

بررسی میزان بیان ژن DAPK در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۴ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵ آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵

سیروس نعیمی*

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

زمینه و هدف: از مشکلات اصلی سرطان وجود عدم تعادل مابین رشد سلولی و مرگ سلولی می‌باشد که به دلیل تغییر در میزان بیان ژن‌های مربوط به این مکانیسم‌ها است. از جمله ژن‌های دخیل در این امر می‌توان به ژن Death-associated protein kinase (DAPK) اشاره نمود. مطالعات نشان داده است که بیان ژن‌ها تحت تاثیر متیلاسیون نواحی پروموتری قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن مذکور و تاثیر متیلاسیون بر میزان بیان این ژن و ارتباط آن با ایجاد سرطان پستان در زنان بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۸۰ نفر به‌عنوان گروه کنترل شرکت داشتند که از شهریورماه ۱۳۹۳ تا اسفند ۱۳۹۵ به بیمارستان‌های شهید فقیهی و نمازی شیراز مراجعه کرده بودند. این مطالعه در مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون انجام گردید. از لنفوسیت‌های خون محیطی افراد مورد مطالعه، جهت استخراج mRNA و ساختن cDNA و جداسازی DNA استفاده شد و جهت تعیین میزان بیان ژن و متیلاسیون به ترتیب از روش Real-time PCR و Methylation-specific (MS)-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژن DAPK در بیماران و افراد سالم تفاوت معناداری را نشان داد به این صورت که بیان آن در بیماران نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت ($P=0/0156$). از طرفی ارتباط معناداری میان بیان ژن یاد شده و متیلاسیون پروموتر ژن وجود نداشت ($P=0/13$).

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان می‌دهد که، کاهش میزان بیان ژن DAPK در ابتدای افراد به سرطان پستان، نقش موثری را ایفا می‌نماید.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، پروتیین کیناز همراهی کننده مرگ، بیان ژن، متیلاسیون.

* نویسنده مسئول: کازرون، کیلومتر ۵ بوشهر، صندوق
پستی ۱۶۸-۳۱۳۵.

تلفن: ۰۷۱-۴۲۲۴۳۹۳۰-۴۰

E-mail: naeimis@kau.ac.ir

مقدمه

جهش‌یافته به واسطه فرآیند آپوپتوزیس از بین می‌رود.^۲ به استثنای موارد معدودی از سرطان‌ها که به واسطه 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.^۳ مولکول Death-associated protein kinase (DAPK) یک پروتیین سرین ترئونین کیناز با وزن

سرطان پستان، دومین سرطان شایع پس از سرطان غیرملانومایی پوست و همچنین دومین عامل مرگ‌ومیر در زنان در ایالات متحده می‌باشد.^۱ 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 فعال شده و در نهایت سلول

مولکولی ۱۶۰ کیلو دالتونی می‌باشد که از طریق مسیر کلسیم-کالمودولین تنظیم می‌گردد. این مولکول نقش مهمی در سیستم آپوپتوزی ایفا می‌نماید. این پروتیین در ساختار میکروفیلانته‌های اکتین شرکت نموده و دارای مدول‌های تکراری آنکرین و دومین مرگ می‌باشد. بسیاری از پروتیین‌های خانواده DAPK در فرآیند آپوپتوزیس نقش ایفا نموده که اعمال خود را از مسیرهای رسپتور P55TNF، رسپتور Fas/Apo1، DR3-5، FADD/MORT-1، RIP و TRADD ایفا می‌نمایند.^۹

میزان بیان mRNA این مولکول در ۸۰٪ از لیمفوماهای سلول‌های B و لوکمیا و ۳۰ تا ۴۰٪ از رده‌های سلولی سرطان‌های مثانه، پستان و کلیه، پایین‌تر از حد متعارف می‌باشد و نقش این پروتیین در متاستاز سرطان ریه مشخص شده است.^{۶۴} مطالعات نشان می‌دهد که سرطان پستان همچون دیگر سرطان‌ها با تغییرات اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون پروموتور ژن‌ها همراه است.^{۸۶} متیلاسیون باعث تغییر در تنظیم غیرطبیعی فاکتورهای نسخه‌برداری و به دنبال آن تغییر در تکثیر سلولی، بقای سلولی و همچنین تمایز سلولی می‌گردد.^{۹-۱۱} با توجه به اهمیت این پروتیین در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده و نقش آن در ایجاد سرطان، در این مطالعه به بررسی میزان بیان و متیلاسیون پروموتور ژن DAPK در استعداد ابتلای زنان ایرانی به سرطان پستان پرداخته شد.

