

بررسی میزان بیان ژن *ELTD1* در سلول‌های سرطانی HT29 تیمار شده با ملاتونین: مطالعه بیوانفورماتیکی و تجربی

علی رجبی^۱، علی امامی^۲، رضا صفرعلیزاده^{۳*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۷/۲۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۱۲/۲۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان کلورکتال بعد از سرطان‌های ریه و پستان بیشترین میزان مرگ‌ومیر را در بین سرطان‌ها دارد. ژن *ELTD1* کدکننده‌ی یک پروتئین متصل شونده به G-protein می‌باشد که به‌عنوان گیرنده فاکتور رشد عمل می‌کند و در رگ‌زایی طبیعی و همچنین سرطانی شدن سلول‌ها نقش دارد. از آنجایی که اثرات مثبت ملاتونین بر افزایش مرگ‌ومیر سلول‌های سرطانی و کاهش متاستاز و رگ‌زایی ثابت شده است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی میزان بیان ژن *ELTD1* در سلول‌های سرطانی HT29 تیمار شده با ملاتونین به دو روش بیوانفورماتیکی و تجربی می‌باشد.

مواد و روش کار: ابتدا داده‌های میکروآرایه از پایگاه داده GEO تهیه شد و با استفاده از جعبه‌ابزار شبکه عصبی (PNN) در نرم‌افزار MATLAB 2018a آنالیز شد. سمیت سلولی ملاتونین به روش تست MTT ارزیابی شد. در نهایت Q-RT-PCR برای ارزیابی میزان بیان ژن *ELTD1* در سلول‌های HT29 تیمار شده با ملاتونین استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج مربوط به آنالیز بیوانفورماتیکی نشان داد که میزان بیان ژن *ELTD1* در سلول‌های تیمار شده با ملاتونین در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت قابل‌توجهی کاهش یافت. بررسی سمیت سلولی به روش تست MTT نشان داد که ملاتونین زیست‌تایی سلول‌های HT29 را به‌صورت وابسته به غلظت دارو و زمان کاهش داد و غلظت IC50 (مهار ۵۰ درصد از رشد سلولی) در ۴۸ ساعت برابر ۱۶۰ μM محاسبه شد. به‌علاوه آنالیز مربوط به نتایج Q-RT-PCR نشان داد که ملاتونین میزان بیان ژن *ELTD1* را به‌صورت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) کاهش داد که هم سو با نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز بیوانفورماتیکی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که ژن *ELTD1* می‌تواند به‌عنوان ژن هدف ملاتونین در درمان سرطان کلورکتال مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه برای تأیید یافته‌های مطالعه حاضر نیاز به مطالعات بیشتری است.

کلیدواژه‌ها: ملاتونین، آنالیز بیوانفورماتیکی، سرطان کلورکتال، ژن *ELTD1*

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی‌ام، شماره دوازدهم، ص ۷۴-۶۶، اسفند ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۹۲۷۲۸

Email: safaralizadeh@tabrizu.ac.ir

مقدمه

فرایندهای چندمرحله‌ای و پیچیده‌ای همراه با مجموعه‌ای از تغییرات سلولی است و جهت پیشروی و رشد خود تا غلبه کامل بر بدن از پدیده رگ‌زایی کمک می‌گیرد. روش‌های نوین درمانی در انواع سرطان‌ها می‌تواند وابسته به فاکتورهای فردی، مشخصات پاتولوژیک و مولکولی، محل بیماری و وسعت بیماری متفاوت باشد. از جمله روش‌های درمانی مرسوم در درمان انواع سرطان‌ها می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، درمان بیولوژیک (ایمنی درمانی و ژن‌درمانی) و هورمون درمانی اشاره کرد. باین‌حال میزان

سرطان کلورکتال از جمله شایع‌ترین بدخیمی دستگاه گوارش است و سومین و چهارمین عامل مرگ‌ومیر به ترتیب در بین مردان (۸.۱-۸.۳ در هر صد هزار نفر) و زنان (۶.۵-۷.۵ در هر صد هزار نفر) ایرانی می‌باشد (۱). متأسفانه میزان شیوع این سرطان در کشورهای مختلف از جمله ایران در حال افزایش است و باوجود پیشرفت در روش‌های تشخیصی و درمانی، میزان مرگ‌ومیر در ۴۰ سال گذشته افزایش یافته است (۲). تشکیل سرطان مستلزم انجام

