مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۱۱، بهمن ۱۳۹۴(شماره پی در پی۱۰۶)

بررسی پلی مورفیسم ژن اینتر لوکین ۱۷ بر متیلاسیون پروموتر ژن Dap-Kinase در بیماران مبتلا به سرطان پستان

سیروس نعیمی

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

تایخ وصول: ۱۳۹۴/۴/۲ تایخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۵

چکیده :

زمینه و هدف : سرطان پستان شایع ترین بدخیمی‌در خانم‌ها است. مطالعه‌ها نشان داده است که افزایش متیلاسیون در جزایر CpG یا (CIHM،CpG island hyper methylation) ، یکی از مکانیسم‌های مهم در خاموش شدن ژن می‌باشد. پروتئین DAP-Kinase نقش مهمی‌را در فرآیند آپوپتوزیس یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ایفا می‌نماید. اینترلوکین ۱۷ یک سایتوکاین التهابی است و التهاب، از جمله مواردی است که بر متیلاسیون ژن‌ها تأثیرگذار می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی پلی مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ بر متیلاسیون پروموتر ژن Dap-kinase و ارتباط آن با بیماری سرطان پستان می‌باشد.

روش بررسی: در این تحقیق مورد ـ شاهدی از خون محیطی ۴۰ بیمار مبتلا به بیماری سرطان پستان و ۴۰ زن سالم ، جهت استخراج DNA، با استفاده از روش Salting out و پروتئیناز K استفاده گردید. به منظور بررسی پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ ، از روش PCR-RFLP و جهت بررسی متیلاسیون پروموتر ژن Dap-kinase، از روش MSPCR استفاده گردید. داده‌های آماری با استفاده از آزمون‌های آماری آرلی کوئین و مجذور کای و هاردی ـ وینبرگ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بین متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase و بیماری سرطان پستان ارتباط معنی‌داری دیده شد، بدین صورت که پروموتر ژن مذکور در بیماران نسبت به افراد سالم به میزان زیادتری متیله شده بود($p<۰/۰۵$). از طرف دیگر ارتباط معنی‌داری میان پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ و متیلاسیون ژن DAP-kinase مشاهده نشد($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به این که متیلاسیون پروموتر ژن‌ها، یکی از مکانیسم‌های اپی ژنتیکی در خاموش نمودن ژن‌ها می‌باشد، به نظر می‌رسد که افزایش متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase با احتمال ابتلا به سرطان پستان در خانم‌ها در ارتباط می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : پلی مورفیسم، سرطان پستان، اینترلوکین ۱۷، متیلاسیون، DAP-kinase

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

مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین بدخیمی در خانم‌ها می‌باشد و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان‌هاست. التهاب فرآیندی است که سیستم ایمنی را به سمت عفونت یا بافت‌های آسیب دیده هدایت می‌کند. التهاب مزمن یک نقش مهم در پاتوژنز بیماری‌های خودایمنی، آلرژی و سرطان‌ها بازی می‌کند(۱). مطالعه‌ها نشان می‌دهد که التهاب با تأثیر بر روی محیط اطراف تومور باعث تکثیر، مهاجرت و پایداری سلول‌های توموری می‌گردد(۲). مشخص شده است که سلول‌های لنفوسیت T کمکی Th17 نقش دو گانه‌ای را در سرطان ایفا می‌کنند. اثرات پیش توموری Th17 با واسطه القای رگزایی و به کارگیری سلول‌های التهابی می‌باشد. از طرفی Th17 به طور غیر مستقیم از طریق به جریان انداختن پاسخ‌های سایتوتوکسیک[۱] سلول‌های T و هم‌چنین به کارگیری سلول‌های دندرتیک، اثرات ضد توموری خود را ایفا می‌کنند(۳).سیتوکین IL17 بر جسته‌ترین سایتوکاین ترشح شده از سلول‌های Th17 می‌باشد. این سایتوکاین یکی از سایتوکاین‌های پیش التهابی است که در بیماری‌های خود ایمنی انسان و موش، نقش ایفا می‌کند. خانواده IL-17 نقش مهمی در پاسخ‌های نرمال ایمنی و بیماری‌های ایمونولوژیک دارند. خانواده IL-17 دارای ۶عضو A-F از IL-17 می‌باشد(۴). این سایتوکاین پیش التهابی؛ همودیمری است که دارای دو زنجیره ۱۵ کیلو دالتونی می‌باشد که این زنجیره‌ها به وسیله باندهای دی سولفیدی به هم متصل شده‌اند. سیتوکین‌های IL-17A و IL-17F بیشترین تشابه ساختمانی، از لحاظ اسیدآمینه را دارا هستند که این تشابه تا ۵۰ درصد می‌باشد(۵). افزایش بیان شدت این سایتوکاین در سلول‌های اپی‌تلیال ریه منجر به التهاب راه‌های هوایی و هیپر پلازی[۲] مخاطی می‌شود(۶). هم‌چنین باعث تحریک پرولیفراسیون[۳] سلول T و بیان مولکول‌های چسبنده می‌شوند. آنها باعث القا بیان طیف گسترده‌ای از سایتوکاین‌ها از سلول‌های مختلفی نظیر اندوتلیال یا اپیتلیال می‌شوند که شامل IL-6، IL-8، G-CSF[۴]، GM-CSF[۵]، RANTES و Pr-1 می‌گردند(۷). این سایتوکاین به وسیله سلول‌های ارتشاح یافته به محل تومور(TIL)[۶] تولید می‌شود و خاصیت تومورزایی[۷] تومورهای گردنی را در موش‌های Nude افزایش می‌دهد(۸). ژن IL-17A و IL-17F بر روی کروموزوم P۱۲ ۶ قرار گرفته است. همراهی پلی مورفیسم 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. این

