ارتباط پروتیین‌های لنگری A-کیناز با بقای بدون بیماری در سرطان پستان

رضوان اسمعیلی[۱]
طناز صمدی[۱]، نسرین عبدلی[۱]
کیوان مجیدزاده اردبیلی[۱و۲*]
لیلا فرهمند[۱]، ملیحه صالحی[۱]

۱- گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه پزشکی آجا، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، میدان ونک، گاندی جنوبی، پلاک ۱٤٦، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاد دانشگاهی.
تلفن: ۸۸۷۹٦۰۰۳ -۰۲۱
E-mail: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰٦ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۰/۳۰

زمینه و هدف: آنتی‌ژن‌های سرطانی-بیضه‌ای (CTA) به‌عنوان یکی از شاخص‌های زیستی امیدوارکننده جدید، به‌ویژه درزمینه درمان‌های هدفمند، مطرح هستند. در بررسی‌های گوناگون بیان اختصاصی این پروتیین‌ها در بعضی از بافت‌های توموری گزارش شده است. از طرفی درک نقش متفاوت این آنتی‌ژن‌ها در بافت‌های نرمال و سرطانی ممکن است آن‌ها را به‌عنوان شاخص‌های زیستی جدیدی در سرطان معرفی نماید. هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن AKAP3 در سرطان پستان و بررسی ارتباط آن با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیک بیماری است.

روش بررسی: این مطالعه یک مطالعه مورد-شاهد است که در پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، در تاریخ مهرماه ۱۳۹۳ تا اردیبهشت ۱۳۹۵، انجام شده است. بیان ژن AKAP3 در نمونه‌های بافت پستان، شامل: ۷٤ بافت تومور، ۷۳ بافت نرمال مجاور تومور و ۱۵ مورد بافت نرمال با استفاده از Real-time PCR بررسی شد. همچنین ارتباط میان بیان ژن، ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک تومورها و رژیم درمانی به‌کار رفته مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در آنالیزهای آماری انجام شده ارتباطی بین عدم بیان AKAP3، سایز تومور (P=۰/۰۱) و مرحله بیماری (P=۰/۰٤) مشاهده شد. همبستگی میان پیش‌آگهی ضعیف و فقدان بیان AKAP3 در بافت نرمال مجاور تومور مشاهده شد. همچنین نمودار Kaplan-Meier بقای بدون بیماری بهتری را در گروه نرمال مجاور بیان کننده AKAP3 نشان داد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه بر اساس آنالیزهای انجام شده، مشاهده شد که ارتباط بقای بدون بیماری بهتر موجود به دلیل تفاوت در بیان AKAP3 بوده و ارتباطی با توزیع درمان بین دو گروه بیماران ندارد. در نتیجه، AKAP3 می‌تواند یک کاندید مناسب از شاخص‌های زیستی برای بیماران مبتلا به سرطان پستان باشد. همچنین، از بررسی بیان ژن AKAP3 در بافت نرمال بیماران ممکن است بتوان به‌منظور پیش‌بینی پاسخ به درمان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن‌های سرطانی-بیضه‌ای، بقای بدون بیماری، سرطان پستان، شاخص زیستی (بیومارکر).

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان بوده و یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان است.

این سرطان یک بیماری ناهمگن و پیچیده با آسیب‌های متمایز و ویژگی‌های بافتی خاص است. در ایران، سرطان پستان رتبه نخست در میان سرطان‌های تشخیص داده شده در زنان را به خود اختصاص داده که این میزان معادل ۲٤/٤٪ از کل بدخیمی‌های گزارش شده است. شاخص‌های زیستی، مفیدترین ابزار برای پیش‌گیری و مدیریت هر چه بهتر بیماری هستند. اگرچه کشف شاخص‌های زیستی موجب دستیابی به نتایج بی‌شماری در جنبه‌های گوناگون سرطان شده است، اما هنوز هم مسایل چالش‌برانگیز بسیاری وجود دارد که بستر مناسبی برای پژوهش‌های مختلف در جهت کشف شاخص‌های زیستی فراهم می‌کند.[۱و۲] آنتی‌ژن‌های سرطانی-بیضه‌ای از جمله شاخص‌های زیستی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]

امیدبخش، به‌ویژه درزمینه درمان‌های هدفمند می‌باشند.[۳] این آنتی‌ژن‌ها، اعضایی از یک گروه پروتیینی هستند که به‌طور نرمال در بیضه و به میزان کمتری در سلول‌های زایشی تخمدان بیان می‌شوند.[٤] از آن‌جایی‌که بیان اختصاصی و نابه‌جای شاخص‌های زیستی در بعضی از بافت‌های توموری گزارش شده، می‌توانند کاندیدهای جدیدی برای درمان‌های هدفمند باشند. گزارش‌هایی در زمینه نقش این آنتی‌ژن‌ها از جمله، تعدیل بیان ژن و کمک به مسیرهای سیگنالینگ تومور، تقسیم سلولی تومور، و آپوپتوز وجود دارد.[۵] بر خلاف شیمی درمانی و پرتودرمانی، که علاوه بر سلول‌های تومور منجر به مرگ سلول‌های سالم نیز می‌گردد، آنتی‌ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای می‌تواند برای درمان‌های هدفمند مورد استفاده قرار بگیرد.[٦]

