تیمار آنزیمی) با این شرایط انجام شد: ۹۵°C برای ۵ دقیقه، ۹۵°C برای ۱ دقیقه، ۶۴°C برای ۴۵ ثانیه، ۷۲°C برای ۴۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۱۰ دقیقه. الکتروفوروز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE به منظور بررسی محصولات PCR انجام شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی به روش سایبرگرین (SYBR green Real time PCR):** واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی با استفاده از کیت SYBR green Real time PCR (شرکت TaKaRa، ژاپن) برای DNA تیمار شده و



شکل ۱- تجزیه و تحلیل نتایج الکتروفورز محصولات RE-PCR ژن ویمتنین. T: تیمار شده، UT: تیمار نشده، L: Ladder  
شکل الف گروه سالم: در نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم، به علت متبیله بودن جایگاه موردنظر، برش آنزیمی صورت نگرفته و همه نمونه‌ها به طور کامل تکثیر شده‌اند. شکل ب گروه بیمار: در نمونه‌های تیمار شده به علت هایپومتیله بودن برش آنزیمی اتفاق افتاده و نمونه‌ها به طور نسبی تکثیر شده‌اند ولی در نمونه‌های تیمار نشده تکثیر به طور صحیح و کامل انجام شده است. شکل ج گروه بیمار: در نمونه‌های تیمار شده اصلًا تکثیر انجام نشده که حاکی از برش آنزیمی و هایپومتیلاسیون کامل جایگاه مورد بررسی است. نتیجه تکثیر در باند ۲۰۰ bp باید واقع شود.



شکل ۲- منحنی تکثیر (الف) و ذوب (ب) نمونه‌های سالم و بیمار. همان‌گونه که در شکل پیداست Ct value نمونه سالم (۲۲/۳۳) کمتر از نمونه بیمار (۲۵/۳۱) است؛ زیرا DNA نمونه بیمار در اثر تیمار آنزیمی برش خورده و نسبت به DNA نمونه سالم دیرتر تکثیر شده است که این نتیجه در راستای فرض ما مبنی بر هایپومتیله بودن جایگاه مورد نظر است. منحنی ذوب نیز گویای صحت تکثیر و نبود محصولات غیراختصاصی است.

یکطرفه (ANOVA) هایپومتیلاسیون قابل توجه در جایگاه موردنظر را در بیماران نشان می‌دهد ( $p = 0.01$ )  
بررسی ارتباط داده‌های پاتولوژی با متیلاسیون: از مهمترین فواید داده‌های پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان HER2، PR و ER می‌باشد. استفاده از نشانگرهای خاصی مثل  $\Delta Ct$  و  $\Delta\Delta Ct$  بررسی و ارتباط این سه نشانگر با متیلاسیون با همبستگی Eta بزرگ است که در پیش‌آگهی و تشخیص و درمان استفاده می‌شوند. مشاهده شد که متیلاسیون ویمتنین در این جایگاه با ER همبستگی داشته ولی با PR و HER2 ارتباط معنادار ندارد. میزان متیلاسیون راه انداز ژن ویمتنین در نمونه‌های بیمار  $ER^+$  (۷۰٪ نمونه‌های بیمار) نسبت به  $ER^+$  (۳۰٪ نمونه‌های بیمار) کمتر است و این اختلاف معنادار است ( $p = 0.002$ ).

مقادیر Ct نمونه‌های بیمار نسبت به سالم، در می‌باییم که جایگاه موردنظری در اثر تیمار آنزیمی برش خورده و دیرتر تکثیر شده است ولی منحنی نمونه‌های تیمار نشده نتایج مشابهی نشان داده‌اند (شکل ۲). انجام روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) روی میانگین  $\Delta Ct$  نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم در افراد سالم و بیمار نشان می‌دهد که میانگین  $\Delta Ct$  در نمونه‌های تیمار نشده نسبت به نمونه‌های تیمار شده به طور قابل توجهی کمتر است ( $p = 0.05$ ) که حاکی از تفاوت در میزان تکثیر این دو گروه است. درصد متیلاسیون نمونه‌ها با استفاده از فرمول  $(e^{-\Delta Ct})^{0.7} \times 100$ ٪ محاسبه شد. میانگین درصد هایپومتیلاسیون نمونه‌های سالم (۲۱/۵٪) و نمونه‌های بیمار (۸۵٪) است. مقایسه میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس