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲ فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

سرطان کلورکتال) به دو روش بیوانفورماتیکی و تجربی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

روش بررسی بیوانفورماتیکی:

ابتدا داده‌های بیان چندین هزار ژن که توسط تکنولوژی‌های میکروآرایه استخراج شده بود از بانک داده‌ی GEO Dataset و پایگاه داده‌ی NCBI با کد دسترسی GSE132119 جمع‌آوری شد. در مرحله‌ی بعد پیش‌پردازش‌هایی روی داده‌های جمع‌آوری شده صورت گرفت و توسط الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی شبکه عصبی که تحت عنوان روش PNN^۱ گفته می‌شود آنالیز شدند (۱۷). مکانیسم عمل این روش بر پایه‌ی جستجو بین ژن‌ها می‌باشد و از بین آن‌ها، ژن‌هایی را که با بیشترین دقت، حساسیت و اختصاصیت می‌توانند بین نمونه‌های کنترل و غیر کنترل تمایز قائل شوند را انتخاب می‌کند. در مرحله‌ی سوم میزان بیان ژن‌های *ELTDI* و بتا - اکتین (دو ژن مورد مطالعه) که دارای بیشترین امتیازها (تأثیری پذیری ژن‌ها تحت تأثیر تیمار سلولی با ملاتونین) بود، توسط الگوریتم انتخاب و دسته‌بندی شدند. تمامی پیاده‌سازی‌ها توسط نرم‌افزار MATLAB 2018 a انجام گردید. در مرحله چهارم اعتبار بیولوژیکی ژن‌های مورد مطالعه با بررسی مقالات منتشر شده و سایت Gene MANIA سنجیده شد.

کشت سلولی:

کشت سلولی رده‌های سلولی سرطان کلورکتال HT29 بر اساس راهنمای استفاده از این سلول‌ها از بانک ازت موجود در دانشکده علوم طبیعی - دانشگاه تبریز خارج شد و بعد از عمل یخ‌زدایی، در داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل (RPMI حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰ U/ml، استرپتوماسین ۱۰۰ mg/ml و ۱۰ درصد سرم گوساله تازه متولد شده FBS) کشت داده شدند و در نهایت تحت شرایط دی‌اکسید کربن ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند.

سمیت سلولی:

سمیت سلولی ملاتونین بر روی سلول‌های HT29 با استفاده از تست MTT در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت ارزیابی شد. برای این منظور، هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت FBS 10% RPMI حاوی ۱۰۰۰۰ هزار سلول توزیع شدند. به دنبال انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و رسیدن به

مرگ‌ومیر همچنان در بیماران مبتلا به سرطان بالا بوده که نشان‌دهنده ناکارآمدی این روش‌های درمانی دارد (۳، ۴).

