مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۳/هفته دوم فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۱

بررسی بیان چندین ژن سرطانی بیضه‌ای در چندین رده‌ی سلولی سرطان پستان

شمس‌الدین یوسف آملی[۱]، دکتر لیلا کوکبی[۲]، دکتر کیوان مجیدزاده اردبیلی[۳]، رضوان اسماعیلی[۴]، دکتر حمزه رحیمی[۲]، فهیمه مریمی[۵]، دکتر مرتضی کریمی‌پور[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای (Cancer-testis genes) فقط در بافت طبیعی بیضه بیان می‌شوند؛ اما برخی از آن‌ها در بعضی از انواع سرطان‌ها بیان می‌شوند. این ژن‌ها می‌توانند کاندیدای امید بخشی برای درمان سرطان پستان باشند. این پژوهش برای بررسی فراوانی بیان این ژن‌ها در رده‌های سلولی سرطان پستان و مقایسه‌ی بیان آن‌ها در نمونه‌های سرطان پستان انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تحلیلی- توصیفی، پس از تهیه‌ی سه رده‌ی سلولی سرطان پستان (MCF-۷، BT-۲۰ و MDA-MB-۲۳۱) و کشت آن‌ها در محیط‌های مناسب، استخراج RNA و ساخت cDNA (Complementary DNA) انجام شد و با روش Multiplex RT-PCR (Multiplex real time-polymerase chain reaction)، بیان رونوشت‌های NY-ESO-۱ ۱a، NY-ESO-۱ ۱b، MAGE۳، SSX۲ و SCP۱ مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: هیچ کدام از رده‌های سلولی مورد مطالعه، ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای مورد بررسی را بیان نکردند. در حالی که تمام رده‌های سلولی مورد بررسی، ژن شاهد داخلی (GAPDH یا Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) را بیان نمودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش این ژن‌ها در گامتوژنز، می‌توان بیان این ژن‌ها را در سلول‌های سرطانی مبنی بر تمایززدایی دانست. البته تفاوتی که در فراوانی بیان این ژن‌ها در رده‌ی سلولی سرطان پستان و نمونه‌های توموری مشاهده شد، می‌تواند به پاسخ‌های متعددی که برای تهیه‌ی رده‌های سلولی انجام می‌شود، مربوط باشد و همچنین با بررسی تعداد بیشتری از رده‌های سلولی سرطان پستان برای این ژن‌ها، می‌توان به نتایج دقیق‌تری دست یافت.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای، نشانگر زیستی، رده‌ی سلولی

ارجاع: یوسف آملی شمس‌الدین، کوکبی لیلا، مجیدزاده اردبیلی کیوان، اسماعیلی رضوان، رحیمی حمزه، مریمی فهیمه، کریمی‌پور مرتضی. **بررسی بیان چندین ژن سرطانی بیضه‌ای در چندین رده‌ی سلولی سرطان پستان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۳): ۵۸-۵۰

مقدمه

ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای گروه هتروژنی از پروتئین‌های ایمونوژنیک (آنتی ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای) را کد می‌کنند که اغلب به طور انحصاری در

۱- کارشناس ارشد، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران و گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، پژوهشکده‌ی سرطان پستان، جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، پژوهشکده‌ی سرطان پستان، جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ایران
۵- کارشناس، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۶- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی کریمی‌پور
Email: mortezakarimi@yahoo.com

بافت طبیعی بیضه و درصدی از انواع تومورهای متفاوت بیان می‌شوند (۲-۱). البته برخی از آن‌ها در تخمدان و تروفوبلاست جنس ماده نیز بیان می‌شوند (۳). بر اساس اختصاصیت بافتی و ایمونوژنیسته‌ی آن‌ها، می‌توان از آنتی ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای به عنوان مولکول‌های هدف برای درمان سرطان استفاده نمود (۶-۴).