هزینه‌های سنگین روش توالی‌یابی بی‌سولفیت را نیز ندارد (۲۰). نتایج این مطالعه نشان داد که راهانداز ژن ویمنتین در جایگاه موردنرسی در بیماران به شکل قابل ملاحظه‌ای هایپومتیله شده است. نتایج ما مبنی بر هایپومتیله شدن ژن ویمنتین و افزایش بیان آن با یافته‌های قبلی از بررسی این ژن با روش‌های دیگر، هم‌خوانی داشته و مؤبد یکدیگر هستند (۱۳، ۱۴، ۲۱، ۲۲). همچنین ارتباط هایپومتیلاسیون با داده‌های پاتولوژی از جمله گیرنده استروژن (ER)، پروژستررون (PR) و فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) بررسی شد. این بیومارکرها در تشخیص و پیش‌آگهی کاربرد گسترده‌ای دارند (۲۳). بیومارکر HER2 می‌تواند نرمال بودن نمونه را از نظر مقدار پروتئین HER2 یا تعداد کپی‌های ژن آن مشخص کند. درنتیجه به تشخیص زودهنگام، موقعیت سرطان و انتخاب گزینه‌های درمانی کمک می‌کند (۲۴). از طرفی سرطان‌های پستان با منشأ هورمونی به درمان‌های هورمونی خوب پاسخ می‌دهند. تشخیص اینکه سلول‌های سرطانی پستان، گیرنده استروژن یا پروژستررون را بیان کرده‌اند در انتخاب راهکار درمانی بسیار مفید است (۲۵). یافتن ارتباط بین متیلاسیون و هریک از این بیومارکرها را می‌توان به عنوان یک بیومارکر معتبرتر پیشنهاد کرد. یافته‌های ما حاکی از ارتباط هایپومتیلاسیون ژن ویمنتین با ER است. میزان متیلاسیون راهانداز ژن ویمنتین در نمونه‌های بیمار<sup>-</sup> ER نسبت به ER<sup>+</sup> به شکل معناداری کمتر است و این ارتباط مثبت هایپومتیلاسیون ویمنتین با<sup>-</sup> ER را به عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص سرطان پیشنهاد می‌کنیم. مطالعات بیشتر روی جمعیت‌های بزرگ‌تر ممکن است همبستگی‌های دیگر را نیز تائید کند.

انحراف در انتخاب نمونه (selection bias) نگرانی همه مطالعات جهت یافتن نشانگر است، ولی تلاش بر این بود که تا حد ممکن این خطای را کاهش دهیم (۲۶). بدین شکل که همه بیماران خانم‌هایی در محدوده سنی ۳۰-۶۰ بوده و طی ۱۰ سال گذشته ساکن تهران بوده‌اند. محل زندگی آن‌ها از نظر نزدیکی به فرودگاه و دکلهای مخابراتی و ماهواره‌ای بررسی شد تا احتمال تأثیر این موارد بر بیماری در نظر گرفته شود ولی از ۶۰ فرد بیمار فقط یک نفر نزدیک فرودگاه و یک نفر نزدیک دکل مخابراتی زندگی می‌کردند که قابل ملاحظه نبود. هیچ‌یک از بیماران در طول زندگی رژیم غذایی خاصی اتخاذ نکرده بودند و تحت درمان خاصی نبودند، به جز یک نفر که ۲۵ بار IVF انجام داده بود و

