# بررسی وضعیت متیلاسیون ژن WT1 و اثر کورکومین بر روی متیلاسیون این ژن

**۱- شقایق موسوی ۲- مهدی آزاد ۳- ندا کرمی**

**۱- دکترای پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین**
**۲- دانشیار هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین**
**۳- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین**

مقدمه: سرطان پانکراس یکی از کشنده ترین سرطان ها در جهان است. پروتئین مرتبط با تومور۱ (WT1) ویلمز (WTAP)، به عنوان یک پروتئین هسته ای شناخته می شود. در این مطالعه به بررسی متیلاسیون ژن WT1 بر روی رده سلولی MIAPaCa2 و تأثیر کورکومین پرداخته شد که با روش MS-HRM انجام شد.

روش و مواد: سلول ها در پلیت های کشت سلولی کشت داده شدند، پس از تیمار سلول ها با کورکومین، سلول ها برداشت شد و از محیط جدا شدند. ارزیابی متیلاسیون و اثر کورکومین توسط روش HRM انجام شد.

یافته‌ها: در سلول شاهد، ژن WT1 حدود ۷۰ درصد غیر متیله بود و پس از تیمار ۸۰ میکرومولار، میزان متیله کورکومین کاهش یافت.

بحث و نتیجه گیری: کورکومین همراه با داروهای شیمی درمانی می تواند به بهبودی بیمار کمک کند. کورکومین می تواند به عنوان یک ترکیب موثر در درمان انواع سرطان از جمله سرطان پانکراس استفاده شود.

**مقدمه:** سرطان پانکراس یکی از کشنده ترین سرطان ها در جهان است. این سرطان پیش آگهی بسیار بدی دارد. به عنوان قاتل خاموش شناخته می شود، زیرا علائم در مراحل پیشرفته بیماری ایجاد می شود، چهارمین دلیل برجسته مرگ در جهان است [۱, ۲]. مرگ و میر ناشی از این سرطان در سراسر جهان رو به افزایش است و در سال ۲۰۳۰ به دومین علت برجسته مرگ و میر در جهان تبدیل خواهد شد[۳]. از آنجایی که بیماران مبتلا به این بیماری در مرحله متاستاتیک تشخیص داده می شوند، میزان بقای ۵ ساله آنها کمتر از ۵ درصد است[۴].

مهم‌ترین دلایل شروع و پیشرفت سرطان، جهش‌های نقطه‌ای، حذف و اضافه شدن هستند، علاوه بر این دلایل، عوامل اپی ژنتیکی نقش مهمی در تنظیم بیان ژن و شیوع سرطان دارند[۵, ۶].

تعریف اپی ژنتیکی تغییر در بیان ژن بدون تغییر توالی نوکلئوتیدی است و این تغییرات ارثی هستند [۷]. یکی از فرآیندهای اپی ژنتیکی که بیان ژن را تحت تاثیر قرار می دهد متیلاسیون DNA است[۸]. متیلاسیون DNA توسط آنزیم های DNA متیل ترانسفراز انجام می شود. DNMT1 آنزیم مهم برای متیلاسیون پس از رونویسی است.

در سلول های سرطانی دو الگوی متیلاسیون را می توان مشاهده کرد. از یک طرف، پروتوآنکوژن ها یا ژن های دخیل در پیشرفت تومور به دلیل هیپومتیلاسیون جهانی یا سطوح پایین متیلاسیون فعال می شوند. از سوی دیگر، ژن‌های سرکوبگر تومور، که در ریشه‌کنی تومور نقش دارند، به دلیل متیلاسیون نواحی پروموتور خود، خاموش می‌شوند، متیلاسیون این نواحی پروموتر باعث تشکیل هتروکروماتین و خاموش شدن ژن‌ها می‌شود[۸, ۹].