همچنین درک نقش متفاوت آن‌ها در بافت‌های نرمال و سرطانی ممکن است منجر به پیدایش شاخص‌های زیستی پیش‌بینی کننده و پیش‌آگهی دهنده جدید شود. به همین جهت مطالعه الگوی بیانی این شاخص‌های زیستی و ارتباط آن با ویژگی‌های کلینیکی بیماران بسیار دارای اهمیت و مورد توجه بوده است.[۷]

پروتیین‌های لنگری A-کیناز (AKAP) گروهی از آنتی‌ژن‌های سرطانی- بیضه‌ای هستند که نقش مهمی در عملکرد اسپرم دارند و بر اساس توانایی اتصال به پروتیین کیناز A (PKA) وابسته به cAMP، طبقه‌بندی می‌شوند. انواع پروتیین‌های AKAP در غلاف فیبروز اسپرم قرار می‌گیرند و ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده حرکت، مراحل تکاملی و واکنش آکروزوم آن عمل کنند.[۸و۹]

AKAP3 یکی از اعضای پروتیین‌های AKAP است که بیان آن در سرطان تخمدان اپی‌تلیالی گزارش شده است. در بیمارانی که تومور تخمدان آن‌ها به میزان ضعیفی متمایز شده، بیان AKAP3 به‌عنوان یک پیش‌بینی‌کننده معنادار برای بقای کلی و بقای بدون عود، مطرح است.[۱۰]

هدف از این مطالعه بررسی بیان اختصاصی AKAP3 در بافت تومور در مقایسه با بافت نرمال در سرطان پستان است. بدین منظور، وجود mRNA این ژن در کارسینوم داکتال مهاجم پستان در مقایسه با بافت نرمال و نرمال مجاور تومور مورد بررسی قرار گرفت.

از طرفی همبستگی بین بیان ژن و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی تومور و رژیم درمانی ارزیابی شد. در صورت بیان اختصاصی، این مارکر می‌تواند به‌عنوان کاندیدی به‌منظور پیش‌بینی و پیش‌آگهی مطرح شده و حتی در درمان‌های هدفمند به‌کاربرده شود.

روش بررسی

این مطالعه مورد-شاهدی، مجموعه‌ای از ۱٦۲ نمونه بافت پستان، شامل ۷٤ بافت تومور، ۷۳ بافت نرمال مجاور تومور و ۱۵ مورد بافت نرمال، از بانک زیستی پژوهشکده سرطان پستان (BCRC-BB) تهیه شد.[۱۱] دو رده سلولی سرطان پستان (T47D و MCF7) (تهیه شده از مرکز ناباروری ابن‌سینا (AIC)) نیز در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌ها از نواحی مناسب، با بالاترین نسبت سلول‌های سرطانی موجود، انتخاب شدند. به‌منظور بررسی احتمال بیان AKAP3 در سلول‌های تومور پستان، ابتدا بیان آن در این دو رده سلولی بررسی شد، سپس بافت‌های تومور، نرمال و نرمال مجاور تومور و همچنین بافت بیضه نرمال به عنوان کنترل مثبت، مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس پروتکل‌های بانک زیستی پژوهشکده سرطان پستان، پس از نمونه‌گیری یا جراحی محتوای سلول‌های سرطانی در هر نمونه از نظر پاتولوژیکی بررسی شد، بافت نمونه به‌سرعت در نیتروژن مایع فریز شده و در $^{\circ}C$ ۷۰- نگهداری گردد.

بانک زیستی پژوهشکده سرطان پستان از کاردستورهای اخلاقی و مقررات مربوط به نگهداری و استفاده از نمونه‌های بیولوژیکی انسانی پیروی می‌کند. جهت ورود نمونه به بانک زیستی رضایت‌نامه از کلیه بیماران تهیه می‌شود. این مطالعه پیش‌تر توسط کمیته اخلاق پژوهشکده سرطان پستان تصویب شده، همچنین داده‌های کلینیکی و هیستوپاتولوژیکی بیماران همراه با رژیم درمانی آن‌ها گردآوری شده است.