بر طبق اطلاعاتی که در پایگاه اطلاعاتی ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای (www.cta.lncc.br) وجود دارد، تا کنون بیش از ۱۰۰ عضو از این خانواده‌ی ژنی شناسایی شده‌اند که تعداد زیادی از این ژن‌ها بر روی کروموزوم X قرار دارند که به آن‌ها آنتی ژن‌های CT-X (Cancer-testis-x chromosome) می‌گویند (۶). از آن جایی که آنتی ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای در بافت‌های طبیعی (به غیر از بیضه) بیان نمی‌شوند، بنابراین در صورت بیان احتمالی آن‌ها در بافت توموری، می‌توان از آن‌ها به عنوان کاندیدای مناسبی برای ایمونوتراپی سرطان و تهیه‌ی واکسن بر اساس این آنتی ژن‌ها استفاده کرد (۷-۶).

پاسخ هومورال به آنتی ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای در چندین تومور مشاهده شده است. برای مثال، آنتی بادی‌هایی بر علیه SCP۱ (Synaptonemal complex protein۱) در سرطان پانکراس (۸)، NY-ESO-۱، SCP۱، SSX۲ (Synovial sarcoma, X breakpoint۲) در سرطان پستان (۱۰-۹)، CTSP-۱ در سرطان پروستات، تیروئید و پستان و آنتی بادی‌های بر علیه MAGEA۳، SSX۲ و NY-ESO-۱ در مالتیپل میلوما شناسایی گردیده است (۱۱).

طبق پایگاه اطلاعاتی ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای، هیچ یک از بافت‌های طبیعی انسان (ماهیچه‌های اسکلتی، طحال، رحم، تیموس، کولون، کبد، ریه، تخمدان، پانکراس، روده‌ی کوچک، کلیه، جفت، مغز، پستان، قلب، گلبول‌های سفید، تیروئید، پروستات، مثانه و معده) ژن‌های NY-ESO-۱، SSX و SCP۱ را بیان نمی‌کنند و فقط بیضه آن‌ها را بیان می‌کند. ژن MAGE۳ نیز به غیر از جفت و بیضه در هیچ یک از بافت‌های طبیعی دیگر بیان نمی‌شود (۱۲).

سؤال اساسی دیگر در مورد آنتی ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای این است که بیان آن‌ها، نقش اساسی در تومورزایی دارد یا از عواقب توموری شدن سلول‌ها می‌باشد. البته شواهد قوی برای برخی از آن‌ها وجود دارد که نقش پایه‌ای بعضی از این ژن‌ها را در تومورزایی نشان می‌دهد. برای مثال، Bertram و همکاران نشان دادند که بیان ژن MAGE در سلول‌های سرطانی با فنوتیپ بدخیمی و پاسخ به درمان رابطه دارد (۱۳).

رده‌های سلولی که حداقل یکی از سه ژن MAGE را بیان می‌کنند، بیشتر به سمیت وابسته به TNF (Tumor necrosis factors) مقاوم هستند (۱۴). ترانسفکشن سلول‌ها با ژن‌های MAGEA۲ یا MAGEA۶ به آن‌ها خواص تقسیم شونده می‌دهد؛ اگر چه مکانیسم مولکولی آن شناسایی نشده است (۱۳).

در آزمایش دیگری پیشنهاد شده است که ژن SSX یک نقش عملکردی در مهاجرت سلول و پتانسیلی شبیه متاستاز سلول سرطانی دارد. مشخص شده است هنگامی که در رده‌های سلولی ملانوما تنظیم بیان ژن SSX کاهش می‌یابد، مهاجرت سلول‌ها نیز کاهش می‌یابد (۱۵). از آن جایی که

بسیاری از خصوصیات سلول سرطانی مثل مهاجرت، تهاجم، براندازی ایمنی، مقاومت به مرگ برنامه‌ریزی شده و رگ‌زایی در گامت‌زایی نیز مشاهده می‌شود، احتمال شباهت مشخصات آنتی ژن‌های سرطانی– بیضه‌ای کنترل کننده‌ی گامتوژنز با سلول‌های سرطانی وجود دارد (۱۶).