## بحث و نتیجه گیری

تلاش برای مبارزه با سرطان و یافتن درمان مؤثر برای آن، از بزرگ‌ترین دغدغه‌های قرن بیستم است. با وجود اینکه درمان برخی از انواع سرطان به شکل قابل توجهی پیشرفت داشته ولی بسیاری از سرطان‌های مرگبار هنوز بدون درمان باقی‌مانده‌اند. با توجه به پیچیدگی دلایل شروع سرطان و درگیر بودن مسیرهای مختلف سلولی و ژن‌های مختلف، یافتن راهی برای کنترل همه این مسیرها که منجر به درمان سرطان شود، بسیار پیچیده است. با توجه به دشوار بودن مسیر درمان توجه بسیاری از محققان به پیش‌آگهی و پیشگیری از این بیماری معطوف شده است. یافتن بیومارکرهای تشخیصی برای غربالگری جمعیت از جمله بهترین راهکارهای است. سرطان پستان را قاتل خاموش نامیده‌اند چون درد و علامتی در مراحل ابتدایی بیماری ندارد و فرد وقتی متوجه می‌شود که بیماری تا حد زیادی پیشرفت کرده است. از این‌روی یافتن بیومارکرهایی که بتوانند سرطان را در مراحل اولیه و قبل از متاباستاز پیش‌بینی کنند حائز اهمیت است. یافتن و توسعه‌ی روش‌های جدید برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان بسیار مهم است زیرا با تشخیص زودهنگام می‌توان نرخ زنده ماندن بیماران را افزایش داد (۱۸). از طرفی در فرد مبتلا، توانایی تومور برای متاباستاز تعیین کننده مرگ و زندگی بیمار سرطانی است؛ بنابراین شناخت مسیرهای متاباستاز، پروتئین‌های درگیر در این مسیر و تلاش برای مهار آن‌ها از اهمیت بالایی در درمان برخوردار است. در این میان یافتن نشانگرهای مولکولی با روش‌های غیرتھاجمی مثل نمونه خون محیطی که بیمار را تحت تنفس جراحی قرار نمی‌دهد، از اهمیت بالایی برخوردار است. از دلایل انتخاب سلول‌های خونی برای بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی و یافتن نشانگر این است که مشخص شده این سلول‌ها مانند سلول‌های بافت سرطانی دچار تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌شوند و با بررسی آن‌ها می‌توان نشانگرهای جدیدی کشف و گزارش کرد (۱۹).

در این مطالعه، از DNA ژنومی سلول‌های سفید خون افراد سالم و بیمار مبتلا به سرطان پستان، برای بررسی تغییرات اپی-ژنتیکی استفاده شد. تغییر متیلاسیون راهانداز ژن ویمنتین در یک جایگاه مشخص با روش RE-PCR و PCR زمان واقعی quantitative Analysis of (qAMP) نام دارد با مقدار کم DNA Methylation-real-time PCR در زمانی کوتاه با هزینه‌ی مناسب، می‌تواند متیلاسیون تعداد زیادی نمونه را به‌طور دقیق بررسی کند و سختی‌ها و



بابت کمک‌های بی‌دریغشان و با تشکر از آزمایشگاه ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهران. کد ثبت دانشگاه خوارزمی: ۱۰۹۶۹

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسنده‌گان بیان نشده است.

طبق نظر پزشکان هورمون درمانی‌های مکرر احتمالاً دلیل اصلی ابتلای آن شخص به بیماری بود. شغل افراد از نظر احتمال کار با اشعه و مواد رادیواکتیو و جهش‌زا بررسی شد و مشخص شد که هیچ‌یک از افراد در معرض موارد مذکور نبوده‌اند.