وضعیت بیماران بر اساس بروز هر رویدادی نظیر عود مجدد، متاستاز یا مرگ ناشی از سرطان در طول مدت پیگیری آن‌ها تعریف و ثبت شده است. بیمارانی که دارای چنین رویدادهایی بوده‌اند به‌عنوان گروهی با پیش‌آگهی ضعیف طبقه‌بندی شدند. بیماران از نظر وضعیت درمان به زیر گروه‌هایی تقسیم شدند که شامل رژیم CMF (سیکلوفسفامید، متوترکسات، فلوئوراوراسیل) و آنتراسیکلین و یا رژیم حاوی تاکسان همراه با یا بدون درمان اندوکرین (غدد درون‌ریز) و در نهایت درمان اندوکرین به تنهایی، بوده‌اند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]

AKAP3 { F: CAGGACTGGAAAATGGACACCT / R: TTTGTGTGGGTCTCCTGAGTTG } ACTB { F: CAGCAGATGTGGATCAGCAAG / R: GCATTTGCGGTGGACGAT }

استخراج RNA و سنتز cDNA بر اساس مطالعه پیش، انجام شد.[۱۲] پرایمرهای AKAP3 و Actin Beta با استفاده از Gene Runner software, version 3.05 (http://www.generunner.com) طراحی و با استفاده از نرم‌افزار Primer Express software, version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) تأیید شدند.

به‌منظور بررسی وجود AKAP3 mRNA، واکنش Real-time PCR با استفاده از SYBR Green PCR Master mix (Primer Design Ltd, UK)، انجام شد.

غلظت پرایمر برای هر دو ژن ACTB و ۰/۵ µM بود. به‌منظورتایید کیفیت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. شناسایی فلورسنت با استفاده از سیستم ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام شد. برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، ابتدا سایز محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی شده و با استفاده از تکنیک Big Dye terminator DNA sequencing (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) تعیین توالی گردید (داده‌ها نشان داده نشده است)، سپس هر واکنش با استفاده از آنالیز منحنی ذوب با حرارت دادن محصول PCR از ۶۰ تا ۹۵ °C بررسی شد. منحنی نمونه‌ها با منحنی کنترل مثبت مقایسه شد تا تشکیل قطعه مورد نظر از پرایمر دایمر تشخیص داده شود. نقطه ذوب ۸۳/۴ °C برای قطعه AKAP3 تعریف شد. واکنش‌هایی با این نقطه ذوب از نظر بیان AKAP3، مثبت در نظر گرفته شدند.

هر قطعه‌ای با نقطه ذوب دیگر به‌عنوان تکثیر غیراختصاصی در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SDS software, version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) آنالیز شد. بیان ژن با استفاده از روش ddCt اندازه‌گیری شد.

آنالیز بیان ژن با استفاده از روش ΔΔCt انجام شد. در آنالیزهای آماری انجام شده، ارتباط بیان AKAP3 با درجه بیماری، مرحله بیماری، سایز تومور و وضعیت بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS statistical software, version 18 (IBM, Armonk, NY, USA) انجام شد. ارتباط بین بیان AKAP3 و داده‌های کلینیکوپاتولوژیک و رژیم درمانی با استفاده از آزمون‌های غیر پارامتری آنالیز شد. بقای بدون بیماری در بیماران به‌وسیله آنالیز Kaplan-Meier با استفاده از آزمون‌های Log-rank ارزیابی شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان نتایج معنادار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از GraphPad Prism, version 3.02 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ترسیم شد.

یافته‌ها

ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک جمعیت مورد مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. میانگین سن بیماران ۴۸ سال بوده (حدود ۸۷–۲۹ سال) و میانگین مدت زمان پیگیری بیماران ۳۵ ماه گزارش شد (۱–۶۵ ماه). در ۳۱٪ از بیماران رویدادی مانند عود مجدد، متاستاز یا مرگ ناشی از سرطان مشاهده شد، درحالی‌که ۶۹٪ هیچ رویدادی نداشتند و چهار نفر از بیماران فاقد داده‌های لازم بودند. فراوان‌ترین زیرگروه درمانی مربوط به رژیم درمانی آنتراسیکلین و یا رژیم حاوی تاکسان همراه با اندوکرین بود که میزان ۴۴٪ را نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده است).

دو رده سلولی پستان (T47D, MCF7)، mRNA این ژن را بیان کردند. بیان AKAP3 در بافت بیضه نرمال دیده شد که به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. بیان این ژن در ۳۶/۵٪ از بافت‌های تومور پستان، ۴۲٪ بافت نرمال مجاور تومور و ۴۶/۶٪ بافت‌های نرمال وجود داشت، درحالی‌که ACTB در کلیه نمونه‌های موجود بیان شد. آزمون McNemar تفاوتی در توزیع بیان AKAP3 بین بافت‌های تومور و نرمال مجاور تومور نشان نداد. لازم به یادآوری است که ارتباط معنادار با عدم بیان ژن AKAP3 (به‌صورت کیفی) وجود داشته و در داده‌های کمی حاصل از Real-time PCR این ارتباط معنادار دیده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است)، بنابراین داده‌های کیفی که به صورت بیان و عدم بیان بود، گزارش شده است.