ملاتونین (ان - استیل - ۵ - تیرپیتامین) برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ توسط Learner و همکاران شناسایی و استخراج شد. ملاتونین نقش قابل توجهی در سیستم ساعت بیولوژیک ایفاء می‌کند و از خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی برخوردار است (۵). میزان این هورمون در نیمه‌شب به بیشترین مقدار و در طول روز به کم‌ترین مقدار ممکن خود می‌رسد. مطالعات جدید نشان داده است که ملاتونین به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خاصیت ضد سرطانی قابل توجهی برخوردار است (۶). به طوری که مشخص شده است ملاتونین باعث کاهش علائم بسیاری از سرطان‌ها، مهار رگزایی، تکثیر و متاستاز (تهاجم) می‌گردد (۷). به علاوه مطالعات نشان داده است که ملاتونین دارای خاصیت انکوآستاتیک بر روی سرطان به‌ویژه سرطان‌های وابسته به هورمون است (۸، ۹). اگرچه تحقیقات انجام شده نشان داده است که مکانیسم عمل ضد سرطانی ملاتونین به‌واسطه مسیرهای پیام‌رسانی استروژنی است (۱۰) با این حال میانکنش آن با ژن‌هایی که نقش انکوژنی و سرکوب‌کننده توموری دارند به صورت دقیق بررسی نشده است. برای مثال *ELTDI* ژنی که با بیشترین تأثیر بر روی مسیرهای سیگنالینگ می‌باشد و روی بازوی کوچک کروموزوم ۱ قرار گرفته است (۱۱). *ELTDI* پروتئین G-protein متصل شده به رسپتور را رمزگذاری می‌کند و در بسیاری از سرطان‌ها به صورت قابل توجهی افزایش بیان نشان داده است. شواهد نشان می‌دهد که تکثیر، تهاجم و متاستاز تومور به پدیده آنژیوژنیزس وابسته است (۱۲، ۱۳). از طرف دیگر مشخص شده است که *ELTDI* به‌واسطه نقش کلیدی آن در آنژیوژنیزس باعث تومورزایی می‌شود. همچنین در مطالعات مختلف از *ELTDI* به‌عنوان آنکوژن یاد شده است (۱۱، ۱۴) همچنین گزارش شده است که ملاتونین تهاجم سلول‌های سرطان سینه (MCF-7 و MDA-MB-231) را به‌واسطه کنترل شرایط اسیدی محیط تومور کنترل می‌کند (۱۵). این در حالی است که میزان بیان ژن‌های سرکوب‌گر تومور در سرطان‌های مختلف کاهش می‌یابد (۱۶). بنابراین در صورتی که ترکیبات داروئی از جمله داروهای شیمی‌درمانی، ترکیبات طبیعی و داروهای ژنتیکی بر پایه siRNA و miRNA بتوانند میزان بیان ژن‌های بیماری‌زا (انکوژنی) را کاهش و مهارکننده‌ی توموری را افزایش دهند، می‌توانند راهکار نویدبخشی در زمینه درمان سرطان باشند. در مطالعه حاضر اثر ملاتونین بر میزان بیان ژن *ELTDI* در سلول‌های HT29 (به‌عنوان مدل

¹ Probabilistic neural networks

شد و پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت 12000 rpm سانتریفیوژ شد. اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA به دست آمده اضافه شد و سپس سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور 7500 rpm صورت گرفت تا RNA شسته شود. در نهایت RNA در آب حاوی دی اتیل پیروکربنات (DEPC، سیگما آلدریج، آلمان) حل شد و کیفیت آن با استفاده از نانودراپ بررسی شد.

سنتز cDNA:

در مرحله سنتز cDNA ابتدا باید RNA استخراج شده را به توالی DNA تبدیل کرد. برای این منظور از تکنیک RT-PCR استفاده می‌شود. در این روش با استفاده از توالی‌های شش نوکلئوتیدی تصادفی که به‌طور تصادفی به توالی RNAها متصل می‌شوند واکنش RT-PCR شروع می‌شود. برای سنتز cDNA ۲ میکروگرم از RNA را در داخل میکروتیوب ریخته و یک میکرولیتر DNase I و بافر آن به میکروتیوب افزوده می‌شود. در مرحله بعد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده می‌شود. برای مهار عملکرد آنزیم DNase I، ۱ میکرولیتر EDTA به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. در ادامه، ۲/۵ میکرو لیتر از محتویات کیت سنتز cDNA به RNA تیمار شده با آنزیم DNase I افزوده شده و طبق دستورالعمل شرکت (Invitrogen) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شده و در نهایت به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

تراکم مناسب، تیمار سلولی با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکرومولار از ملاتونین (تهیه شده از سیگما آلدریج) انجام شد. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵۰ میکرو لیتر از مایع رویی هر چاهک برداشته شده و با ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT (با غلظت ۲mg/ml) عوض شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون، محیط کشت هر یک از چاهک‌ها خارج و با ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO تعویض شد. در نهایت بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جذب فرمازان بلو در 570 nm با استفاده از دستگاه الیزاریدر سنجیده شد. زنده‌مانی نسبی به شکل درصد سلول‌های زنده به سلول‌های تیمار نشده نشان داده شد.