سرطان پستان در عصر حاضر، شایع‌ترین سرطان زنان در اکثر کشورهای دنیا است؛ به طوری که یک سوم از همه‌ی سرطان‌ها را در زنان تشکیل می‌دهد (۱۷). از آن جایی که یک تومور نشانگر ایده‌آل، بیان mRNA (Messenger RNA) در سلول‌های سرطانی و عدم بیان آن در سلول‌های غیر سرطانی است، در این تحقیق به بررسی بیان ۴ ژن از این خانواده NY–ESO–۱ ۱a (Cancer/testis antigen 1A)، NY–ESO–۱ ۱b (Cancer/testis antigen 1B)، MAGE۳ (Melanoma-associated antigen۳)، SSX۲ (Synovial sarcoma, X breakpoint۲) و SCP۱ (Synaptonemal complex protein ۱) در سه رده‌ی سلولی سرطان پستان (MCF–۷، BT–۲۰ و MDA-MB–۲۳۱) پرداخته شد تا بین فراوانی بیان این ژن‌ها در رده‌های سلولی سرطان پستان و نمونه‌های توموری سرطان پستان در تحقیقات پیشین مقایسه‌ای انجام شود (۱۸).

روش‌ها

تهیه‌ی رده‌های سلولی سرطانی

سه رده‌ی سلولی سرطان پستان به همراه چهار رده‌ی سلولی دیگر برای شاهد مثبت و منفی (جدول ۱) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پس از تحویل رده‌های سلولی، به طور سریع در محیط کشت و شرایط بهینه‌ی خودشان در حضور آنتی بیوتیک، کشت داده شدند و پس از انکوبه کردن در دمای ۳۷ °C و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۴۸ ساعت، بررسی و شمارش سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس انجام شد. نمونه‌ها در صورت لزوم پاساژ داده شد تا این که سلول‌ها به تعداد تقریبی ده میلیون عدد برسند و آماده‌ی استخراج RNA گردند.

جدول ۱. رده‌های سلولی تهیه شده به همراه مشخصات آن‌ها

رده‌های سلولی	بافت	ریخت‌شناسی	محیط کشت
A-۳۷۵	پوست	اپیتلیوم	DMEM + FBS ٪۱۰
MCF-۷	پستان	اپیتلیوم	EMEM + FBS ٪۱۰
BT-۲۰	پستان	اپیتلیوم	RPMI۱۶۴۰ + FBS ٪۱۰
SW۷۴۲	روده‌ی بزرگ	اپیتلیوم	L-۱۵ + BCS ٪۱۰
K۵۶۲	مایع بین جنب	شبه لنفوبلاست	RPMI ۱۶۴۰ + FBS ٪۱۰
GC-۱spg	بیضه	اپیتلیوم	DMEM + FBS ٪۱۰
BT-۲۰	پستان	اپیتلیوم	RPMI۱۶۴۰ + FBS ٪۱۰

FBS: Fetal bovine serum; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute
BCS: Bovine Calf serum; L-15: Leibovitz's L-15 medium

استخراج RNA از رده‌های سلولی

پس از آن که تعداد سلول‌ها در فلاسک به ۱۰ میلیون رسید، استخراج RNA صورت گرفت. در صورت چسبنده بودن سلول‌ها با اضافه کردن ۱/۵ ml تریپسین و (Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA (۰/۰۲ درصد EDTA و تریپسین ۰/۲۵درصد مولار) به فلاسک با حجم ۲۵ ml، به صورت معلق در آمدند. سپس برای شستشوی سلول‌ها و جمع‌آوری آن‌ها، محیط کشت حاوی سلول‌های معلق، داخل یک فالکن حاوی ۷ ml PBS ریخته شد و به مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ °C با دور ۱۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد و پس از دور ریختن مایع رویی، استخراج RNA از پلت سلول‌ها توسط کیت RNeasy Mini Kit (Germany, Qiagen) انجام شد. سپس غلظت RNA با اندازه‌گیری جذب در ۲۶۰ nm با استفاده از دستگاه Nanophotometer (Germany, IMPLEN) سنجیده شد.