1- Cytotoxic
2- Hyperplasia
3- Prolifration
4-Granolocy- Colony Stimulating Factor
5-Granolocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor
6-Tumor Infiltrating Lymphocytes
7-Tumorigenicity

سایتوکاین پیش التهابی، با ایجاد التهاب در سلول‌ها و متعاقب آن ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن درون سلولی، باعث سوق یافتن سلول به سمت سرطانی شدن می‌گردد(۹-۱۲). هم‌چنین پیشنهاد شده است که التهاب مزمن باعث افزایش متیلاسیون DNA می‌گردد که مکانیسم احتمالی آن به دلیل تأثیر بر روی برگشتگی سلولی می‌باشد(۱۳).

پروتئین DAP-Kinase[1]، یک پروتئین سرین ترئونین کیناز ۱۶۰ کیلو دالتونی است که از مسیر کلسیم ـ کالمودولین تنظیم می‌گردد و نقش مهمی در سیستم آپوپتوزی دارا می‌باشد. ساختمان کلی DAP-Kinase، یک ساختمان منحصر به فرد است و هیچ شباهتی با دیگر پروتئین ندارد. بسیاری از پروتئین‌های خانواده DAP-Kinase در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده(آپوپتوزیس) نقش داشته ونقش خود را از مسیرهای رسپتورP55TNF ، رسپتورFas/Apo1، DR3-5، FADD/MORT-1، RIP وTRADD ایفا می‌نماید. که در این مورد به نقشDAP-Kinase به عنوان عوامل پائین دستی فاکتورهای FADD[2] و کاسپاز ۸ پرداخت. با توجه به اهمیت پلی مورفیسم ژن اینتر لوکین ۱۷ در بیان مولکول مربوطه و نقش فاکتور تنظیمی سیکس سلولی DAP-Kinase در ایجاد این بیمای، در این مطالعه به بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های اشاره شده با متیلاسیون ژن DAP-Kinase و ارتباط آن با میزان ابتلای زنان ایرانی به سرطان پستان پرداخته شد.