استخراج RNA:

به‌منظور ارزیابی بیان ژن‌های *ELTD1* و *Beta-actin* به تعداد ۲۰۰ هزار سلول HT29 در داخل هر کدام از خانه‌های پلیت شش خانه توزیع شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت با ملاتونین $150 \mu\text{M}$ تیمار شدند. به دنبال ۴۸ ساعت انکوباسیون، RNA سلول‌ها به‌واسطه کیت استخراج TRIZOL استخراج گردید. ابتدا یک میلی‌لیتر از کیت تریزول بر روی حدود یک میلیون سلول اضافه شده و پیمپتاژ کامل سلولی انجام و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Merck، آلمان) به هر نمونه افزوده شد و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. نمونه مورد نظر پس از ورتکس و قرار گرفتن در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت 12000 rpm سانتریفیوژ شد. فاز بالایی با ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Merck، آلمان) مخلوط

جدول (۱): پرایمرهای مورد استفاده به همراه توالی آن‌ها

| توالی (5'-3') | Tm | فوروارد (F) و ریورس (R) | پرایمر |
|----------------------|-------|-------------------------|------------|
| AGAGCTACGAGCTGCCTGAC | 61.66 | F | Beta-actin |
| AGCACTGTGTTGGCGTACAG | 60.88 | R | |
| GCCTGCTATTGCAACATGGG | 59 | F | ELTD1 |
| AGCATTTTCGCCACAGGACT | 59 | R | |

ژن استفاده شد. تمامی نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS PASW Statistic 18 و student's t-Test و Bivariate Correlate هم برای آنالیز بیان

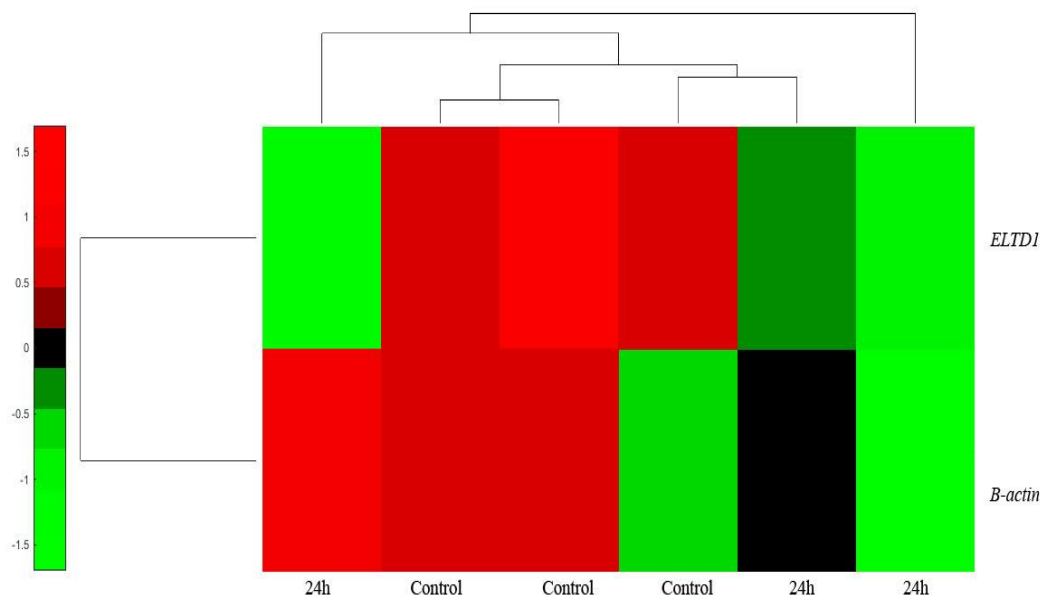
برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان ژن‌ها از نرم‌افزار SPSS PASW Statistic 18 استفاده شد. به‌علاوه از آزمون‌های student's t-Test و Bivariate Correlate هم برای آنالیز بیان

یافته‌ها

نتایج مربوط به بررسی بیوانفورماتیکی:

در مطالعه حاضر برای تأثیر احتمالی ملاتونین بر میزان بیان ژن *ELTD1* و *Beta-actin* ابتدا مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی بر روی داده‌های بیان ژن موسوم به میکرو آرایه که توسط Zheng و همکاران در سال ۲۰۱۹ استخراج شده بود، انجام گرفت. در مطالعه آنها سلول‌های HT29 به صورت سه تکرار در دو گروه کنترل (تیمار نشده) و تیمار شده با ملاتونین به مدت ۲۴ تقسیم‌بندی شد. داده‌های میکرو آرایه مربوط به مطالعه Zheng با کد دسترسی