پروتئین مرتبط با تومور ویلمز ۱ (WTAP) (WT1)، معروف به پروتئین هسته ای. با این حال، WTAP ارتباط نزدیکی با تومورهای بدخیم دارد تجزیه و تحلیل اضافی ارتباط بین WTAP و ویژگی های پاتولوژیک نشان می دهد که سطح بیان WTAP ارتباط نزدیکی با فاز متاستاز دارد [۱۰].

کورکومین یک فیتوکمیکال پلی فنولیک جدا شده از گیاه Curcuma longa L. (Zingiberaceae). کورکومین یک ترکیب آنتی اکسیدانی است که اثرات ضد تکثیری و آپوپتوتیکی دارد. کورکومین بر اصلاح فعالیت پروتئین های مختلف، آنزیم هایی مانند سایتوکین های التهابی، فاکتورهای رونویسی تأثیر می گذارد. دارای اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد توموری است [۱۱].

high-resolution melts (HRM) یک روش کمی با وضوح بالا برای بررسی متیلاسیون در سطح ژن است. HRM روشی سریع، قوی و قابل اعتماد است. علاوه بر این، HRM یک تکنیک ارزان و سریع است [۱۲].

هدف از مطالعه حاضر، بررسی متیلاسیون WT1 بر روی رده سلولی MIAPaCa2 و اثر کورکومین بر متیلاسیون این ژن است که با روش‌های متیلاسیون، ذوب با وضوح بالا حساس به متیلاسیون (MS-HRM) انجام شد.

## ۲-روش و مواد:

### ۱.۲. کشت سلولی:

رده سلولی MiaPaca-2 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در RPMI 1640 Gibco کامل شده با ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS؛ Gibco) و ۱٪ آنتی بیوتیک (۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر استرپتومایسین) کشت داده شد. در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در اتمسفر ۵٪ CO2. سلول ها در صفحات کشت سلولی، هر چاهک حاوی $۶\times۱۰^{۵}$ سلول برای تمام غلظت ها و کنترل کشت داده شدند. پس از تیمار سلول ها با کورکومین با غلظت اتانول ۹۹ درصد، رقت های ۲،۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرومولار تهیه شد. در ساعت های ۲۴، ۴۸ و ۷۲، سلول ها برداشت و از محیط جداسازی شدند.

### ۲/۲. جداسازی **DNA** و تبدیل بی سولفیت

پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با کورکومین، سلول ها برداشت شدند و DNA آنها استخراج شد. DNA استخراج شده توسط کیت استخراج DNA (GeneALL)، کره. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانو دراپ با نسبت ۲۸۰/۲۶۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از کیت تبدیل بی سولفیت (Thermo Scientific EpiJET Bisulfite Conversion Kit) با بی

سولفیت سدیم تیمار شدند. طبق پروتکل سازنده تبدیل بی سولفیت فرآیندی است که شامل مجموعه ای از واکنش های شیمیایی است که منجر به تبدیل سیتوزین های متیله نشده به اوراسیل می شود در حالی که سیتوزین های متیله تغییر نمی کنند. یک اوراسیل با یک باقیمانده تیمین در طی PCR جایگزین می شود. وضعیت متیلاسیون WT1 توسط MS-HRM تجزیه و تحلیل شد.

### ۲/۳. تجزیه و تحلیل متیلاسیون پروموتر **WT1** توسط **MS-HRM**

DNA تیمار شده با استفاده از ۲ جفت آغازگر طراحی شده برای تکثیر آلل های متیله و غیر متیله پروموتر تحت MS-PCR قرار گرفت.DNA با یک مجموعه پرایمر اختصاصی متیل و با مجموعه پرایمر اختصاصی غیر متیل دیگری برای ژن های WT1 تکثیر شد (جدول. ۱).