معناداری میان عدم بیان AKAP3 در بافت نرمال مجاور تومور و پیش‌آگهی ضعیف وجود داشت (P=۰/۰۰۳). این بدین معناست، بیمارانی که در بافت نرمال مجاور تومور AKAP3 را بیان می‌کنند، (۲۸ بیمار از ۶۳ بیمار) تنها با ۴:۲۸ رویدادها ارتباط دارند، درحالی‌که این میزان در گروه AKAP3 منفی، ۱۳:۳۵ است. نمودار Kaplan-Meier بقای بهتر معناداری را در گروه نرمال مجاور تومور با وضعیت AKAP3 مثبت نشان داد که در آنالیز Log-rank از لحاظ آماری

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]

معنادار بود (P=۰/۰۳) (شکل ۱). مدت زمان پیگیری بیماران برای هر دو گروه قابل مقایسه بود (P=۰/۲). چنین ارتباطی با بیان AKAP3 در بافت‌های تومور دیده نشد (P=۰/۸). بررسی بیان AKAP3 در بافت‌های نرمال مجاور تومور و رژیم درمانی نتایج معناداری نداشت (شکل ۲). ارتباط معناداری میان بیان AKAP3 در بافت تومور و سایز تومور (P=۰/۰۱) و مرحله بیماری (P=۰/۰٤) نشان داد. بر این اساس، بیان AKAP3 در بافت‌های توموری، در تومور سایزهای کوچک‌تر از ۲ cm، کاهش یافت. همچنین نسبت بیمارانی که بیان AKAP3 را در بافت‌های توموری خود دارند در مرحله ۱ بیماری بیشتر از مراحل دیگر بود. آنالیـزهای مشابهی در خصوص درجه بیماری، تعداد گره‌های لنفاوی مثبت و سن تشخیص بیماری انجام شد اما نتایج معناداری به دست نیامد (جدول ۲).

جدول ۱: اطلاعات بیماران و وضعیت AKAP3، طبقه‌بندی مراحل بیماری بر اساس American Joint Committee on Cancer (AJCC)، مرز مثبت بودن بر اساس راهنمای American Society of Clinical Oncology (ASCO) در زمینه IHC

سن- سال (میانه/دامنه)	٤٨(٢٩-٨٧)	درصد اعتبار
مدت پیگیری- ماه (میانه/رنج)	١٨(١-٣٨)	
درجه بیماری (تعداد=٧٤، نمونه از دست رفته=٧)		
G1	٦	٩
G2	٣٤	٥١
G3	٢٧	٤٠
وضعیت بیماران (تعداد=٧٤، نمونه از دست رفته=٣)		
بقای سالم	٥٠	٧٠
بقای با رویداد	٢١	٣٠
مرحله بیماری (تعداد=٧٤، نمونه از دست رفته=٥)		
١	٧	١٠
٢	٣٣	٤٨
٣	٢١	٣٠
٤	٨	١٢
سایز تومور (تعداد=٧٤، نمونه از دست رفته=٦)		
٢≥	٢٤	٣٥
٢<	٤٤	٦٥
AKAP3 تومور (تعداد=٧٤)		
منفی	٤٧	٦٤
مثبت	٢٧	٣٦
AKAP3 نرمال مجاور (تعداد=٧٣)		
منفی	٤٠	٥٦
مثبت	٣٢	٤٤
AKAP3 نرمال (تعداد=١٥)		
منفی	٨	٥٤
مثبت	٧	٤٦

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]

جدول ۲: ارتباط آماری میان داده‌های کلینیکوپاتولوژیک و بیان AKAP3 در بافت تومور و نرمال مجاور