ساختن cDNA از روی RNA

کلیه‌ی مراحل ساخت (Complementary DNA) cDNA از RNAهای استخراج شده از رده‌های سلولی با استفاده از کیت Quantitect reverse transcription (Germany, Qiagen) و روی یخ انجام گرفت.

انجام PCR بر روی cDNAهای به دست آمده

در این تحقیق، بیان ۶ رونوشت mRNA با پرایمرهای سفارش داده شده (جدول ۲) و با شرایط PCR یک مرحله‌ی ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه به عنوان واسرشت، ۳۲ چرخه‌ی ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و سپس یک مرحله‌ی ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه) توسط دستگاه ترمال سایکلر (Bio-Rad, California) مورد بررسی قرار گرفت. رونوشت GAPDH (-3-phosphate dehydrogenaseGlyceraldehyde) به عنوان شاهد داخلی، مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲. لیست پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

اندازه‌ی محصول PCR	توالی پرایمرها و موقعیت بازهای آن‌ها در mRNA مربوط	acc. No.	mRNA
۵۴۰ جفت باز	(۱۲۴-۱۴۴) ´۳-GTC AAC GGA TTT GGT CGT ATT-۵F (۶۴۳-۶۶۳) ´۳-AGT CTT CTG GGT GGC AGT GAT-۵R	NM-۰۰۲۰۴۶	GAPDH
۳۸۶ جفت باز	(۳۱۹-۳۳۸) ´۳-AGT TCT ACC TCG CCA TGC CT-۵F (۶۸۴-۷۰۴) ´۳-TCC TCC TCC AGC GAC AAA CAA-۵R	NM-۰۰۱۳۲۷/۲	NY-ESO-۱ ۱a
۳۲۸ جفت باز	(۲۷۱-۲۸۹) ´۳- ATG GAT GCT GCA GAT GCG G-۵F (۵۸۰-۵۹۸) ´۳-GCT TAG CGC CTC TGC CCT G-۵R	NM-۰۰۱۳۲۷/۲	NY-ESO-۱ ۱b
۵۶۵ جفت باز	(۱۳۸۳-۱۴۰۹) ´۳-GTA CAG CAG AAA GCA AGC AAC TGA ATG-۵F (۸۴۵-۸۷۲) ´۳-GAA GGA ACT GCT TTA GAA TCC AAT TTC C-۵R	NM-۰۰۳۱۷۶/۲	SCP۱
۴۲۳ جفت باز	(۴۵-۵۶) ´۳-GAA GCC GGC CCA GGC TCG-۵F (۴۵۰-۴۷۰) ´۳-GGA GTC CTC ATA GGA TTG GCT-۵R	NM-۰۰۵۳۶۲/۳	۳MAGE
۴۳۵ جفت باز	(۱۴۹-۱۷۱) ´۳-GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC-۵F (۵۶۲-۵۸۳) ´۳-TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-۵R	NM-۱۷۵۶۹۸/۱	۲SSX

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SSX۲: Synovial sarcoma, X breakpoint
SCP۱: Synaptonemal complex protein ۱; acc. No: Accession Number (NCBI Reference Number)
F: Forward; R: Reverse

در هر واکنش از ۲۲ µl (حاوی ۱X PCR Buffer، ۱/۵ mmol $MgCl_2$، dNTP MIX (Deoxynucleoside-۵'-triphosphates) ۰/۲ mol و اسپرمیدین ۱ mol)، ۱۰ pmol از پرایمرهای رفتی و برگشتی، ۲۰۰ ng از cDNA و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Germany, Qiagen) استفاده شد.