جدول ۱: پرایمر پروموتر WT1

| | | |
|---|---|---|
| WT1 | M-Forward | ۵′-GTTAGGCGTCGTCGAGGTTA-3′ |
| | M-Reverse | ۵′-AAAACGCAAAATCCAACACC-3′ |
| | U-Forward | ۵′-TGGGATTTGGGTGGTATTTG-3′ |
| | U-Reverse | ۵′-CACCAACACCCACTACACCA-3′ |

PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۱۰ میکرولیتر Hot Start 2x Master Mix Blue (Ampliqon)، ۰٫۵ میکرومولار از هر پرایمر و ۳ میکرولیتر DNA تیمار شده بود. تکثیر PCR برای ژن DNMT1 انجام شد.

### ۲/٤. تجزیه و تحلیل متیلاسیون پروموتر **WT1** توسط **MS-HRM**

MS-HRM یک روش برای استفاده از PCR برای ارزیابی متیلاسیون است. برای ارزیابی متیلاسیون مبتنی بر MS-HRM، وضعیت متیلاسیون پروموترهای ژن WT1 را با تجزیه و تحلیل و تجزیه و تحلیل MS-HRM بررسی کردند.

جستجوی جزایر CpG در پروموتر MGMT با استفاده از سایت UCSC انجام شد. جزایر CG توسط سایت UCSC شناسایی شدند. (دانشگاه کالیفرنیا سانتا کوروز).

ما از پرایمرهایی استفاده کردیم که برای تکثیر DNA متیله و غیر متیله مطابق شکل ۱ طراحی شدند، پرایمرها با استفاده از نرم افزار Bisearch و سایت NCBI طراحی و تایید شدند.

روش PCR و آنالیز HRM با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q (شرکت QIAGEN) انجام شد. هر PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۴ میکرولیتر (۵x Hot FIREpol HRM Mix (No ROX، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۳ میکرولیتر

DNA تبدیل شده به بی سولفیت انجام شد. تکثیر PCR برای ژن WT1 انجام شد. مرحله ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۲ دقیقه، ۴۷ چرخه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۹ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی گراد برای ۲۳ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۲ ثانیه و برای همه رقت ها انجام شد. فرآیند ذوب به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و گرادیان حرارتی ۰،۰۲۵ درجه سانتیگراد در هر ثانیه برای هر مرحله اندازه گیری فلورسانس، از ۶۰ درجه سانتیگراد تا ۹۵ درجه سانتیگراد انجام شد.

## ۲/۵. ارزیابی تبدیل بی سولفیت سدیم و خطی بودن MS-HRM

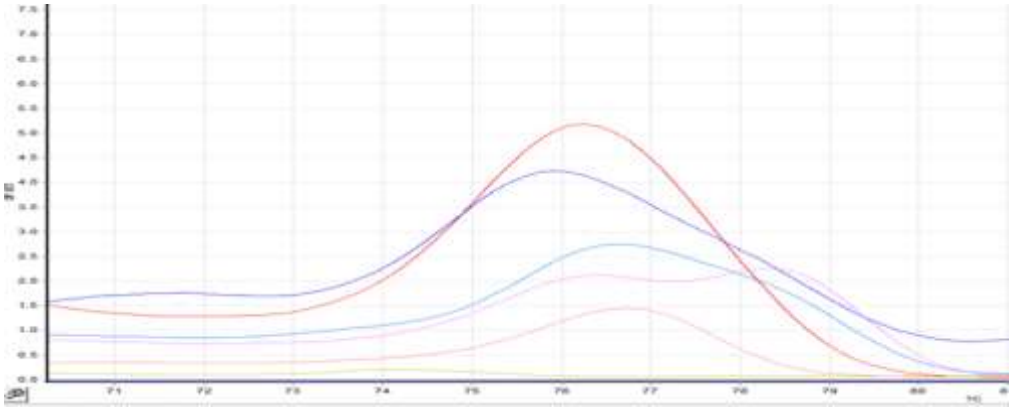
ما روش PCR ۵x Hot FIREpol HRM Mix (ROX)، را برای غربالگری سریع و تشخیص دقیق تغییرات در وضعیت متیلاسیون CpG DNA تبدیل شده به بی سولفیت با استفاده از ابزار Rotor Gene 6000 انجام دادیم. با نرم افزار Rotor gene Series Q آنالیز شد. تمامی نمونه ها با کنترل مثبت ۱۰۰٪ متیله شده ( DNA EpiTect MethyLight PCR کیت Qiagen) مقایسه شدند.