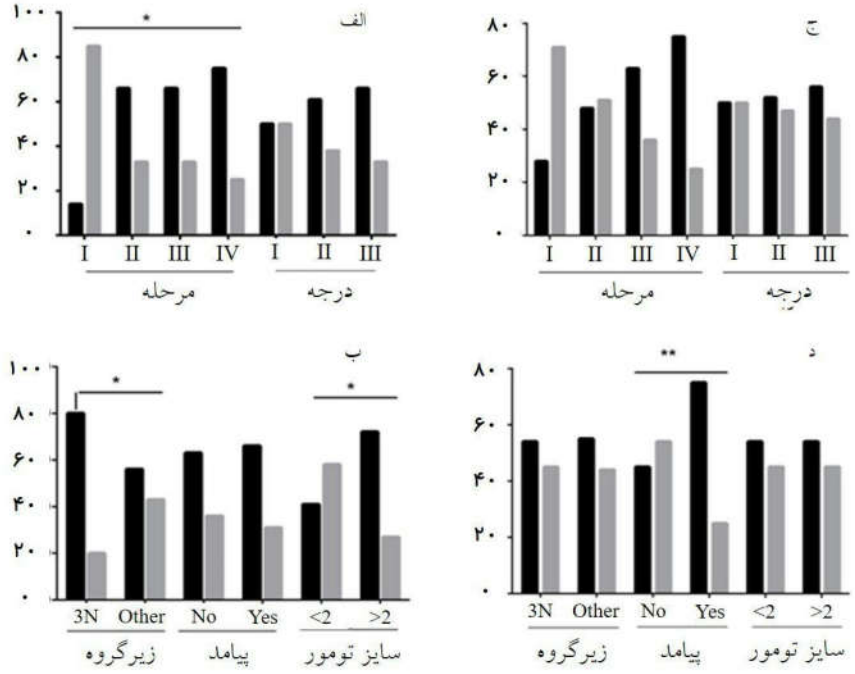
متغیرها	بیان AKAP3 در بافت نرمال مجاور		P	بیان AKAP3 در بافت توموری		P
	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)		مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	
درجه تومور						
۱	۳(۵۰)	۳(۵۰)	۰/۹	۳(۵۰)	۳(۵۰)	۰/۷
۲	۱۶(۴۷/۱)	۱۸(۵۲/۹)		۱۳(۳۸/۲)	۲۱(۶۱/۸)	
۳	۱۱(۴۴)	۱۴(۵۶)		۹(۳۳/۳)	۱۸(۶۶/۷)	
تعداد گره لنفاوی						
منفی	۱۲(۵۴/۵)	۱۰(۴۵/۵)	۰/۳	۷(۳۱/۸)	۱۵(۶۸/۲)	۰/۷
۱-۳	۱۲(۵۲/۲)	۱۱(۴۷/۸)		۱۰(۴۳/۵)	۱۳(۵۶/۵)	
۴-۹	۳(۲۵)	۹(۷۵)		۶(۴۲/۹)	۸(۵۷/۱)	
>۹	۴(۴۰)	۶(۶۰)		۳(۳۰)	۷(۷۰)	
سایز تومور						
≤۲ cm	۱۱(۴۵/۸)	۱۳(۵۴/۲)	۰/۵	۱۴(۵۸/۳)	۱۰(۴۱/۷)	۰/۰۱
>۲ cm	۱۹(۴۵/۲)	۲۳(۵۴/۸)		۱۲(۲۷/۳)	۳۲(۷۲/۷)	
مرحله بیماری						
۱	۵(۷۱/۴)	۲(۲۸/۶)	۰/۲	۶(۸۵/۷)	۱(۱۴/۳)	۰/۰۴
۲	۱۷(۵۱/۵)	۱۶(۴۸/۵)		۱۱(۳۳/۳)	۲۲(۶۶/۷)	
۳	۷(۳۶/۸)	۱۲(۶۳/۲)		۷(۳۳/۳)	۱۴(۶۶/۷)	
۴	۲(۲۵)	۶(۷۵)		۲(۲۵)	۶(۷۵)	
زیرگروه‌ها						
سه‌گانه منفی	۱۱(۴۵/۸)	۱۳(۵۴/۲)	۰/۵	۵(۲۰)	۲۰(۸۰)	/۰۳
انواع دیگر	۲۱(۴۴/۷)	۲۶(۵۵/۳)		۲۱(۴۳/۸)	۲۷(۵۶/۳)	
وضعیت بیماران						
بدون رویداد	۲۷(۵۸/۷)	۱۹(۴۱/۳)	۰/۰۰۳	۱۸(۳۶/۷)	۳۱(۶۳/۳)	۰/۵
با رویداد	۴(۲۰)	۱۶(۸۰)		۷(۳۳/۳)	۱۴(۶۶/۷)	

* آزمون آماری: Chi-square test، P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