GSE132119 تهیه شد و توسط الگوریتم نوشته شده مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه هر سه تکرار نشان می‌دهد که تغییرات قابل توجهی در ژن بتا-اکتین در بین گروه‌های کنترل و تیمار شده مشاهده نمی‌شود. این در حالی است که میزان بیان ژن *ELTD1* بعد از مواجهه شدن سلول‌های HT29 با ملاتونین به صورت قابل توجهی کاهش یافته است. شایان ذکر است که شدت تغییرات از جمله کاهش بیان (رنگ سبز) و افزایش بیان با رنگ قرمز نشان داده می‌شود. و رنگ سیاه نشان دهنده عدم تغییر در میزان بیان ژن‌ها است (شکل ۱).

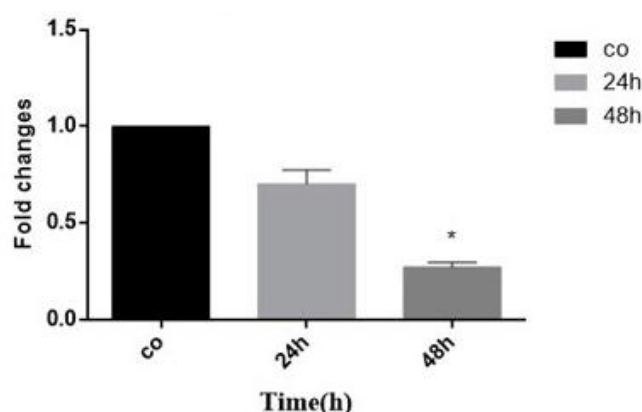


شکل (۱): آنالیز بیوانفورماتیکی مربوط به اثر ملاتونین بر میزان بیان ژن *ELTD1* در سلول‌های HT29 تیمار شده با ملاتونین (با غلظت μM ۱۵۰).

نتایج مربوط به سمیت سلولی:

برای ارزیابی سمیت سلولی ملاتونین از آزمون MTT استفاده شد و نتایج نشان داد که مواجهه شدن سلول‌های HT29 با ملاتونین در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو مولار به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها

می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، میزان سمیت ملاتونین بر علیه سلول‌های HT29 به صورت وابسته به غلظت ملاتونین و زمان اثر اتفاق افتاده است. به طوری که مهار ۵۰ درصد زیستایی سلول‌ها در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر μM ۴۸۷ و μM ۱۶۰ است.

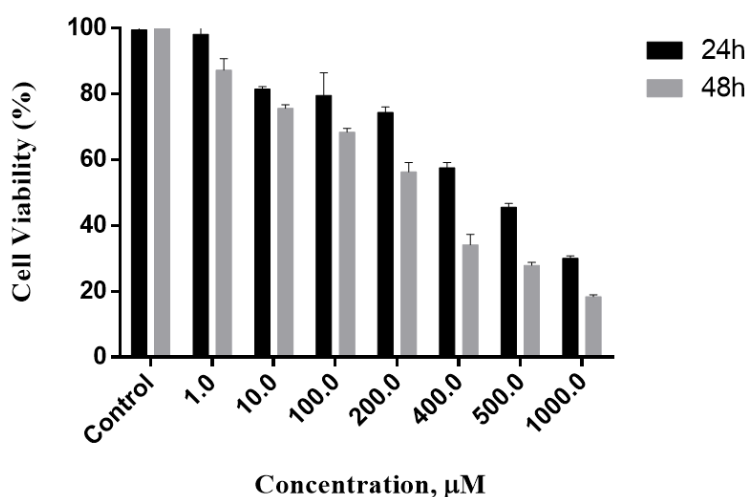


شکل (۲): اثر سایتوتوکسیک ملاتونین ($1-1000 \mu\text{M}$) بر روی رده سلول‌های سرطانی HT29 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت.