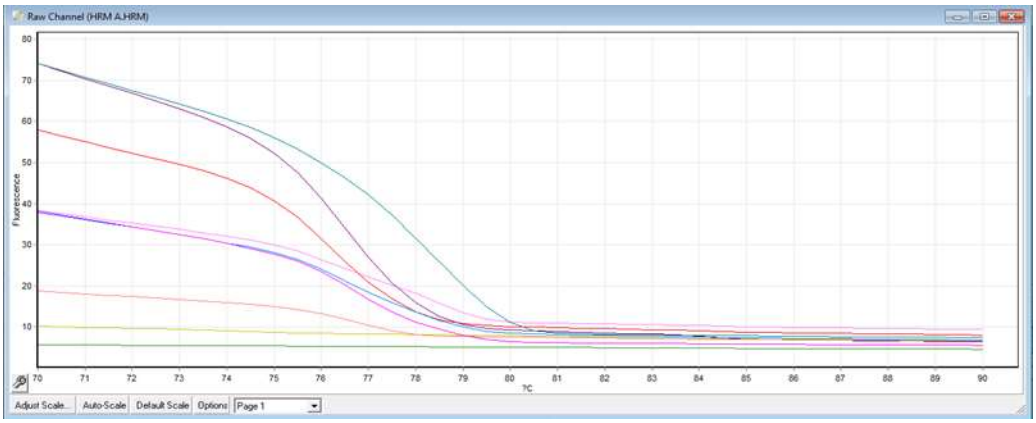
سطح متیلاسیون هر نمونه با مقایسه مشخصات ذوب محصول PCR و استانداردها با نسبت مشخصی از الگوهای متیله و غیر متیله با بی سولفیت سدیم و سنجش MS-HRM که در دو نسخه انجام شد، ارزیابی شد. DNA غیر متیله (۰٪) به عنوان DNA مرجع کنترل برای محاسبه فلورسانس دیفرانسیل استفاده شد. تکثیر PCR انجام شد

حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۴ میکرولیتر (۵x Hot FIREpol HRM Mix) با ROX، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، و ۳ میکرولیتر DNA تیمار شده با بی سولفیت. سطح متیلاسیون هر نمونه با مقایسه منحنی/پیک ذوب نرمال شده محصول PCR با منحنی ها/پیک های ذوب نرمال شده کنترل ها ارزیابی شد. تفسیر داده ها بر اساس دستورالعمل اسمیت و همکاران [۲۵] انجام شد.

## ۲/۳. نتیجه

در مطالعه حاضر از روش منحنی استاندارد استفاده شد، منحنی های استاندارد تولید شده از استانداردهایی با سطوح متیلاسیون شناخته شده برای اعتبار سنجی روش کمی HRM استفاده شد. شکل ۱ نمونه ای از منحنی استاندارد به دست آمده با روش HRM را نشان می دهد. استاندارد متیلاسیون همراه با نمونه ها آنالیز می شوند. با مقایسه منحنی های HRM استانداردها و نمونه ها می توان یک سطح متیلاسیون تقریبی را تعیین کرد. سنجش MS-HRM به طور همزمان بر روی ۲۱ (همه رقت) نمونه بی سولفیت–DNA از هر یک از سه زمان انجام شد. در سلول شاهد بدون تیمار کورکومین، ژن WT1 حدود ۷۰ درصد متیله نشده و پس از تیمار ۸۰ میکرومولار نرخ غیر متیله کورکومین کاهش یافته است.