روش بررسی

گروه مورد مطالعه شامل ۸۰ نفر مبتلا به سرطان پستان بود که در طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ به بیمارستان‌های شهید فقیهی و نمازی شیراز مراجعه نموده و ابتلای به سرطان آن‌ها با بررسی‌های پاتولوژیک تایید شده بود. گروه کنترل شامل ۸۰ نفر که از نظر سن با گروه بیمار همخوانی داشتند و فاقد هرگونه سابقه سرطان در خود و بستگان درجه اول بودند. در این بررسی، تمامی شرایط اخلاق پزشکی رعایت گردید و از بیماران رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. از داوطلبان حدود ۱ ml خون سیاهرگی همراه با ماده ضد انعقاد EDTA (محلول ۱۰٪) گرفته شده، جهت استخراج mRNA از کیت InViSorb™ RNA preparation kit II (محلول ۱۰٪) گرفته شده، جهت استخراج mRNA از کیت RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Cat#1062100300, Invitex GmbH, Berlin, Germany) استفاده گردید و

استفاده از برنامه زیر، انجام شد:

۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ °C به مدت یک دقیقه و مرحله جداسازی، ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ °C به مدت یک دقیقه و ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. در همه موارد، داده‌ها با ژن 18S به‌عنوان ژن خانه‌دار (House-keeping gene) مقایسه شد.

جهت بررسی متیلاسیون ناحیه پروموتور ژن DAPK از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید. به‌منظور واکنش Methylation-specific (MS)-PCR، از دو تیوب جداگانه برای هر نمونه استفاده گردید. به استثنای پرایمرهای اختصاصی، محتویات هر دو تیوب مورد آزمایش یکسان بود. برای انجام واکنش در هر تیوب مقدار ۹/۶۵ μl آب دیونیزه، ۱/۵ μl بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۴ μl منیزیم کلراید با غلظت ۵۰ mmol، ۰/۴۵ μl dNTP با غلظت ۱۰ mmol، آغازگرهای رفت و برگشت به مقدار ۰/۶ μl با غلظت ۱۰ pmol، ۱/۵ μl از آنزیم Taq پلی مراز با غلظت ۵ U/μl و ۱ μl از DNA الگو با غلظت ۳۰۰ nmol استفاده گردید. برنامه حرارتی واکنش در ۳۵ چرخه و با دمای هم سرشته شدن ۵۷/۱ °C و ۵۸/۸ °C به ترتیب برای بررسی متیلاسیون و عدم متیلاسیون مورد استفاده قرار گرفت. پس از

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش Real-time PCR

DAP-K آغازگر رفت	CTAGACGTGGTCCGGTATCT
DAP-K آغازگر برگشت	GGTGCGTATCCTTTCGAAGT
18S آغازگر رفت	GTTGATTAAGTCCCTGCCCT
18S آغازگر برگشت	TCCGAGGGCCTCACTAAACC

جدول ۲: پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش MSPPCR ژن DAPK

DAP MF	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC
DAP MR	CCCTCCCAAACGCCGA
DAP UMF	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT
DAP UMR	CAAAATCCCTCCCAAACACCAA

MF: آغازگر رفت متیلاسیون، MR: آغازگر برگشت متیلاسیون، UMF: آغازگر رفت عدم متیلاسیون، UMR: آغازگر برگشت عدم متیلاسیون