روش بررسی

این یک مطالعه موردـ شاهدی می‌باشد که شامل ۴۰ نفر مبتلا به سرطان پستان با میانگین سنی۱۱/۶±۴۹/۳ بود که در طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳ به بیمارستان‌های شهید فقیهی و نمازی شیراز مراجعه نموده و ابتلا به سرطان آنها با بررسی‌های پاتولوژیک، به وسیله متخصصین پاتولوژیک و جراحی سرطان پستان تأیید شده بود. گروه کنترل شامل ۴۰ نفر با میانگین سنی ۱۲/۹±۵۱/۸ که از نظر سن با گروه بیمار مطابقت داشتند و فاقد هرگونه سابقه سرطان و بیماری‌های خود ایمنی در خود و بستگان درجهٔ 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 ۲. ۹. ۱. ۳ محاسبه گردید. حجم نمونه لازم برای آزمون تفاوت نسبت وجود پلی‌مورفیسم مورد نظر(AA) در دو گروه مستقل(گروه‌های مورد و شاهد) محاسبه گردید. شیوع پلی‌مورفیسم مورد نظر در جمعیت گروه کنترل ۵ درصد در نظر گرفته شد. میزان خطای آلفا و بتا به ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۳۰ در نظر گرفته شد. از افراد مورد مطالعه، ۵ سی سی خون سیاهرگی گرفته شد و به لوله‌های آزمایش حاوی EDTA منتقل شد. DNA ژنومی‌از لکوسیت‌های خون محیطی با روش پروتئیناز

1-Death Associtated Protein Kinase
Fas Associtated Death Domain

K و رسوب نمکی استخراج شد. برای تعیین ژنوتیپ ژن اینتر لوکین ۱۷ افراد مورد مطالعه از روش PCR- RFLP استفاده شد. قطعات DNA حاوی هر جایگاه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شدند جهت موقعیت IL-17AG197A از زوج پرایمر 5-F-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3 و R-5-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3 و جهت موقعیت IL-17F A7488G از پرایمرهای F-5-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3 و R-5-GGTAAGGAGTGGCATTTCTA-3 استفاده گردید. 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 میلی‌مولار، ۶/ ۰میکرولیتر از مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTP، ۰/۶ میکرولیتر Forward Primer، ۰/۶ میکرولیتر Reverse Primer که پرایمرها با غلظت (۲۰ پیکو مولار) بودند، ۷ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میکرولیتر و ۱/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز با غلظت۱ واحد در میکرولیتر افزوده شد. تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفته و قطعات مورد نظر با دمای اتصال پرایمر برابر ۶۵ درجه سانتی‌گراد و تعداد ۳۰ سیکل تکثیری، تکثیر گردیدند. سپس محصولات PCR به ترتیب تحت تأثیر آنزیم‌های محدودکنندهXagI 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(تصاویر ۱و۲). مقادیر و نحوه انجام واکنش و قطعات حاصل از هضم آنزیمی در جدول ۱ آمده است.

برای بررسی متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون ژن DAP-Kinase ، از روش متیلاسیون اختصاصی زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده گردید(MSPPCR). در این روش ابتدا، ژنوم افراد مورد مطالعه با استفاده از کیت بیوسولفیت ساخت شرکت QIAGEN آلمان با Lot No : 142339708 و با توجه به نحوه دستور العمل کیت، آماده سازی گردید. که در انتها، این اعمال باعث می‌شدند که بازهای آلی سیتوزینی که متیله شده، دست نخورده باقی مانده، ولی اگر متیله نشده باشند به باز آلی اوراسیل تبدیل گردند. برای بررسی متیلاسیون نواحی پروموتور ژن DAP-Kinase 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 انجام شده از نمونه‌های کنترل منفی Human HCT116DKO با Lot N : ZRC174904 ساخت شرکت Zymoresearch آمریکا و برای کنترل مثبت آن از نمونه کنترل مثبتHuman HCT116DKO با Lot N : ZRC175286 ساخت شرکت Zymoresearch آمریکا، استفاده شد. جهت واکنش MSPCR برای هر نمونه نیاز به دو تیوب جداگانه برای بررسی متیلاسیون و یا عدم متیلاسیون ژن‌های مورد مطالعه

برای هر فرد می‌باشد که محتویات و مقادیر هر تیوپ اپندورف مشابه هم بوده، منتها پرایمرهای اختصاصی آنها متفاوت بود. 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 با غلظت یک برابر، با ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز شد. توالی پرایمرهای استفاده شده و مواد و برنامه‌های ترمال سایکلر استفاده شده جهت بررسی متیلاسون ژن مذکور در جداول ۲آورده شده است.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و EPI Info 2000 وآرلی کویین و آزمون‌های آماری مجذور کای، فیشر و کاپا بسته به مورد تجزیه و تحلیل شدند.