نتایج مربوط به Q-RT-PCR:

نتایج مربوط به Q-RT-PCR نشان داد که میزان بیان ژن ELTD1 در سلول‌های HT29 تیمار شده با ملاتونین (در غلظت $150 \mu\text{M}$) به مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل کاهش قابل توجهی نشان داد اما این کاهش معنی‌دار ($P \geq 0.05$) نبود. این در حالی است که به دنبال گذشت ۴۸ ساعت از زمان تیمار میزان

بیان ژن ELTD1 با شدت بیشتر و به صورت معنی‌دار ($P \leq 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل (بتا-اکتین) کاهش یافت (شکل ۳). داده‌های کمی در هر نمونه در برابر β -actin نرمال‌سازی شد و بیان نسبی ژن‌های مرتبط با نمونه کنترل متناظر (گروه تیمار نشده)، که ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد توسط روش $2^{-\Delta\text{Ct}}$ محاسبه شد.



شکل (۳): بررسی مهار بیان ژن ELTD1 در سلول‌های سرطانی HT29 تیمار شده با ملاتونین ($150 \mu\text{M}$) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸. بیان ژن ELTD1 به روش Q-RT-PCR ($P < 0.05$)

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما برای اولین بار اثر ملاتونین را بر روی میزان بیان ژن ELTD1 در سلول‌های HT29 با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و تجربی مورد ارزیابی قرار دادیم و نتایج نشان داد

که در هر دو روش کاهش قابل توجهی در میزان بیان ژن ELTD1 در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود. بر اساس مطالعات انجام گرفته در گذشته ELTD1 یک ژن انکوژنی می‌باشد و در اغلب سرطان‌ها میزان بیان آن افزایش می‌یابد.

زیستایی سلول‌ها به‌صورت وابسته غلظت سبب می‌شود (۲۲). در مرحله بعد جهت تأیید و مقایسه نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی با یافته‌های تجربی، میزان بیان ژن ELTD1 با دستگاه Q-RT-PCR در سلول‌های HT29 تیمار شده با ملاتونین ارزیابی شد و نتیجه نشان داد که میزان بیان ژن ELTD1 را در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت وابسته به زمان کاهش می‌یابد. بنابراین نتایج مربوط به ارزیابی Q-RT-PCR هم راستا با نتیجه به‌دست آمده از آنالیز بیوانفورماتیکی است. طی تحقیقی عابدی و همکاران در سال ۱۳۹۸ میزان بیان ژن HMGA2 را در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با shRNA و siRNA اختصاصی HMGA2 به دو روش بیوانفورماتیکی و تجربی ارزیابی کردند و نشان دادند که یافته‌های هر دو روش هم راستا بوده که هم سو با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (۲۳). Li و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشاهده کردند که ELTD1 به‌واسطه فعال کردن JAC/STAT3/ HIF-1 α سیگنالینگ باعث تسهیل تکثیر، مهاجرت و متاستاز گلیوما می‌شود (۲۴). از طرف دیگر در مطالعه‌ی Ziegler و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که در صورت تیمار موش (G55 glioma-bearing) با آنتی بادی ELTD1، میزان زنده‌مانی و حجم تومور به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابد (۲۵). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ملاتونین به‌واسطه کنترل میزان بیان ژن ELTD1 (انکوژون) خاصیت ضد سرطانی خود را القاء کرده است. برای مشخص شدن بهتر مکانیسم مولکولی ملاتونین و تنظیم بیان ژن ELTD1 می‌توان میزان بیان پروتئین این ژن و پروتئین‌های مهم و درگیر در مسیر سیگنالینگ را بررسی کرد که به دلیل محدودیت ابزاری و مالی امکان این در مطالعه حاضر میسر نشد و از محدودیت بسیار مهم این مطالعه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاران گرامی که در این پروژه به نحوی ما را یاری کرده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

بنابراین هدف قرار دادن ELTD1 با عوامل درمانی با خاصیت ضد سرطانی می‌تواند راهکار نوینی در حوزه درمان هدفمند باشد. علاوه بر این انتخاب دقیق ژن هدف که قرار است توسط عوامل درمانی هدف گیری شود از ضرورت بسیار مهم دیگر در درمان هدفمند می‌باشد (۱۸). استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر روی داده‌های میکرو آرایه اطاعات ارزشمندی در مورد میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه از جمله انکوژن‌ها، مهار کننده‌های توموری، فاکتورهای رونویسی، siRNA و miRNA در در انواع سرطان‌ها ارائه می‌دهد. برای مثال شناسایی و انتخاب ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده توموری که قادر هستند مجموعه ژنی را هدف‌گیری کنند از گام‌های اساسی در درمان هدفمند است که الگوریتم‌ها و پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیک نقش مهمی در این زمینه دارند (۱۹).