بررسی میزان بیان ژن DAPK و فاکتورهای پیش‌آگهی دهنده تومور شامل ناحیه درگیر شده در بیماری، نوع تومور، مرحله بیماری (Stage) و وضعیت تهاجم تومور مورد بررسی قرار گرفتند که تفاوت معناداری از نظر آماری را نشان ندادند (به ترتیب $P=0/09$ ، $P=0/75$ ، $P=0/07$ ، $P=0/1$). همچنین ارتباط میزان بیان فاکتور DAPK و دیگر فاکتورها مانند تهاجم تومور، مرحله تومور و درگیری غدد لنفاوی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصله نشان دهنده ارتباط میان میزان بیان فاکتور DAPK و درگیری غدد لنفاوی بود (CI: $0/07-1/09$). $P=0/02$ (OR: $0/36$) از طرف دیگر ما به بررسی میزان بیان DAPK و ارتباط آن با متیلاسیون پروموتور ژن DAPK بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداختیم که نتایج، نشان‌دهنده نبود ارتباط آن‌ها با یکدیگر بود ($P=0/13$).

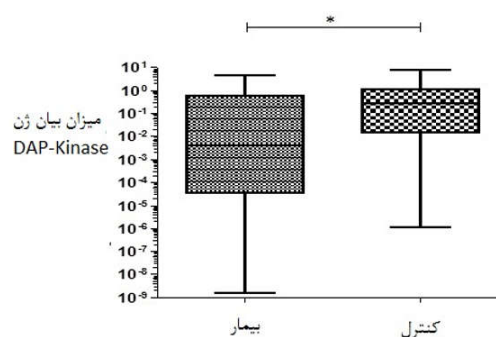
بحث

مطالعه انجام شده نشان از کاهش بیان ژن DAPK در بیماران مبتلا به سرطان پستان بود. همچنین مشخص گردید که میزان بیان این مولکول با درگیری گره‌های لنفاوی بیماران در ارتباط بوده، بدین صورت که میزان بیان این مولکول در افرادی که درگیری گره‌های لنفاوی با بیماری را داشتند، نسبت به افرادی که درگیری گره‌های

پایان واکنش، محصول در ژل آگارز ۲/۵٪ حاوی ژل رد در بافر TAE با غلظت یک برابر، با ولتاژ ۸۵ ولت، الکتروفورز شد. توالی‌های آغازگرهای مورد لزوم در جدول ۲ آورده شده است. برای کنترل مثبت و منفی از نمونه‌های کنترل منفی (Lot Human HCT116DKO (No. ZRC174904, Zymo Research, Orange, CA, USA) و برای کنترل مثبت آن از نمونه کنترل مثبت (Lot Human HCT116DKO (Lot No. ZRC174904, Zymo Research, Orange, CA, USA) استفاده شد. مطالعه آماری با استفاده از برنامه‌های آماری SPSS software, version 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) و با Chi-square test و Mann-Whitney U test بسته به مورد، استفاده شد. مقادیر $P \leq 0/05$ ، به‌عنوان مقادیر معنادار محاسبه گردید.

یافته‌ها

در این بررسی میزان بیان ژن DAPK در خون محیطی ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۸۰ نفر به‌عنوان گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی‌ها نشان می‌دهد که لگاریتم میانگین میزان بیان ژن DAPK در گروه بیماران برابر با $5/02$ - با انحراف معیار $1/2$ بود. این مقدار در مورد افراد کنترل شامل $4/6$ - با انحراف معیار $1/4$ به‌دست آمد. نتایج حاصل با استفاده از Chi-square test و Mann-Whitney نشان داد که تفاوت آماری معناداری بین میزان بیان ژن DAPK در بیماران و گروه کنترل وجود داشت (CI: $0/08-1/05$ ، $P=0/0156$) (OR: $0/39$) (نمودار ۱). از طرف دیگر نتایج حاصله از



نمودار ۱: میزان بیان DAPK در بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل

کمتری از پروتیین یادشده را بیان کرده‌اند به‌طور چشمگیری در درمان‌های شیمی‌درمانی بالاتر می‌باشد.^{۱۶} در مطالعه‌ای که توسط Kake و همکاران پذیرفت، به این نتیجه رسیده‌اند که پروتیین DAPK3 در کنترل تکثیر، مهاجرت و تهاجم سول‌های سرطانی نقش داشته و به‌احتمال می‌توان از آن به‌عنوان یک هدف جدید برای درمان سرطان ریه غیر سلول‌های کوچک (Non-small cell lung cancer) استفاده نمود.^{۱۷} Gade و همکارانش به این نتیجه رسیدند که مولکول DAPK1، نقش مهمی در مسیر سیگنالینگ خودخواری و آپوپتوزیس از طریق مولکول‌های فاکتور ۶ و افزایش‌دهنده‌های CCAAT متصل شونده به پروتیین B در بیماری لوسمی لیمفاتیکی مزمن (Chronic lymphocytic leukemia) ایفا می‌نماید.^{۱۸} Zhao و همکاران در مطالعه انجام شده بر روی سلول‌های سرطانی پستان به این نتیجه رسیدند که می‌توان از این مولکول به‌عنوان یک استراتژی درمانی در سرطان‌هایی که در آن ژن P53 دچار مشکل شده است، استفاده نمود.^{۱۹} در این مطالعه میزان بیان ژن DAPK در بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم بررسی گردید که نتایج حاکی از تفاوت معنادار میزان بیان ژن یادشده در افراد مورد مطالعه می‌باشد و به نظر می‌رسد که این فاکتور می‌تواند نقش موثری در ایجاد این بیماری داشته باشد.

سپاسگزاری: این مطالعه حاصل طرح پژوهشی بررسی میزان بیان ژن DAPK در بیماران مبتلا به سرطان پستان در سال ۱۳۹۳ به کد ۱۵۲۹۵۰۵۱۹۰۰۱ می‌باشد. بدین وسیله کمال تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی اعلام می‌دارم.

لنفای در آن‌ها رخ نداده است، از کاهش چشمگیری برخوردار بوده است. مطالعات متعددی در مورد نقش ژن DAPK در سرطان انجام شده که همگی موید نقش این ژن در ایجاد سرطان‌های مختلف می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Inbal و همکاران انجام شد، دریافتند که این پروتیین در کلون‌های Lung carcinoma که متاستاز شدید را نشان می‌دهند، بیان نمی‌شود. همچنین آن‌ها دریافتند که سلول‌های ترانسفکت شدن با ژن DAPK، حساسیت بیشتری را نسبت به آپوپتوزیس در محیط آزمایشگاهی نشان می‌دهد.^{۱۲} در مطالعه دیگری که توسط Jang و همکاران انجام شد به این نتیجه رسیدند که پروموتور DAPK به‌وسیله فاکتور TGFb فعال می‌گردد و این فعال شدن را از طریق مسیر SMAD ها انجام می‌دهد.^{۱۳} Raval و همکاران دریافتند که بیان ژن مذکور کمابیش در تمامی موارد Chronic lymphocytic leukemia خاموش گردیده که به دلیل متیلاسیون پروموتور ژن یادشده، صورت گرفته است.^{۱۴} Simpson و همکاران به این نتیجه رسیدند که فقدان بیان این ژن با تهاجم توموری در بیماران مبتلا به Sporadic pituitary tumors همراه است.^{۱۵} نقش اصلی و مهم پروتیین DAPK، فعال نموده مسیر آپوپتوزیس و به‌دنبال آن مرگ سلولی می‌باشد که این عمل منجر به از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌گردد.

تغییر در میزان بیان آن می‌تواند منجر به اختلالات فیزیولوژیکی بدن گردد. در مطالعه‌ای که توسط Jiang و همکاران انجام گردید، پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که شانس بقای افرادی که میزان بالاتری از این مولکول را بیان می‌کنند نسبت به افرادی که میزان

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):10-29.
2. Garcia-de Teresa B, Hernández-Gómez M, Frías S. DNA damage as a driver for growth delay: chromosome instability syndromes with intrauterine growth retardation. *Biomed Res Int* 2017;2017:8193892.
3. Dimock K, McCormick H, editors. Emery's Elements of Medical Genetics. New York, NY: Elsevier Churchill Livingstone; 2007. P. 322-3.
4. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 1997;16(5):998-1008.
5. Singh P, Ravanan P, Talwar P. Death associated protein kinase 1 (DAPK1): a regulator of apoptosis and autophagy. *Front Mol Neurosci* 2016;9:46.
6. Zhang J, Yu XL, Zheng GF, Zhao F. DAPK promoter methylation status correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 2015;15(5):609-17.
7. Gerstung M, Eriksson N, Lin J, Vogelstein B, Beerwinkler N. The temporal order of genetic and pathway alterations in tumorigenesis. *PLoS One* 2011;6(11):e27136.
8. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002;21(35):5462-82.
9. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007;117(11):3155-63.
10. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6(2):107-16.

11. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8(4):286-98.
12. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997;390(6656):180-4.
13. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 2002;4(1):51-8.
14. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2007;129(5):879-90.
15. Simpson DJ, Clayton RN, Farrell WE. Preferential loss of death associated protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene* 2002;21(8):1217-24.
16. Jiang Y, Xu P, Yao D, Chen X, Dai H. CD33, CD96 and Death Associated Protein Kinase (DAPK) Expression Are Associated with the Survival Rate and/or Response to the Chemotherapy in the Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). *Med Sci Monit* 2017;23:1725-32.
17. Kake S, Usui T, Ohama T, Yamawaki H, Sato K. Death-associated protein kinase 3 controls the tumor progression of A549 cells through ERK MAPK/c-Myc signaling. *Oncol Rep* 2017;37(2):1100-1106.
18. Gade P, Kimball AS, DiNardo AC, Gangwal P, Ross DD, Boswell HS, et al. Death-associated protein kinase-1 expression and autophagy in chronic lymphocytic leukemia are dependent on activating transcription factor-6 and CCAAT/enhancer-binding Protein-β. *J Biol Chem* 2016;291(42):22030-22042.
19. Zhao J, Zhao D, Poage GM, Mazumdar A, Zhang Y, Hill JL, et al. Death-associated protein kinase 1 promotes growth of p53-mutant cancers. *J Clin Invest* 2015;125(7):2707-20.

Evaluation of the DAPK gene expression level in peripheral blood lymphocytes of patients with breast cancer

Sirous Naeimi Ph.D.*

Department of Genetics, Colleague of Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

* Corresponding author: Bushehr 5th Kilometer, Kazerun, Iran.
P.O.Box: 73135-168
Tel: +98- 71- 42243930-40
E-mail: naeimis@kau.ac.ir

Abstract

Received: 15 Jul. 2017 Revised: 23 Jul. 2017 Accepted: 04 Feb. 2018 Available online: 14 Feb. 2018

Background: The main causes and difficulties of cancer are the imbalance between cell growth and cell death. This event is the results of changes in the expression level of genes related to these mechanisms. Among genes including in this case, death-associated protein kinase (DAPK) can be mentioned. Studies have shown that the expression of genes is influenced by the methylation of promoter regions. The purpose of this research was to evaluate the expression of the mentioned gene and the effect of methylation on the expression of this gene and its relationship with developing breast cancer in women.

Methods: Eighty patients with breast cancer and 80 healthy individuals participated in this case-control study which has been referred to Shahid Faghihi and Namazi hospitals, Shiraz city, from August 2014 to March 2017. This study was carried out at the Genetic Research Center of Islamic Azad University, Kazerun Branch, Iran. Peripheral blood lymphocytes were lysed and the mRNAs were extracted using the InViSorb™ RNA preparation kit II (Cat#1062100300, Invitek GmbH, Berlin, Germany) and cleaned up with Qiagen RNeasy spin columns. The first-strand cDNA was synthesized according to the high capacity cDNA reverse transcription kit procedure. For DAPK gene expression, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) PCR technique combines the quantitative performance of SYBR® Green-based real-time PCR, used. This technique is gainful, easy-to-use, and emphasizes only on the genes that you want. We designated 18S-rRNA gene, as our house-keeping gene. For determine of methylation, methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) method was used.

Results: The achieved results from this research show that the levels of DAPK gene expression have a significant difference. The rate of expression in patients was significantly reduced compared with the control group ($P=0.0156$). Also, the relationship between expression of DAPK factor and lymph node involvement was investigated. The results show the relationship between the factors studied. On the other hand, there was no significant relationship between the expression level of this gene and its promoter methylation ($P=0.13$).

Conclusion: This research shows that reduction in the rate of DAPK gene expression plays an effective role in the patients with breast cancer.

Keywords: breast cancer, death-associated protein kinases, gene expression, methylation.