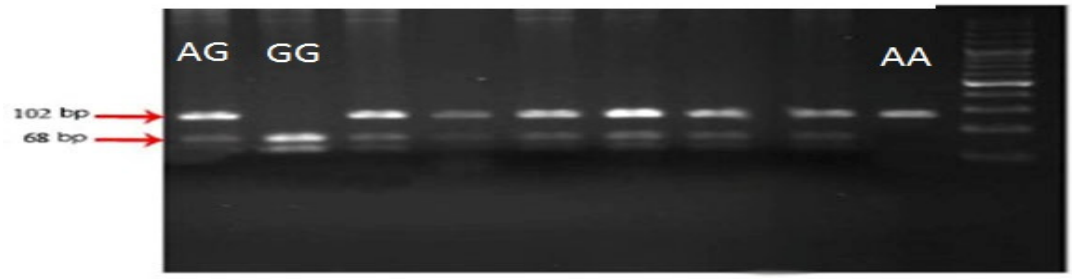
یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش MSPCR در مورد ژن DAP-kinase و با شرایط ذکر شده در قسمت مواد و روش‌های آزمایش منجر به تولید محصولی به طول ۹۸ جفت باز به عنوان قطعه مورد آزمایش در مورد متیلاسیون پروموتر ژن مذکور و محصولی به طول ۱۰۶ جفت باز به عنوان قطعه مورد آزمایش در مورد عدم متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase شد. پروموتر ژن DAP-kinase افرادی که فقط باند ۹۸ جفت بازی را نشان دادند، به عنوان CIHM [1]محسوب شدند که در این افراد تعداد ۳ یا بیشتر از ۳ دی نوکلئوتید CpG پروموتر ژن آنها دچار متیلاسیون شده و به عنوان CIHM محسوب می‌شوند(تصویر ۳).

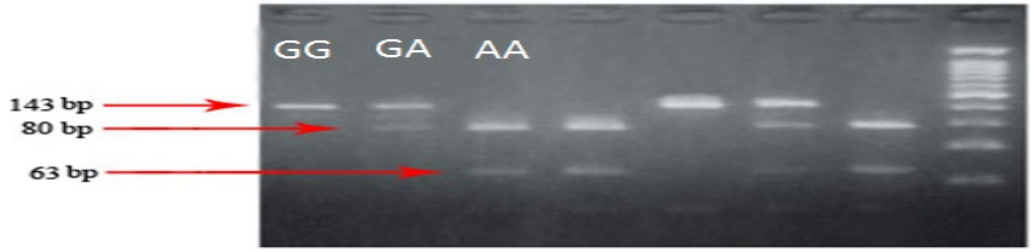
نتایج حاصله از تست مجذور کای برای بررسی ارتباط بین متیلاسیون پروموتر ژن‌های DAP-kinase استخراج شده از خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل انجام گردید، موید این مطلب بود که میان متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase و ایجاد بیماری ارتباط معنی‌داری وجود دارد بدین صورت که متیلاسیون پروموتر ژن مذکور در بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش چشمگیری را نسبت به گروه نشان می‌دهد(p=۰/۰۱). از طرف دیگر کاهش معنی‌داری را در عدم متیلاسیون پروموتر ژن ذکر شده در بیماران نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌گردد. نتایج حاصله در جدول ۵ آورده شده است.

در ادامه تجزیه و تحلیل اطلاعات به بررسی تأثیر پلی مورفیسم ژن IL-17A G197A و IL17 F A7488G بر متیلاسیون پروموتر ژن DAP-Kinase استخراج شده از بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداخته شد. نتایج حاصله از آزمون کاپا، نشانگر این مطلب بود که میان پلی مورفیسم‌های ذکر شده با میزان متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد(جداول ۶ و ۷).