از آن جایی که هدف، بررسی همزمان شاهد داخلی و ژن مورد بود تا کمترین منفی کاذب در نتایج وجود داشته باشد، بهینه‌سازی شرایط برای بررسی همزمان دو رونوشت صورت گرفت. بهینه‌سازی شامل شیب دمایی، تغییر در میزان آنزیم، پرایمرها، مدت زمان مراحل PCR، مقدار cDNA اولیه بوده است.

انجام Multiplex RT-PCR با شرایط بهینه‌سازی شده

رونوشت mRNA مورد بررسی به همراه GAPDH به صورت مولتی‌پلکس در رده‌های سلولی سرطان پستان بررسی شدند. البته نمونه‌ها به همراه یک شاهد مثبت (یکی از رده‌های سلولی که ژن مورد بررسی را به همراه GAPDH بیان می‌کرد)، شاهد منفی (رده‌های سلول که فقط GAPDH را بیان می‌کرد) و یک شاهد خنثی (بدون cDNA تا از احتمال مثبت کاذب کاسته شود)، بررسی شدند.

انجام الکتروفورز

به منظور تأیید صحت آزمایش‌ها پس از انجام PCR، محصول به دست آمده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نشانگرهای ۱۰۰ جفت بازی و یک کیلو بازی الکتروفورز شد. برای تهیه‌ی آگارز ۱/۵ درصد، ۰/۹ گرم پودر آگارز در ۶۰ ml TBE ۰/۵X مخلوط شد و سپس به جوش آورده شد تا خوب حل گردد. پس از کمی خنک‌تر شدن، به آن اتیدیوم بروماید اضافه گردید و داخل کاست ریخته شد و شانه در محل مناسب قرار گرفت. پس از بستن کامل ژل، داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE ۰/۵X قرار گرفت، ۱۰ µl محصول PCR به همراه ۲ µl رنگ در داخل چاهک‌ها ریخته شد و الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ انجام شد.

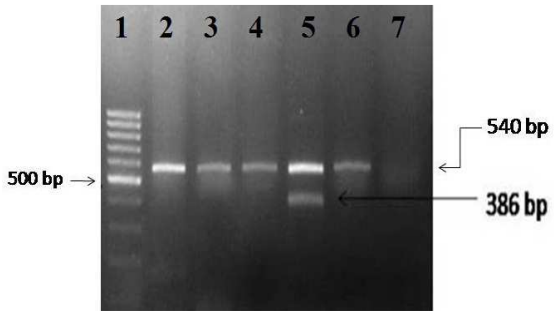
سپس توسط دستگاه Transilluminator UV، از نتیجه‌ی کار عکس گرفته شد و مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

هر ۳ رده‌ی سلولی سرطان پستان با روش Multiplex RT-PCR (Multiplex real time-polymerase chain reaction) بررسی شدند که یکی از نتایج الکتروفورز آن‌ها به طور نمونه در شکل ۱ نشان داده شده است. سه رده‌ی سلولی سرطان پستان هیچ کدام از رونوشت‌های سرطانی– بیضه‌ای را بیان نکردند؛ در حالی که همه‌ی آن‌ها ژن GAPDH (شاهد داخلی) را بیان کردند. نتایج به طور خلاصه در جدول ۳ آمده است.

بحث

نتایج بررسی ژن NY-ESO-۱ در نمونه‌های تومووری بیماران مبتلا به سرطان پستان در تحقیقات پیشین ۱۳ نمونه (۱۰/۱ درصد) از ۱۲۹ نمونه (۱۹)، ۳۷ نمونه (۴۲/۰ درصد) از ۸۸ نمونه (۲۰)، ۹ نمونه (۱۸/۰ درصد) از ۵۰ نمونه (۲۱)، ۸۰ نمونه (۲۰/۰ درصد) از ۴۰۳ نمونه (۲۲) و ۱۱ نمونه (۲۲/۰ درصد) از ۴۹ نمونه (۲۳) بوده است که این ژن در هیچ یک از رده‌های سلولی سرطان پستان مورد بررسی بیان نداشته است.