### تشکر و قدردانی

با تشکر از خانم‌ها دکتر عاطفه شیرکوند و دکتر زهرا نیکی

### References

1. Lukon KF. Understanding breast cancer – The long and winding road. *BBA Clinical*. 2017; 7(2): 64-77.
2. Kaviani A, Scientific Secretary Of The Third Breast Congress, At The Third News Conference. 1388 Esfand 10.
3. Peddi PF, Ellis MJ, Ma C. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *International journal of breast cancer*. 2011; 2012(5):155-162.
4. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001; 358(9291): 1389-1399.
5. Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J. The epigenetics of breast cancer. *Molecular oncology*. 2010; 4(3): 242-254.
6. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*. 2002; 16(11-12): 6-21.
7. De Smet C, Loriot A, Boon T. Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 50 region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Molecular and cellular biology*. 2004; 11(21): 4781-4790.
8. Fahrner JA, Eguchi s, Herman JG, SB Baylin. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer research*. 2002; 62(24): 98-105.
9. Lim DH, Maher ER. Genomic imprinting syndromes and cancer. *Advances in Genetics*. 2010; 70(7): 145-175.
10. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Cell*. 2008; 14(6): 818-829.
11. Kalcheim C. Epithelial-mesenchymal transitions during neural crest and somite development. *Journal of clinical medicine*. 2015; 5(1): 716-725.
12. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Review Molecular Cell Biolog*. 2006; 7(18): 131-142.
13. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*. 2007; 185(1-3): 191-203.
14. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences*, 2011; 68(18): 3033-3046.
15. Phua DC, Humbert PO, Hunziker W. Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(12): 2841-2855.
16. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 2011; 30(3): 1436-1448.
17. Wu Y, Zhang X, Salmon M, Lin X, Zehner ZE. TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2007; 1773(3): 427-439.
18. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini E, Senkus F. Clinical Use Of Biomarkers In Breast Cancer: Updated Guidelines From The European Group On Tumor Markers (EGTM). *European Journal Of Cancer*. 2017; 75(21): 284-298.
19. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A. An Epigenetic Signature in Peripheral Blood Predicts Active Ovarian Cancer. *Plos one*. 2009; 4(18): 223-231.
20. Oakes CC, La Salle S, Robaire B, Trasler JM. Evaluation of a Quantitative DNA Methylation Analysis Technique using Methylation-Sensitive/Dependent Restriction Enzymes and Real-Time PCR. *Epigenetics*. 2006; 1(3): 146-152.
21. Dwedar FI, Khalil GI, Nayer SA, Farouk A. Aberrant Vimentin Methylation Is Characteristic of Breast Cancer. *Advances In Breast Cancer Research*. 2016; 5(4): 150-162.
22. Korschning E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wulfing P, Vandiest PJ, Brandt B. The origin of Vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial



- histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *Pathology.* 2005; 206(4): 451–457.
23. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Review Cancer.* 2005; 5(18): 845-856.
24. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.* 2007; 19: 56–62.
25. Cochrane DR, Bernales S. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Research.* 2014; 19(1): 468-482.
26. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *Clinical Oncology.* 2005; 100(2): 229–235.

**Original Article**

## Investigating Methylation Changes of Vimentin Gene in Breast Cancer

Nejat N<sup>1</sup>, Aleyasin SA<sup>2\*</sup>, Angji SA<sup>1</sup>, Ayrian S<sup>1</sup>

1. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Medical Biotechnology Division, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Iran

Received: 01 Oct 2017

Accepted: 27 Dec 2017

### **Abstract**

**Background & Objective:** Epigenetic changes are one of the most common changes in development of cancers. These changes alter the expression of certain genes that play important roles in the etiology of cancer. Increasing the expression of Vimentin gene due to epigenetic changes in Epithelial-Mesenchymal Transition(EMT) in breast carcinoma is well known. The relation between EMT and the malignancy invasion process has also been confirmed. Vimentin is the principal EMT marker that performs this task during metastasis. The purpose of this study is to investigate the methylation of the vitamin gene in a specific position.

**Material & Methods:** In this case-control study, the methylation pattern of the promoter of the Vimentin gene was evaluated in a specific site. Blood samples were taken from 30 breast cancer patients and 30 healthy individuals. DNA samples were digested with the methylation sensitive restriction enzyme. Control and treated DNA was amplified by PCR for qualitative investigation and real time PCR for quantitative analysis of methylation.

**Results:** Using the Ct value and the  $\%Me = 100(e^{-0.7(\Delta Ct)})$  formula, the correlation between Vimentin hypomethylation and expression of Estrogen Receptor(ER), Progesterone Receptor(PR) and Human Epidermal growth factor Receptor2(HER2) status was checked ( $p$ -value  $<0.05$ ).

**Conclusion:** The results indicate that hypomethylated promoter of the Vim gene in the examined site correlates with ER, but does not have any correlation with PR and Her2, and hence the hypomethylation of the Vimentin gene in this position can be proposed as a molecular biomarker.

**Keywords:** Breast cancer, Methylation, Vimentin, Restriction Enzyme PCR, Real Time PCR

\*Corresponding Author: Seyyed Ahmad Aleyasin, Medical Biotechnology Division, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Iran

Email: Sogand@nigeb.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-0224-9726>