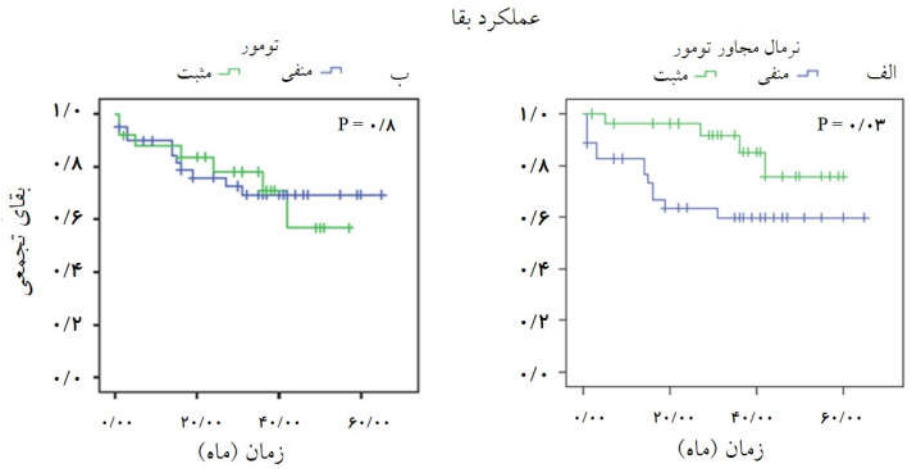
بحث

یکی از مهم‌ترین هدف‌ها در پژوهش‌های مربوط به درمان سرطان، جستجوی ژن‌هایی است که به‌طور اختصاصی در بافت‌های سرطانی بیان شده و بیان محدودی در بافت‌های نرمال دارند. در این بین آنتی‌ژن‌های سرطانی-بیضه‌ای می‌توانند گزینه‌ای امیدوارکننده باشند که تاکنون تحقیقات بسیاری در مورد آن‌ها انجام شده است.[۳و۱۳-۱۱] در این مطالعه بیان AKAP3 در بافت‌های تومور، نرمال مجاور تومور و نرمال پستان در ارتباط با ویژگی‌های کلینیکی بیماران مورد بررسی قرار گرفت. AKAP3 به‌عنوان یکی از اعضای پروتیین‌های داربستی طبقه‌بندی می‌شود. در حدود ۵۰ پروتیین داربستی وجود دارد که به پروتیین کیناز-IIA (PKAII) و دیگر پروتیین‌ها شامل: پروتیین کینازها، پروتیین فسفاتازها و فسفودی‌استرازها، متصل می‌شوند. به‌طوری‌که آن‌ها می‌توانند به‌طور ویژه در مکان‌های خاصی در سلول فعالیت کنند و فعالیت‌های آنزیمی مربوط به همان نواحی را محدود نمایند.[۱۴و۱۵] در نتیجه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]



نمودار ۱: بیان AKAP3 در بافت تومور و نرمال مجاور تومور پستان. الف و ب) بیان AKAP3 در بافت تومور و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی را نشان می‌دهد. نتایج معنادار در مرحله بیماری، زیرگروه، و سایز تومور قابل مشاهده است. ج و د) بیان AKAP3 در بافت نرمال مجاور تومور و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نمایش داده شده است. نتیجه معنادار در بروز پیش‌آگهی قابل مشاهده است.



نمودار ۲: نمودار Kaplan-Meier مربوط به وضعیت بقای بیماران که بر اساس بیان AKAP3 در بافت نرمال مجاور تومور (راست) و تومور (چپ) طبقه‌بندی شده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]

شکل‌گیری به‌وسیله این پروتیین‌های لنگری ایجاد می‌شوند، مسیر سیگنالینگ cAMP با مسیرهای دیگر ادغام می‌گردد.[۸] این عملکرد نشان‌دهنده نقش حیاتی AKAP در فعالیت‌های سلولی است. بر این اساس تغییرات نامحسوس در مسیرهای مرتبط با AKAP و یا تغییر در اجزای آن‌ها دلیلی برای بروز بسیاری از بیماری‌ها، به‌خصوص سرطان است.

پروتیین کیناز وابسته به cAMP معمولاً به‌صورت ترکیبی از ایزوفرم‌های تیپ I و II در بافت‌ها وجود دارد و تغییر در نسبت آن‌ها در پروسه‌های سرطان‌زایی دخیل است. PKAII اغلب در بافت‌های نرمال وجود دارد، درحالی‌که ایزوفرم آن، یعنی PKAI که مرتبط با AKAP نیست، در بافت‌های بدخیم بیان می‌شود.[۱۶]

از آن‌جایی‌که AKAP3 یک داربست برای اتصال PKAII است، عدم بیان AKAP3 که در این مطالعه دیده می‌شود، ممکن است به دلیل فقدان یا کاهش سطح PKAII در بافت‌های بدخیم باشد. بر اساس این مطالعه، بیان AKAP3 با افزایش سایز تومور و مرحله بیماری به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد. این امر ممکن است به دلیل ارتباط PKAII در سرکوب کردن سیگنالینگ میتوژنیک و رشد سلول باشد.[۱۷]

به‌علاوه، از آن‌جایی‌که سیگنالینگ PKA با AKAP های دیگر ممکن است سلول را به سمت تکثیر یا مرگ هدایت کند، AKAP3 به‌احتمال به‌عنوان یک مهارکننده سیگنال‌های تکثیری عمل می‌کند.[۱۸] اما مطالعات بیشتری لازم است تا بتوان در مورد این فرضیه تصمیم‌گیری کرد، زیرا کاهش بیان ژن همیشه در مهار تکثیر نقش ندارد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، بیمارانی که بیان AKAP3 در بافت‌های نرمال مجاور تومور خود ندارند، پیامد ضعیف‌تری نشان می‌دهند.

آنالیزهای انجام شده درزمینه بیان این ژن و رژیم‌های درمانی گوناگون، نشان داد که ارتباط معناداری بین آن‌ها وجود ندارد و این مسئله ممکن است بیانگر آن باشد که تفاوت‌های معنادار در بقای بیماران، که در مطالعه حاضر یافت شده، شاید به دلیل تفاوت‌های موجود در بیان AKAP3 بوده و ارتباطی به توزیع و تنوع درمان بین دو گروه بیماران مورد مطالعه نداشته است. در مطالعه پیشین که توسط Sharma و همکاران انجام شده، بیان AKAP3 با پیش‌آگهی ضعیف در سرطان تخمدان اپی‌تلیال ارتباط داشت،[۱۰] اما بیان آن در بافت نرمال مجاور تومور مشاهده نشد. تغییر بیان ژن در بافت‌های مجاور توموری که از نظر هیستولوژیکی نرمال هستند، موضوع بحث است. تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند، بافت‌های مجاور تومور که از نظر مورفولوژیکی نرمال هستند در مقایسه با بافت نرمال، دستخوش تغییرات معنادار نمی‌شوند اما تغییرات مشابه بافت تومور را در سطح مولکولی نشان می‌دهند.[۱۹و۲۰]