شکل ۱. نتیجه‌ی الکتروفورز محصول Multiplex RT-PCR با پرایمرهای NY-ESO-۱ ۱a و GAPDH در سه رده‌ی سلولی سرطان پستان: رده‌های سلولی MCF-۷ (چاهک ۳)، BT-۲۰ (چاهک ۲) و MDA-MB-۲۳۱ همگی شاهد داخلی را بیان کردند، اما ژن NY-ESO-۱ ۱a را بیان نکردند. چاهک ۱ اندازه‌ی نشانگر ۱۰۰ جفت بازی و چاهک ۷ نمونه‌ی بدون cDNA (خنثی) می‌باشد. چاهک ۵ رده‌ی سلولی شاهد مثبت (رده‌ی سلولی A-۳۷۵) و چاهک ۶ رده‌ی سلولی شاهد منفی (رده‌ی سلولی MDA-MB-۲۳۱) می‌باشد.

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Multiplex RT-PCR: Multiplex real time-polymerase chain reaction
cDNA: Complementary DNA

نتایج بررسی بیان ژن *SCP۱* در نمونه‌های بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان پستان در تحقیقات مختلف ۴۴ نمونه (۳۴/۱ درصد) از ۱۲۹ نمونه (۱۹) و ۶۴ نمونه (۶۵/۰ درصد) از ۹۸ نمونه (۹) بوده است که این ژن در هیچ یک از رده‌های سلولی سرطان پستان مورد بررسی، بیان نداشت. نتایج بررسی بیان ژن MAGE۳ در نمونه‌های بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان پستان در سایر تحقیقات ۲۵ نمونه (۳۷/۰ درصد) از ۶۷ نمونه (۲۴)، ۳ نمونه (۱۱/۰ درصد) از ۲۸ نمونه (۲۵) و ۱۱ نمونه (۱۱/۰ درصد) از ۹۸ نمونه (۹) مثبت بوده‌اند؛ در حالی که این ژن در هیچ یک از رده‌های سلولی سرطان پستان مورد بررسی، بیان نداشته است. نتایج بررسی بیان ژن SSX۲ در نمونه‌های بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان پستان در تحقیقات مختلف ۸ نمونه (۸/۰ درصد) از ۹۸ نمونه (۹) و ۵ نمونه (۳/۹ درصد) از ۱۲۹ نمونه (۱۹) بوده است؛ اما نتایج مطالعه‌ی حاضر فراوانی بیان این ژن را در رده‌های سلولی مورد مطالعه، ۰ درصد ارزیابی نمود.

اگر چه علت گزارش‌های متفاوت از بیان این ژن‌ها در تومورها مشخص نمی‌باشد؛ اما شاید به علت متفاوت بودن مخازن ژنتیکی جمعیت‌های مختلف بررسی شده باشد. البته باید در نظر داشت که نمونه‌های توموری در برخی تحقیقات از مراحل (Stage) مختلف بیماری تهیه می‌شود و این موضوع هم ممکن است در نتایج اثر بگذارد.

جدول ۳. نتایج بررسی بیان mRNAها در رده‌های سلولی

Cell Line	NY-ESO-۱ ۱a	NY-ESO-۱ ۱b	MAGE-۳	۱SCP	۲SSX	GAPDH
A-۳۷۵	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos
MCF-۷	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
MDA-MB-۲۳۱	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
BT-۲۰	ND	Neg	ND	Neg	Neg	Pos
۷۴۲SW	ND	ND	ND	Neg	Neg	Pos
۵۶۲K	ND	ND	ND	Neg	Pos	Pos
GC-۱spg	ND	ND	ND	Pos	Neg	Pos

ND: Not determined (بررسی بیان ژن انجام نشده است)

همچنین باید هتروژنیتی ژنتیکی را در سرطان‌ها مؤثر دانست و در این راستا، شاید اختلافاتی که در تعریف و تشخیص مراحل سرطان پستان وجود دارد، بر این موضوع تأثیر داشته باشد.