نتایج مربوط به مطالعه بیوانفورماتیکی نشان داد که در صورت مواجهه شدن سلول‌های HT29 با ملاتونین میزان بیان ژن ELTD1 به‌صورت وابسته به زمان کاهش می‌یابد. در مطالعه مشابهی Towner و همکاران در سال ۲۰۱۲ به دنبال استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی نشان دادند که ELTD1 پتانسیل بیومارکری جدیدی را در گلیوماها دارا است (۲۰).

فاز دوم این مطالعه (قسمت تجربی) برای تأیید نتایج حاصل از ارزیابی بیوانفورماتیکی صورت گرفت. بدین منظور ابتدا میزان سمیت سلولی ملاتونین روی سلول‌های HT29 ارزیابی شد و نتایج نشان داد که ملاتونین به‌صورت وابسته به غلظت و زمان زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. در مطالعه‌ی LAOTHONG و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که در صورت تیمار کردن سلول‌های KKKU-M055 و KKKU-M214 (به‌عنوان مدل سرطان Cholangiocarcinoma) با غلظت‌های مختلف از ملاتونین زیستایی سلول‌ها به‌صورت وابسته به غلظت و زمان به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد که هم سو با یافته سمیت سلولی در مطالعه ما است (۲۱). در مطالعه دیگری Yun و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که تیمار سلول‌های SK-BR-3 و MDA-MB-231 (به‌عنوان مدل سرطان سینه) با غلظت‌های متفاوت از ملاتونین

References:

- Houlston R. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol*. 2001;54(4):206.
- Zinzindohoué F, Lecomte T, Ferraz J-M, Houllier A-M, Cugnenc P-H, Berger A, et al. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional

promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(2):594-9.

- Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, Baradaran B, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Appl Mater Today* 2018;12:177-90.

4. Abedi-Gaballu F, Abbaspour-Ravasjani S, Mansoori B, Yekta R, Hamishehkar H, Mohammadi A, et al. Comparative of in vitro evaluation between erlotinib loaded Nanostructured lipid carriers and liposomes against A549 lung cancer cell line. *Iran J Pharm Res* 2019;18(3):1168-79.
5. Anisimov VN. The role of pineal gland in breast cancer development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;46(3):221-34.
6. Zare H, Shafabakhsh R, Reiter RJ, Asemi Z. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects. *J Ovarian Res* 2019;12(1):26.
7. da Silva NRJ, Laste G, Deitos A, Stefani LC, Cambraia-Canto G, Torres IL, et al. Combined neuromodulatory interventions in acute experimental pain: assessment of melatonin and non-invasive brain stimulation. *Front Behav Neurosci* 2015;9:77.
8. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(2):152-66.
9. Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Mol Cell Biochem* 2019:1-23.
10. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat J-H, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994;269(46):28531-4.
11. Kan A, Le Y, Zhang Y-f, Duan F-t, Zhong X-p, Lu L-h, et al. ELTD1 Function in Hepatocellular Carcinoma is Carcinoma-Associated Fibroblast-Dependent. *J Cancer* 2018;9(14):2415.
12. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
13. Yao H, Liu N, Lin MC, Zheng J. Positive feedback loop between cancer stem cells and angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2016;379(2):213-9.
14. Gladitz J, Klink B, Seifert M. Network-based analysis of oligodendrogliomas predicts novel cancer gene candidates within the region of the 1p/19q co-deletion. *Acta Neuropathol Commun* 2018;6(1):49.
15. Sonehara NM, Lacerda JZ, Jardim-Perassi BV, de Paula Jr R, Moschetta-Pinheiro MG, Souza YST, et al. Melatonin regulates tumor aggressiveness under acidosis condition in breast cancer cell lines. *Oncol Lett* 2019;17(2):1635-45.
16. Sun W, Yang J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J Cancer* 2010;1:136.
17. Wasserman PD. *Advanced methods in neural computing*: John Wiley & Sons, Inc.; 1993.
18. Chen B-J, Wu Y-L, Tanaka Y, Zhang W. Small molecules targeting c-Myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *Int J Biol Sci* 2014;10(10):1084.
19. Zhang T, Guo J, Gu J, Wang Z, Wang G, Li H, et al. Identifying the key genes and microRNAs in colorectal cancer liver metastasis by bioinformatics analysis and in vitro experiments. *Oncol Rep* 2019;41(1):279-91.
20. Towner RA, Jensen RL, Colman H, Vaillant B, Smith N, Casteel R, et al. ELTD1, a potential new biomarker for gliomas. *Neurosurgery* 2012;72(1):77-91.
21. Laothong U, Hiraku Y, Oikawa S, Intuyod K, Murata M, Pinlaor S. Melatonin induces apoptosis in cholangiocarcinoma cell lines by activating the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Oncol Rep* 2015;33(3):1443-9.
22. Yun S-M, Woo SH, Oh ST, Hong S-E, Choe T-B, Ye S-K, et al. Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of Redd1 expression in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2016;422:64-73.