شکل ۱ : منحنی استاندارد نمونه کنترل مثبت با رقت های ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۱۰ و ۰

## ۳. بحث و نتیجه گیری:

سرطان لوزالمعده یکی از کشنده ترین سرطان هاست، این سرطان یک بیماری با پیشرفت موضعی و متاستاتیک است. جمسیتابین به درمان پذیرفته شده برای کامپیوترهای شخصی پیشرفته تبدیل شد، تنها ارلوتینیب علاوه بر جمسیتابین در مقادیر کم مزایای بقای جمسیتابین را نشان داد[۱۲]. در مطالعه حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن WT1 و اثر کورکومین بر رده سلولی سرطان پانکراس بر روی ژن WT1 با روش HRM بررسی شد.

مکانیسم های اپی ژنتیک مثل متیلاسیون نادرست DNA ، یکی از معمول ترین و مهمترین تغییرات مولکولی است که در گسترش سرطان انسان شناسایی شده است. از سوی دیگر، کورکومین یک اثر هیپومتیلاسیون DNA را نشان می‌دهد و باعث بیان ژن هایی که در اثر متیلاسیون غیر فعال شدند، می شود [۱۳].

در نتایج ما، در روش HRM مشخص شد که ژن WT1 (یکی از ژن های مهم در سرطان‌زایی) در رده سلولی Miapaca2 متیله نیست. در سرطان، الگوی سوماتیک متیلاسیون DNA در سلول ها تغییر می کند. این تبدیل ها حاوی افزایش متیلاسیون جزیره CpG است که واسطه خاموش شدن ژن سرکوبگر تومور و هیپومتیلاسیون DNA ژنومی است که می تواند منجر به بی ثباتی ژنوم شود [۱۴].

بر اساس نتایج به دست‌آمده در این مطالعه، فعالیت هیپومتیلاسیون کورکومین و همچنین فعال‌سازی ژن‌هایی که توسط متیلاسیون غیرفعال شده‌اند در چندین مطالعه از جمله کادرین‌ها، p16، پروتئین اسیدی و غنی از سیستئین در PANC-1 و MIA PaCa ( دو سل لاین سرطان پانکراس) مشاهده شد[۱۱].

متأسفانه اگرچه گسترش و پیشرفت هدف درمانی در کنترل و سرکوب سرطان، سرطان پانکراس همچنان به عنوان یکی از شایع ترین و کشنده ترین سرطان ها باقی مانده است [۱۵].

پیامدهای اصلی کورکومین به دلیل القای آپوپتوز، ضد تکثیر، رگزایی و مهار استرس اکسیداتیو است، در چندین مطالعه مشاهده شد که دو آنالوگ EF31 و UBS109 کورکومین مصنوعی با فعال کردن microRNA های سرکوب کننده، پیشرفت تومور پانکراس را مهار کردند. [۳, ۱۶].

نکته جالب در مورد کورکومین این است که همراه با غذا مصرف می شود و ایمنی کورکومین در مطالعات مختلف گزارش شده است. مطالعات دیگر نشان داد که کورکومین به تنهایی می تواند در برابر آدنوکارسینوم پانکراس استفاده شود، اگرچه ترکیب این عامل با سایر داروهای شیمی درمانی می تواند موثرتر باشد، Epelbaume و همکاران، در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که کورکومین و جمسیتابین در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته پانکراس دارای اثر درمانی زیادی است [۱۷].

در آینده درمان سرطان به سمت پزشکی شخصی می رود و با هدف قرار دادن یک ژن خاص برای شناسایی افراد مستعد به سرطان و درمان بیمار با بیومارکرهای خاص، کورکومین با تاثیر آن بر متیلاسیون و سرکوب متاستاز می تواند به عنوان یک ترکیب تاثیرگذار در درمان همه افراد مورد استفاده قرار گیرد و برای انواع سرطان از جمله سرطان پانکراس مورد استفاده قرار بگیرد [۱۸].