فراوانی بیان به دست آمده از بررسی حاضر بر روی رده‌های سلولی سرطان پستان، در مقایسه با دیگر مطالعات در مورد بررسی بیان همین ژن‌ها در نمونه‌های توموری سرطان پستان، بسیار متفاوت می‌باشند که این تفاوت می‌تواند ناشی از پاساژهای متعددی باشد که برای تهیه‌ی رده‌های سلولی انجام می‌شود. با بررسی تعداد بیشتری از رده‌های سلولی سرطان پستان برای این ژن‌ها می‌توان به نتایج دقیق‌تری دست یافت.

سؤال مهم در مورد بیان ژن‌های سرطانی-بیضه‌ای، چگونگی مکانیسم خاموش بودن رونویسی در بافت طبیعی به غیر از بیضه و بیان شدن آن‌ها در بدخیمی‌ها می‌باشد. پذیرفته شده است که تنظیم متیلاسیون نقش مهمی در کنترل بیان آن‌ها دارد (۲۶، ۱). برای مثال، چندین مطالعه نشان داده است که متیلاسیون یک مکانیزم خاموش‌سازی اولیه در ژن MAGE-A۱ می‌باشد و دمتیله شدن برای بیان آن ضروری و کافی است (۲۸-۲۷). در ادامه‌ی مطالعه، پیشنهاد می‌شود وضعیت متیلاسیون این ژن‌ها در تعداد بیشتری از رده‌های سلولی و نمونه‌های توموری بررسی و با یکدیگر مقایسه شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بوده است؛ بدین وسیله از تمامی اعضای انستیتو پاستور ایران که در به سرانجام رساندن این پژوهش یاری رساندند، قدردانی می‌شود.

References

1. Zendman AJ, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. J Cell Physiol 2003; 194(3): 272-88.
2. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci 2009; 100(11): 2014-21.
3. Kalejs M, Erenpreisa J. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. Cancer Cell Int 2005; 5(1): 4.
4. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. Nat Rev Cancer 2005; 5(8): 615-25.
5. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. Cancer Immun 2004; 4: 1.
6. Meklat F, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Jewell A, et al. Cancer-testis antigens in haematological malignancies. Br J Haematol 2007; 136(6): 769-76.
7. Parmigiani RB, Bettoni F, Vibranovski MD, Lopes MH, Martins WK, Cunha IW, et al. Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(48): 18066-71.
8. Wadle A, Kubuschok B, Imig J, Wuellner B, Wittig C, Zwick C, et al. Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. Int J Cancer 2006; 119(1): 117-25.
9. Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, et al. Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. Int J Cancer 2006; 118(3): 696-703.
10. Costa FF, Le BK, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. Stem Cells 2007; 25(3): 707-11.
11. Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, Gnjatic S, Schnieders F, Bartels K, et al. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation.