23. Abedi Gaballu F, Mansoori B, Dehghan G. Study of hmga2 gene inhibition with specific shrna and sirna and investigation of corresponding effects on downstream gene expression in mda-mb-231 cancer cells: a bioinformatic and experimental study. *Urmia Med J* 2019;30(6):475-86.
24. Li J, Shen J, Wang Z, Xu H, Wang Q, Chai S, et al. ELTD1 facilitates glioma proliferation, migration and invasion by activating JAK/STAT3/HIF-1 α signaling axis. *Sci Rep* 2019;9(1):1-12.
25. Ziegler J, Zalles M, Smith N, Saunders D, Lerner M, Fung K-M, et al. Targeting ELTD1, an angiogenesis marker for glioblastoma (GBM), also affects VEGFR2: molecular-targeted MRI assessment. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2019;9(1):93.

EVALUATION OF *ELTD1* GENE EXPRESSION IN MELATONIN-TREATED HT29 CANCER CELLS: AN EXPERIMENTAL BIOINFORMATICS STUDY

Ali Rajabi¹, Ali Emami², Reza Safaralizadeh ^{*3}

Received: 23 Oct, 2019; Accepted: 17 March, 2020

Abstract

Background & Aims: Colorectal cancer after lung and breast cancer is the most common cause of death. The *ELTD1* gene encodes a G-protein-binding protein that acts as a growth factor receptor and plays a role in normal angiogenesis as well as in cancer cells. The aim of this study was to evaluate the *ELTD1* gene expression in melatonin treated HT29 cancer cells using bioinformatics and experimental approaches.

Materials & Methods: First, microarray data were provided from Gene Expression Omnibus (GEO) and then they were analyzed using Probabilistic neural networks (PNN) in MATLAB 2018a software as a bioinformatics tool. The cytotoxicity of melatonin was assessed by MTT assay. Subsequently, Q-RT-PCR was employed to evaluate the rate of *ELTD1* gene expression in HT29 cells treated with melatonin.

Results: The bioinformatics analysis indicated that *ELTD1* expression level considerably decreased in cells exposed to melatonin in comparison to control group. MTT assay demonstrated that melatonin reduced HT29 cell viability in a concentration and time-dependent manner and the IC₅₀ values of melatonin were calculated to be 160 μ M in 48h. In addition, analyzing Q-RT-PCR indicated that melatonin significantly decreased *ELTD1* expression level which is supported by bioinformatics analysis results.

Conclusion: The results indicated that *ELTD1* gene can be used as a target gene for melatonin in colorectal cancer therapy. However, more study is needed to prove our results

Keywords: Melatonin, bioinformatics analysis, colorectal cancer, *ELTD1* cancer

Address: Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Tel:

Email: safaralizadeh@tabrizu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(01): 74 ISSN: 2717-008X

¹ PhD Student, Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

² MSc, Department of Genetics, Tabriz University, Tabriz, Iran

³ Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran (Corresponding Author)