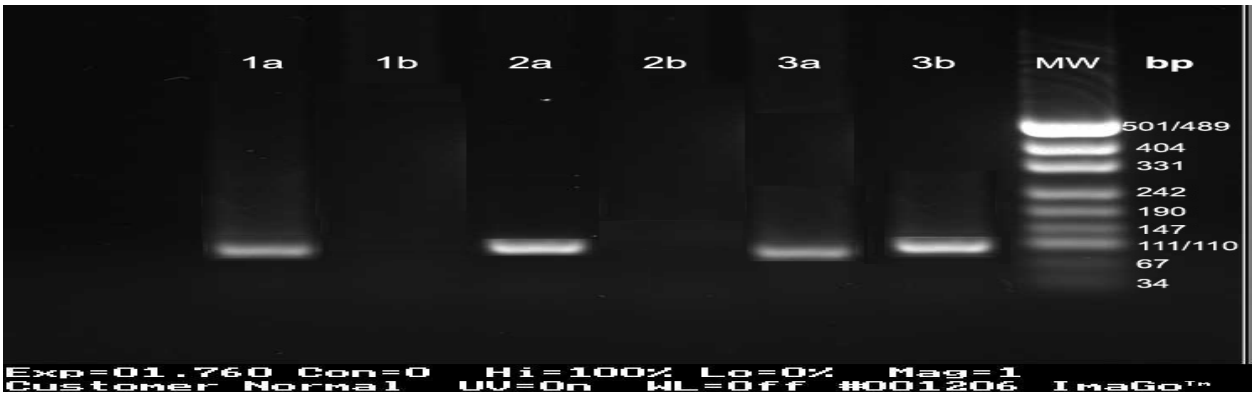
1--CpG Island Hyper Methylation



تصویر ۱: قطعات حاصل از هضم آنزیمی‌محصول PCR پلی مورفیسم rs2275913 از ژن IL-17A ژنوتیپ AA(قطعه ۱۰۲ جفت بازی)، ژنوتیپ GG (قطعات ۶۷ و ۳۴ جفت بازی) و ژنوتیپ GA (قطعات ۱۰۲، ۶۸ و ۳۴ جفت‌بازی)



تصویر ۲: قطعات حاصل از هضم آنزیمی‌محصول PCR پلی مورفیسم rs763780 از ژن IL-17F ژنوتیپAA(قطعات ۶۳ و ۸۰ جفت بازی)، ژنوتیپ GG (قطعه۱۴۲جفت بازی) و ژنوتیپ AG (قطعات ۱۴۳، ۸۰ و ۶۳ جفت بازی)



تصویر۳ : قطعات حاصل از MSPCR ژن Dapkinase .

1a و 1b : هوموزیگوت متیله شده. 2a و 2b : هوموزیگوت متیله نشده 3a و 3b : هتروزیگوت متیله شده و عدم متیله شدن

جدول ۱: دمای هم سرشته شدن، آنزیم‌های محدود کننده و جایگاه شکست این آنزیم‌ها و قطعات حاصل از شکست آنزیمی

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

جدول ۲ : پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش MSPPCR ژن DAP-Kinase

پرایمر رفت متیلاسیون ژن DAP	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC
پرایمر برگشت متیلاسیون ژن DAP	CCCTCCCAAACGCCGA
پرایمر رفت عدم متیلاسیون ژن DAP	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT
پرایمر برگشت عدم متیلاسیون ژن DAP	CAAATCCCTCCCAAACACCAA

جدول ۳ : مواد برای واکنش MSPCR جهت بررسی متیلاسیون و عدم متیلاسیون ژن DAPKinase

مواد	حجم(میکرولیتر)	منبع اصلی	غلظت نهایی
آب	۹/۶۵		
بافر	۱/۵	۱۰x	۰/۹x
Dntp	۰/٤	۵۰mM	۰/۹mM
کلریدمنیزیم	۰/٤۵	۱۰mM	۰/۲۹mM
پرایمر پیشرو	۰/٦	۱۰pm	۰/۳۹pm
پرایمر معکوس	۰/٦	۱۰pm	۰/۳۲pm
Taq DNA polymerase	۱	۵unit/ml	۰/۳۲unit/ml
DNA	۱	۳۰۰nM	۱۹/۷nM
حجم نهایي واکنش	۱۵/۲		

جدول ۴ : برنامه MSPCR دستگاه ترموسایکلر جهت بررسی متیلاسیون و عدم متیلاسیون ژنDAP Kinase

۱	دناتوراسیون اولیه	۹۴ °C		۵ دقیقه
		عدم متیلاسیون	متیلاسیون	
۲	دناتوراسیون	۹۴ °C	۹۴ °C	۳۰ ثانیه
۳	دمای اتصال پرایمر	۵۸/۸ °C	۵۷/۱ °C	۵۰ ثانیه
۴	دمای تطویل سازی	۹۴ °C	۹۴ °C	۴۰ ثانیه
	مراحل ۴-۲، ۳۳ مرتبه تکرار می‌شود			
۵	۷۲ °C	تطویل سازی نهایی		۱۰ دقیقه