این تغییرات ممکن است اولین تغییرات منتهی به توموری شدن یا اثرات ناشی از توموری شدن باشد. در دو مطالعه‌ای که بر روی سرطان پروستات صورت گرفته، مقایسه میکروآرایه بافت‌های تومور، نرمال مجاور تومور و نرمال از فرد سالم، افزایش بیان فاکتورهای رونویسی، تبدیل‌کننده‌های سیگنال و ژن‌های تنظیم‌کننده رشد را، در بافت‌های تومور و نرمال مجاور نشان داد اما در بافت‌های نرمال مشاهده نشد.[۲۱و۲۲]

در سال ۲۰۰۶، Schneiders و همکاران پیشنهاد کردند که ممکن است پروفایل ژنتیکی بافت نرمال مجاور تومور با شکست درمان در سرطان رکتال ارتباط داشته باشد. بدین‌ترتیب اهمیت ریز محیط تومورها در عود مجدد تومورهای رکتال، مطرح گردید.[۲۳] از آن‌جایی‌که عود دوباره بیماری یک مشکل کلینیکی قابل توجه در بیماران مبتلا به سرطان است، داشتن امکانی برای ارزیابی ژنتیکی در نمونه‌های نرمال بیماران در پیش‌بینی آن در تحقیقات پزشکی مورد توجه بسیاری است. تحقیقات بیشتر بر روی AKAP3 در بافت‌هایی که با تهاجم کمتر از بیماران قابل تأمین است، می‌تواند به تصمیم‌گیری در این زمینه کمک کند که آیا استفاده از نمونه‌های نرمال در پیش‌بینی نتایج درمان کمک‌کننده است یا خیر.

در نتیجه، در بین شاخص‌های زیستی گوناگون، آنتی‌ژن‌های سرطانی–بیضه‌ای کاندیدهای امیدوارکننده‌ای هستند که در بین آن‌ها AKAP توجه بیشتری به خود جلب کرده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، AKAP3 احتمالاً به‌عنوان مهارکننده تکثیر سلولی عمل می‌کند زیرا در مراحل بالاتر بیماری و در تومورهایی با سایز بزرگ، بیان نمی‌شود. علاوه بر این، یافته‌های ما نیاز به بررسی‌های تکمیلی به‌ویژه در سطح پروتیین دارد تا بتوان P به ارزش و اهمیت ارزیابی AKAP3 در بافت نرمال بیماران برد و از آن به‌عنوان مارکری برای پاسخ به درمان استفاده نمود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]