Blood 2007; 109(3): 1103-12.
12. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(5): 1914-8.
13. Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, Kneba M. Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression. Anticancer Drugs 1998; 9(4): 311-7.
14. Glynn SA, Gammell P, Heenan M, O'Connor R, Liang Y, Keenan J, et al. A new superinvasive in vitro phenotype induced by selection of human breast carcinoma cells with the chemotherapeutic drugs paclitaxel and doxorubicin. Br J Cancer 2004; 91(10): 1800-7.
15. Cronwright G, Le BK, Gotherstrom C, Darcy P, Ehnman M, Brodin B. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. Cancer Res 2005; 65(6): 2207-15.
16. Old LJ. Cancer is a somatic cell pregnancy. Cancer Immun 2007; 7: 19.
17. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58(2): 71-96.
18. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. J Clin Oncol 2006; 24(33): 5313-27.
19. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Yamaguchi H, Nagashima H, Inoue H, et al. Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. Br J Cancer 2001; 85(5): 713-20.
20. Sugita Y, Wada H, Fujita S, Nakata T, Sato S, Noguchi Y, et al. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in malignant and benign breast tumors. Cancer Res 2004; 64(6): 2199-204.
21. Curigliano G, Viale G, Ghioni M, Jungbluth AA, Bagnardi V, Spagnoli GC, et al. Cancer-testis antigen expression in triple-negative breast cancer. Ann Oncol 2011; 22(1): 98-103.
22. Grigoriadis A, Caballero OL, Hoek KS, da SL, Chen YT, Shin SJ, et al. CT-X antigen expression in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(32): 13493-8.
23. Matkovic B, Juretic A, Spagnoli GC, Separovic V, Gamulin M, Separovic R, et al. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in medullary breast cancer: retrospective immunohistochemical study. Croat Med J 2011; 52(2): 171-7.
24. Hussein YM, Gharib AF, Etewa RL, El-Shal AS, Abdel-Ghany ME, Elsawy WH. The melanoma-associated antigen-A3, -A4 genes: relation to the risk and clinicopathological parameters in breast cancer patients. Mol Cell Biochem 2011; 351(1-2): 261-8.
25. Russo V, Traversari C, Verrecchia A, Mottolese M, Natali PG, Bordignon C. Expression of the MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor antigen-specific immunotherapy. Int J Cancer 1995; 64(3): 216-21.
26. Koslowski M, Bell C, Seitz G, Lehr HA, Roemer K, Muntefering H, et al. Frequent nonrandom activation of germ-line genes in human cancer. Cancer Res 2004; 64(17): 5988-93.
27. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. Mol Cell Biol 1999; 19(11): 7327-35.
28. De Smet C, Loriot A, Boon T. Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. Mol Cell Biol 2004; 24(11): 4781-90.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 15.12.2013
Vol. 32, No. 273, 2nd Week, April 2014
Accepted: 31.01.2014

Expression of Multiple Cancer/Testis Genes in Several Breast Cancer Cell Lines

Shamseddin Yousef-Amoli MSc[1], Leila Kokabee PhD[2], Keyvan Majidzadeh-Ardebili PhD[3], Rezvan Esmaeili MSc[4], Hamzeh Rahimi PhD[2], Fahimeh Maryami[2], Morteza Karimipour PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Cancer-Testis genes (CT-genes) are a gene family that only expressed in normal testis tissue and some of them are randomly expressed in some types of cancers. These genes can be promising cases for immunotherapy of breast cancer. This research was carried out for comparison of the expression frequencies these genes in cancerous cell lines and tumor samples.

Methods: In this analytical-descriptive study, after providing three breast-cancer cell lines and their cultures in appropriate medium, RNA extraction and cDNA synthesis were done and expressions of *NY-ESO-1 1a*, *NY-ESO-1 1b*, *SCP1*, *SSX-2* and *MAGE-3* genes were studied using multiplex real time-polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) method.

Findings: None of cell lines expressed Cancer-Testis genes; but all of them expressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene (internal control).

Conclusion: According to the role of these genes in gametogenesis, we can consider that their expressions in cancer cells are based on dedifferentiation. The observed difference between expression frequency of these genes in breast-cancer cell lines and tumor samples can be related to several passages which are carried out for providing cell lines. By examining more cell lines of breast cancer for these genes, we can achieve more accurate results.

Keywords: Breast cancer, Cancer/Testis genes, Biological marker, Cell lines

Citation: Yousef-Amoli Sh, Kokabee L, Majidzadeh-A K, Esmaeili R, Rahimi H, Maryami F, et al. **Expression of Multiple Cancer/Testis Genes in Several Breast Cancer Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(273): 50-8

1- Molecular Medicine Group, Biotechnology Research Centre, Pasteur Institute of Iran AND Department of Biology, School of Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2- Molecular Medicine Group, Biotechnology Research Centre, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Cancer Genetics Research Group, Breast Cancer Research Center (BCRC), Tehran, Iran
4- PhD Student Cancer Genetics Research Group, Breast Cancer Research Center (BCRC), Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Molecular Medicine Group, Biotechnology research Centre, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Morteza Karimipour PhD, Email: mortezakarimi@yahoo.com