جدول۵: مقایسه متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase در بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل

DAP-kinase	افراد مورد مطالعه		سطح معنی داری
	بیماران	گروه کنترل	
هوموزیگوت متیله شده	۱۷(٪۴۳/۳)	۵(٪۱۲/۵)	۰/۰۰۳
هوموزیگوت متیله نشده	۷(٪۱۶/۶)	۱۹(٪۴۷/۵)	۰/۰۱
هتروزیگوت متیله شده/ متیله نشده	۱۶(٪۴۰/۱)	۱۶(٪۴۰)	۰/۱
مجموع	۴۰	۴۰	

جدول ۶ : بررسی پلی مورفیسم ژن IL-17A G197A بر متیلاسیون پروموتر ژنDAP-kinase در بیماران مبتلا به سرطان پستان

IL-17A	DAP-kinase				سطح معنی داری
	هوموزیگوت متیله شده	هتروزیگوت متیله شده/ متیله نشده	هوموزیگوت متیله نشده	مجموع	
AA	۲	۱۷	۹	۲۸	۰/۵۹
AG	۱	۸	۳	۱۲	
مجموع	۳	۲۵	۱۲	۴۰	

جدول ۷ : بررسی پلی مورفیسم ژن IL17 F A7488G بر متیلاسیون پروموتر ژنDAP-kinase در بیماران مبتلا به سرطان پستان

IL-17F	DAP-kinase				سطح معنی داری
	هوموزیگوت متیله شده	هتروزیگوت متیله شده/ متیله نشده	هوموزیگوت متیله نشده	مجموع	
GG	۷	۵	۴	۱۶	۰/۵۷
GA	۹	۲	۱	۱۲	
AA	۲	۱	۱	۴	
مجموع	۱۸	۸	۶	۴۰	

بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های سرطانی در بین خانم ها می‌باشد که سالانه مرگ و میر بالایی را موجب می‌شود. در سال‌های اخیر مطالعه‌های متعددی به منظور تشخیص و ارزیابی شاخص‌های ژنتیکی درگیر در سرطان‌ها انجام شده که منجر به شناسایی ژن‌های مستعد کننده متعددی در بروز آن‌ها شده است. مطالعات نشان می‌دهد که رخ دادن متیلاسیون نامناسب در نواحی جزایر CpG که غیر متیله می‌باشند، منجر به نامیرا شدن و ترانسفورم شدن سلول‌ها می‌شود(۱۴). که این کار، از طریق غیر فعال شدن نسخه برداری ژن‌های سرکوب کننده تومور، انجام می‌گیرد(۱۷ــ۱۵). بنابراین نقشه برداری از الگوهای متیلاسیون در جزایر CpG،