## ٤. نتیجه گیری:

در مطالعه ما نشان داد که کورکومین نقش مهمی در کاهش متیلاسیون دارد که می تواند هیپومتیلاسیون را افزایش دهد و بیان سرکوبگرهای تومور را افزایش دهد، زیرا سرطان پانکراس درمان قطعی ندارد و کشنده است، مصرف کورکومین همراه با داروهای شیمی درمانی می تواند به درمان و کنترل پیشرفت بیماری کمک کند. .

## ٥. قدردانی

این پژوهش با حمایت مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. همچنین از همکاران دانشگاه علوم پزشکی قزوین که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر می کنیم.

تضاد منافع

همه نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

منابع :


۱. Akika, R., et al., *Region of interest methylation analysis: a comparison of MSP with MS-HRM and direct BSP.* Molecular biology reports, 2017. **44**(3): p. 295-305.

۲. Al-Yousef, N., et al., *Curcumin induces re-expression of BRCA1 and suppression of γ synuclein by modulating DNA promoter methylation in breast cancer cell lines.* Oncology reports, 2020. **43**(3): p. 827-838.

۳. Bimonte, S., et al., *Curcumin anticancer studies in pancreatic cancer.* Nutrients, 2016. **8**(7): p. 433.

٤. Chuang, J.C. and P.A. Jones, *Epigenetics and microRNAs.* Pediatric research, 2007. **61**(7): p. ٢٤-٢٩.

٥. Daugaard, I., et al., *The influence of DNA degradation in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue on locus-specific methylation assessment by MS-HRM.* Experimental and molecular pathology, 2015. **99**(3): p. 632-640.

٦. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy.* cell, 2012. ١٥٠(١): p. 12-27.

۷. Draht, M.X., et al., *Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome.* Clinical epigenetics, 2016. **8**(1): p. 1-١٠.

۸. Gall, T.M. and A.E. Frampton, *Gene of the month: E-cadherin (CDH1).* Journal of clinical pathology, 2013. **66**(11): p. 928-932.

۹. Gillen, S., et al., *Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages.* PLoS medicine, 2010. **7**(4): p. e1000267.

۱۰. Gundewar, C, et al., *Antiproliferative effects of curcumin analog L49H37 in pancreatic stellate cells: a comparative study.* Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology, 2015. **28**(3): p. 391.

۱۱. Shanmugam, M.K., et al., *Epigenetic effects of curcumin in cancer prevention*, in *Epigenetics of cancer prevention*. 2019, Elsevier. p. 107-128.

۱۲. Switzeny, O.J., et al., *MGMT promoter methylation determined by HRM in comparison to MSP and pyrosequencing for predicting high-grade glioma response.* Clinical epigenetics, ٨(١): p. 1-10. ٢٠١٦.

۱۳. Zoratto, F., et al., *Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis.* Tumor Biology, 2014. **35**(7): p. 6195-6206.

١٤. et al., *Expression of DNMT1 and DNMT3a are regulated by GLI1 in human pancreatic* ,.He, S *.cancer.* PloS one, 2011. **6**(11): p. e27684

١٥. Piffoux, M., E. Eriau, and P.A. Cassier, *Autophagy as a therapeutic target in pancreatic* ١٢٤ .١*cancer.* British Journal of Cancer, 202 :(٢)١٢٤ .p. 333-344

١٦. Rodrigues, F.C., N.A. Kumar, and G. Thakur, *Developments in the anticancer activity of structurally modified curcumin: An up-to-date review.* European Journal of Medicinal .Chemistry, 2019. **177**: p. 76-104

١٧. *Therapeutic potential of curcumin in treatment of pancreatic cancer:* ,.Hosseini, M., et al *current status and future perspectives.* Journal of cellular biochemistry, 2017. **118**(7): p. .١٦٣٤-١٦٣٨

١٨. *OF* Mousavi, S., et al., *ANTI-CANCER EFFECT OF CURCUMIN ON SURVIVAL AND EXPRESSION DNMT1 AND CDH1 GENES IN CELL LINE MIAPACA2.* Carpathian Journal of Food Science & .(Technology, 2021. **13**(3