"مقایسه میزان بیان ژن AKAP3 در نمونه بافت سرطان پستان با بافت پستان نرمال"، مصوب دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی در سال ۱۳۹۳، به کد ۲۰-۲۲٤۱ می‌باشد که به‌طور مشترک با دانشگاه علوم پزشکی آجا و در پژوهشکده سرطان پستان (BCRC) انجام شده است.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-86.
2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007;13(4):383-91.
3. Scudellari M. A ballsy search for cancer targets. *Nat Med* 2011;17(8):916-8.
4. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004;4:1.
5. Whitehurst AW. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014;54:251-72.
6. Saini S, Jagadish N, Gupta A, Bhatnagar A, Suri A. A novel cancer testis antigen, A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) is a potential biomarker for breast cancer. *PLoS One* 2013;8(2):e57095.
7. Suri A, Saini S, Sinha A, Agarwal S, Verma A, Parashar D, et al. Cancer testis antigens: A new paradigm for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012;1(7):1194-1196.
8. Carnegie GK, Means CK, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life* 2009;61(4):394-406.
9. Xu K, Qi H. Sperm-specific AKAP3 is a dual-specificity anchoring protein that interacts with both protein kinase a regulatory subunits via conserved N-terminal amphipathic peptides. *Mol Reprod Dev* 2014;81(7):595-607.
10. Sharma S, Qian F, Keitz B, Driscoll D, Scanlan MJ, Skipper J, et al. A-kinase anchoring protein 3 messenger RNA expression correlates with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;99(1):183-8.
11. Okada T, Akada M, Fujita T, Iwata T, Goto Y, Kido K, et al. A novel cancer testis antigen that is frequently expressed in pancreatic, lung, and endometrial cancers. *Clin Cancer Res* 2006;12(1):191-7.
12. Taylor M, Bolton LM, Johnson P, Elliott T, Murray N. Breast cancer is a promising target for vaccination using cancer-testis antigens known to elicit immune responses. *Breast Cancer Res* 2007;9(4):R46.
13. 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.
14. Hundsrucker C, Klussmann E. Direct AKAP-mediated protein-protein interactions as potential drug targets. *Handb Exp Pharmacol* 2008;(186):483-503.
15. Tröger J, Moutty MC, Skroblin P, Klussmann E. A-kinase anchoring proteins as potential drug targets. *Br J Pharmacol* 2012;166(2):420-33.
16. Sarwar M, Persson JL. The protein kinase A (PKA) intracellular pathway and androgen receptor: a novel mechanism underlying the castration-resistant and metastatic prostate cancer. *J Cancer Sci Ther* 2012;2012.
17. Tortora G, Ciardiello F. Targeting of epidermal growth factor receptor and protein kinase A: molecular basis and therapeutic applications. *Ann Oncol* 2000;11(7):777-83.
18. Hedrick ED, Agarwal E, Leiphrakpam PD, Haferbier KL, Brattain MG, Chowdhury S. Differential PKA activation and AKAP association determines cell fate in cancer cells. *J Mol Signal* 2013;8(1):10.
19. Finak G, Sadekova S, Pepin F, Hallett M, Meterissian S, Halwani F, et al. Gene expression signatures of morphologically normal breast tissue identify basal-like tumors. *Breast Cancer Res* 2006;8(5):R58.
20. Försti A, Louhelainen J, Söderberg M, Wijkström H, Hemminki K. Loss of heterozygosity in tumour-adjacent normal tissue of breast and bladder cancer. *Eur J Cancer* 2001;37(11):1372-80.
21. Haaland CM, Heaphy CM, Butler KS, Fischer EG, Griffith JK, Bisoffi M. Differential gene expression in tumor adjacent histologically normal prostatic tissue indicates field cancerization. *Int J Oncol* 2009;35(3):537-46.
22. Chandran UR, Dhir R, Ma C, Michalopoulos G, Becich M, Gilbertson J. Differences in gene expression in prostate cancer, normal appearing prostate tissue adjacent to cancer and prostate tissue from cancer free organ donors. *BMC Cancer* 2005;5:45.
23. Schneider S, Park DJ, Yang D, El-Khoueiry A, Sherrod A, Groshen S, et al. Gene expression in tumor-adjacent normal tissue is associated with recurrence in patients with rectal cancer treated with adjuvant chemoradiation. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16(8):555-63.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]

TUMJ Tehran University Medical Journal, January 2017; Vol. 74, No. 10: 688-696 Original Article

The A-kinase anchoring proteins correlation with disease free survival in breast cancer

Rezvan Esmaeili Ph.D.[1]
Tannaz Samadi M.Sc.[1]
Nasrin Abdoli M.Sc.[1]
Keivan Majidzadeh-Ardebili M.D., M.P.H., Ph.D.[1,2*]
Leila Farahmand Pharm.D., Ph.D.[1]
Malihe Salehi B.Sc.[1]

1- Department of Cancer Genetics, Breast Cancer Research Center, ACECR, Tehran, Iran.
2- Tasnim Biotechnology Research Center (TBRC), School of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Department of Cancer Genetics, Breast Cancer Research Center, ACECR, No. 146, South Gandi Ave., Vanak Sq., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 88796003
E-mail: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

Abstract

Received: 26 May 2016 Revised: 09 Jan. 2017 Accepted: 18 Jan. 2017 Available online: 18 Jan. 2017

Background: Researchers are always trying to find specific markers which express specifically in cancer. These specific markers help to diagnose and treat cancer without affecting normal tissues. Cancer-testis antigens are among the new promising biomarkers, especially for targeted therapy. These markers are specially expressed in testis. Various studies have been reported individual expression of these proteins in some tumor tissues. Since testis is an immune privilege organ, abnormal expression of the above mentioned genes raises immune response and the serum antibody against them (CT antigene) can be detected as a marker of cancer. However, understanding their differential role in normal and cancer tissues may introduce them as new candidates of cancer biomarkers. The aim of this study was to evaluate AKAP3 gene expression in breast cancer and its correlation with clinicopathologic features of the disease.

Methods: This study is a case-control study conducted at the Brest Cancer Research Center (BCRC)- Iran, between October 2014 to May 2016. AKAP3 gene expression was investigated with real-time PCR in breast samples including: 74 tumors, 73 normal adjacents and 15 normal tissues. On the other hand the correlation between gene expression, clinicopathologic features of the tumors and treatment regimen were evaluated.

Results: Statistical analysis showed a significant correlation between lack of AKAP3 expression, tumor size (P=0.01) and stage (P=0.04). The association between poor prognosis and the absence of AKAP3 expression in normal adjacent tissues were observed. Kaplan Meier plot showed a significant better disease free survival in the normal adjacent patients group that are expressed AKAP3.

Conclusion: It was observed that the better free survival in the normal adjacent group is because of the different AKAP3 expression, not treatment variations between two patient groups. As a result, AKAP3 can be a suitable candidate biomarker for breast cancer patients. Also, the study of gene expression in normal tissue of patients may be used to predict response to therapy.

Keywords: biomarkers, breast cancer, cancer-testis antigens, disease-free survival.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-20]