می‌تواند به عنوان یک ابزار مهم در درک وقایع بیان ژن در سلول‌ها، هم در حالت نرمال و هم در حالت پاتولوژیکی(مثل سرطان) مورد استفاده قرار گیرد. از طرف دیگر نشان داده شده است که افزایش متیلاسیون در جزایر CpG یا (CpG island hyper methylation،CIHM)، یکی از مکانیسم‌های مهم در خاموش شدن ژن می‌باشد. در بسیاری از سرطان‌ها، ژن‌های مختلفی دچار این CIHM می‌گردند(۱۸). در سلول‌های ترانسفورم شده به سلول‌های سرطانی، تغییرات اپی ژنتیکی در سطح کروموزومی‌رخ می‌دهد که از جمله می‌توان به متیلاسیون DNA اشاره نمود(۲۰ و ۱۹). در این تحقیق، به بررسی متیلاسیون پروموتر ژن DAP-Kinase، در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل پرداخته شد. نتایج حاصله با استفاده از تست مربع کای، نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که میزان متیلاسیون پروموتر ژن مذکور در بیماران نسبت به افراد سالم افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد که این عمل ممکن است منجر به کاهش بیان این ژن گردیده باشد، از طرف دیگر به نظر می‌رسد که عدم متیلاسیون در پروموتر ژن مذکور در افراد سالم منجر به ایجاد یک مقاومت نسبت به سرطان پستان می‌گردد. مطالعات انجام شده قبلی هم موید این مطلب است که افزایش متیلاسیون در پروموتر ژن‌ها با کاهش بیان این ژن‌ها در ارتباط می‌باشد. در مطالعه‌ای که به وسیله چان او و همکاران انجام شد، محققین به این نتیجه رسیدند که یک ارتباط منطقی میان متیلاسیون ژن E – Cadherin و سرطان معده وجود دارد(۲۱). در مطالعه دیگری که به وسیله واکی و همکاران انجام شد، مشخص گردید که ارتباط معنی‌داری میان متیلاسیون پروموتر ژن DAP-Kinase وسرطان اپی تلیال دستگاه گوارش وجود دارد(۲۲). جیمز و همکاران با استفاده از روش میکروواری بر روی خون محیطی ۱۴ نفر از بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام داده است، مشاهده کرده که از بین ۱۷ ژن کاندید در سرطان پستان که در بررسی آنها مورد استفاده قرار گرفته، میزان متیلاسیون ATM با بیماری ارتباط مستقیمی‌داشته و این طور استنباط نموده که می‌توان از آن به عنوان یک بیومارکر استفاده نمود(۲۳).چوئی و همکاران درسال ۲۰۱۱ به بررسی یک پروفایل از ژن‌های کاندید مانندDAPK1 و CDH1 در سرطان پستان پرداخته و ارتباط آنها را با میزان مرگ و میر در بیماران مبتلا را مورد بررسی قرار داده و با توجه به نتایج، این طور استنباط نمودند که می‌توان از این پروفایل ژنی به عنوان یک بیو مارکر استفاده نمود(۲۴).

از طرف دیگر، مطالعه‌های انجام شده نشان دهنده این موضوع می‌باشد که التهاب و ایجاد واکنش‌های اکسیداتیو در سلول‌ها می‌تواند منجر به افزایش متیلاسیون DNA شود(۲۵). با توجه به این که خانواده اینترلوکین ۱۷ (IL-17)، به عنوان فاکتورهای پیش التهابی عمل می‌نمایند و شامل گروهی از سایتوکاین‌ها می‌باشد که مهم‌ترین و شناخته‌ترین آنها شامل IL-17A و IL-17F می‌باشد(۲۶). میزان بیان این سایتو کاین در بسیای از بیماری‌های خودایمنی و التهابی و سرطان، افزایش چشمگیر را نشان

می‌دهد(۲۸و۲۷). با توجه به این مطالب، در ادامه این تحقیق به بررسی پلی مورفیسم‌های IL17 A G197A (rs(2275913 و IL17F A7488G rs(763780) استخراج شده از خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان بر متیلاسیون ژن DAP-kinase، پرداخته شد که نتایج، نشان‌دهنده عدم ارتباط معنی‌دار میان پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷ و متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase می‌باشد. در مطالعه دیگر که به وسیله تاهارا و همکاران انجام شد، آنها نیز ارتباطی میان پلی‌مورفیسم IL-17A و IL17F که زمینه‌ساز CPGIsland Hyper Methylation(CIHM) است را در بیماران مبتلا به سرطان معده مشاهده ننمودند(۳۲).

نتیجه‌گیری

برای در ک بهتر تأثیر فاکتورهای التهابی بر روی متیلاسیون ژن‌های دخیل در تنظیم چرخه سلولی، پیشنهاد می‌گردد که در تحقیق‌های بعدی به بررسی الگوی متیلاسیون اینتر لوکین ۱۷ و میزان بیان ژن آن در بیمای مذکور پرداخته شده و ارتباط آنها را با متیلاسیون دیگر فاکتورهای تنظیمی مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که افزایش متیلاسیون در پروموتر ژن DAP-kinase (فاکتور القا کننده مرگ سلولی برنامه ریزی شده)، منجر به کاهش بیان ژن مذکور در افراد مبتلا به سرطان پستان گردیده که این امر ممکن است باعث مستعد شدن افراد به بیمای سرطان پستان گردد از طرف دیگر با توجه به نقش التهاب در ایجاد متیلاسیون ژن‌ها، به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۷(به عنوان یک سایتو کاین التهابی)، نقش مهمی را در متیلاسیون پروموتر ژن DAP-kinase ایفا نمی‌نماید.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حمایت‌های معنوی و مادی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تقدیر و تشکر به عمل می آید .

REFERENCES:

1.Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. The Journal of Experimental Medicine 1996;183(6): 2593-603.
2.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.
3.Hizawa N, Kawaguchi M, Huang SK, Nishimura M. Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. Clinical and experimental allergy. Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 2006; 36(9): 1109-14.
4.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.
5.Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. J Immunol 2001; 167(8): 4137-40.
6.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.
7.Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin17-A mediator of inflammatory responses. Cellular and Molecular life Sciences: CMLS 2004; 61(5): 567-79.
8.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.
9.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.
10.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.
11.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.
12.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. Molecular Carcinogenesis 2013; 52(11): 871-8.
13.Jean-Pierre J. Issa,2 Nita Ahuja, Minoru Toyota, Mary P. Bronner, and Teresa A. Brentnall. Accelerated Age-related CpG Island Methylation in Ulcerative Colitis. Cancer Research 2001; 61: 3573–7.
14.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.
15.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.
16.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.
17.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.
18.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.
19.Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nature Reviews Genetics 2007; 8(4): 286-98.
20.Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. Chemical Research in Toxicology 2012; 25(1): 61-73.
21.Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, et al. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with Helicobacter pylori infection and in gastric cancer. Gut 2003; 52(4): 502-6.

22.Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. Cancer Science 2003; 94(4): 360-4.
23.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.
24.Cho YH, Shen J, Gammon MD, Zhang YJ, Wang Q, Gonzalez K, et al. Prognostic significance of gene-specific promoter hypermethylation in breast cancer patients. Breast Cancer Research and Treatment 2012; 131(1): 197.
25.Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. Current Topics in Microbiology and Immunology 2000; 249: 101-18.
26.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.
27.Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. Cell Research 2007;17(5):435-40.
28.Chang SH, Dong C. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. Cytokine 2009; 46(1): 7-11.
29.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.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Investigation of Interleukin-17 Gene Polymorphism on DAP-Kinase Gene Promoter Methylation in Patients with Breast Cancer

Naeimi S

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

Received: 23 Jun 2015 Accepted: 15 Jan 2016

Abstract

Background & aim: Breast cancer is the most common malignancy among women . Studies have shown that increased in methylation of CpG islands (CpG island hyper methylation, CIHM), is one of the important mechanisms in gene down regulation. DAP-Kinase protein plays an important role in the process of apoptosis. Interleukin-17 is an proinflammatory cytokine. Inflammation is one of the factors that affect on gene methylation. The purpose of this study was to evaluate the polymorphism of the IL-17 gene promoter methylation Dap-kinase and its relationship to breast cancer.

Methods: In this case control-study, A total of 40 women with breast cancer and 40 healthy women in Iran were examined. DNA was extracted by saluting out method and single nucleotide polymorphisms of the IL-17 gene were analyzed by the PCR-RFLP method. To study gene promoter methylation Dap-kinase, MSPCR method was used. Data were compared in both groups by using Pearson's chi-square and Hardy-weinberg equilibrium test.

Results: Significant correlated were seen between DAP-kinase gene promoter methylation and breast cancer disease, so that the gene promoter methylation in patients compared to healthy subjects was substantially higher ($p < 0.05$). On the other hand there is no significant coloration between IL-17 gene polymorphisms and DAP-kinase gene methylation ($P > 0.05$)

Conclusion: Due to the promoter methylation of genes isone of the mechanisms of epigenetic silencing of genes, it seems that the gene promoter methylation DAP-kinase is associated in increases of the risk of breast cancer in women.

Key words: Polymorphism, Breast Cancer, IL-17, Methylation, DAP-Kinase

***Coresponding Author: Naeimi S,** Department of Genetics, Colleague of Science, Kazerun branch, Islamic Azad University,Kazerun, Iran
Email: naeimis@kau.ac.ir

Please cite this article as follows:
Naeimi S. Investigation of Interleukin-17 Gene Polymorphism on DAP-Kinase Gene Promoter Methylation in Patients with Breast Cancer. Armaghane-danesh 2016; 20 (11): 1011-1023.