زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۶۰-۱۴۷

مقاله پژوهشی

بررسی عملکردی اثر فاکتور رونویسی EZH2 بر بیان مارکر β-catenin در رده سلولی کارسینومای سلول‌های سنگفرشی مری YM-1

فاطمه نورمحمدی[۱]، محمدمهدی فرقانی فرد[۱*]، وجیهه زرین پور[۱]، محمدرضا عباس‌زادگان[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: forghanifard@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹

DOI: 10.22034/ascij.2023.1992183.1516

چکیده

سرطان مری به عنوان ششمین عامل مرگ و میر در اثر سرطان در جهان و هشتمین سرطان شایع در جهان می‌باشد. از شاخص-ترین ویژگی‌های این سرطان مقاومت به شیمی-رادیو تراپی و درصد بالای عود مجدد در بیماران است. مارکر بتا-کاتنین یکی از اصلی‌ترین عوامل متاستاز و تهاجم در بیماران می‌باشد. ژن EZH2 یک فاکتور تنظیمی بیان ژن بوده و تکثیر سلول‌های تومور را افزایش می‌دهد و پرتوانی سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کند. EZH2 به طور غیرطبیعی در انواع سرطان‌های بدخیم بیان می‌شود. بتا-کاتنین یک جزء ساختاری از اتصالات چسبنده به همراه کادهرین و عامل اصلی سیگنال‌دهی مسیر Wnt در هسته است. بیان نابجای بتا-کاتنین (β-catenin) اغلب منجر به سرطان و متاستاز می‌شود. در این مطالعه وکتور خاموش‌سازی ژن EZH2 در باکتری *اشرشیا کولی* کلون و سپس استخراج شده، و پس از ترنسفکشن در سلول‌های رده سرطانی مری YM-1 ژن EZH2 خاموش شده است. پس ازاستخراج RNA، سنتزcDNA ، و تایید خاموش‌سازی ژن EZH2، بیان بتا-کاتنین با استفاده از تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. تست مهاجرت سلولی برای بررسی سرعت تهاجم سلول‌ها بعد از دستکاری ژنتیکی استفاده شد. نتایج، کاهش بیان بتا-کاتنین را در رده سلولی تحت خاموش‌سازی EZH2 نشان داد. خاموش‌سازی EZH2 بطور معنی‌داری میزان رشد و مهجرت سلول‌های سرطانی مری را کاهش داد. نتایج حاکی از نقش ژن EZH2 در تنظیم بیان ژن بتا-کاتنین در سرطان سلول‌های سنگفرشی مری می‌باشد. با توجه به این که انتشار تومور یکی از مهمترین عوامل بدخیمی سرطان مری می‌باشد و از طرفی این ویژگی‌های سرطان مری به علت متاستاز و تهاجم موجب مرگ زودرس بیماران می‌گردد، یافتن مارکر موثر در کنترل سلول‌های بنیادین سرطانی می‌تواند نویدبخش درمان بیماران باشد.

کلمات کلیدی: سرطان سلول‌های سنگفرشی مری، بتا-کاتنین، EZH2، shRNA.

مقدمه

سرطان سلول‌های سنگفرشی مری (ESCC) هشتمین بدخیمی رایج و ششمین بدخیمی کشنده بر اثر سرطان در سراسر جهان می‌باشد (۷). همچنین، سرطان مری در ایران رتبه‌ی هفتم در شیوع سرطان را دارد (۲). این سرطان سالانه مسئول مرگ بیش از ده میلیون نفر در سرتاسر دنیا می‌باشد. بروز سرطان مری از لحاظ موقعیت جغرافیایی متفاوت بوده به-طوری‌که محدوده‌ی جغرافیایی بین شمال ایران تا شمال چین را کمربند سرطان مری می‌دانند. به خصوص استان گلستان در شمال ایران یکی از پر

بروزترین نقاط در جهان می‌باشد (۹، ۲٤). سرطان مری از لحاظ هیستولوژی و بافت شناسی به دو نوع اصلی تقسیم می‌شود: سرطان سلول‌های سنگفرشی مری (ESCC) و آدنوکارسینوم مری (EADC). نوع ESCC با حدود ۸۰ درصد به عنوان رایج‌ترین فرم سرطان مری می‌باشد. صرف نظر از تمامی پیشرفت-های حاصله در زمینه تشخیص و درمان سرطان همچنان بقا کلی در بیماران مبتلا به سرطان مری بسیار کمتر از سایر سرطان‌ها می‌باشد. یکی از مهمترین مشکلات در درمان بیماران مبتلا به ESCC متاستاز و تهاجم تومور به بافت‌های اطراف: ریه، کلیه و غیره می‌باشد که علت اصلی آن بیان مارکرهای کمک کنده به مسیر EMT می‌باشد. از جمله این نوع مارکرها می‌توان به EZH2 و بتا-کاتنین اشاره نمود (۵، ۸). EZH2 یک زیرواحد کاتالیزوری هسته PRC2 بوده و یک عضو حیاتی از خانواده PRC2 است که تری-متیلاسیون هیستون H3 در بنیان لیزین ۲۷و۹ (H3K27me3) (H3K9me)را تنظیم می‌کند و نهایتا ژن‌های هدف پایین دست را سرکوب می‌کند. EZH2 تکثیر سلول‌های تومور را افزایش می‌دهد و پرتوانی سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کند. همچنین EZH2 به طور غیرطبیعی دربسیاری از انواع سرطان‌های بدخیم بیان می‌شود (۱٤، ۱۵، ۱٦، ۳٤). EZH2 همچنین در تنظیم پیشرفت چرخه سلولی نقش دارد و اختلال در تنظیم EZH2 تکثیر سلولی را تسریع می‌کند و بقاسلولی را افزایش می‌دهد و در نتیجه باعث ایجاد سرطان هایی مانند کلورکتال، ملانوم و سرطان سینه می‌شود (۲۱، ۳۵). با وجود توسعه درمان سرطان، مقاومت دارویی سرطان همچنان یک مشکل جدی است (۳۰، ۳۷). EZH2 نقش مهمی در مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند. بیان بیش از حد EZH2 باعث افزایش مقاومت شیمیایی در سرطان ریه ، کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن (HNSCC) و گلیوبلاستوما می‌شود (۳٦). بتا-کاتنین یک مولکول چند وظیفه‌ای و حفاظت شده از نظر تکاملی است که در متازوآ نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای رشدی و هموستاتیک ایفا می‌کند. به طور خاص، بتا-کاتنین یک جزء ساختاری جدایی ناپذیر از اتصالات چسبنده مبتنی بر کادهرین، و عامل اصلی هسته‌ای سیگنال‌دهی Wnt درون سلولی است (۲٦). عدم تعادل در خواص ساختاری و سیگنال‌دهی بتا کاتنین اغلب منجر به سرطان و متاستاز می‌شود (۱۸).همچنین بتا-کاتنین یک پروتئین با عملکرد دوگانه است که در تنظیم و هماهنگی چسبندگی سلول به سلول و همچنین رونویسی ژن‌ها نقش دارد و در انسان توسط ژن CTNNB1 کد می‌شود(۳۲). بتا کاتنین برای اولین بار به دلیل نقشش در اتصالات چسبنده مبتنی بر کادهرین که ارتباطات سلول-سلول را تشکیل می‌دهد، شناخته شد (۲۸). بتا-کاتنین ۹۰ کیلودالتون است که در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی به رشد سلولی کمک می‌کند. بتا-کاتنین حاوی ۱۲ تکرار آرمادیلو است که به APC و Axin متصل می‌شود (۲۵). فسفوریلاسیون بتا-کاتنین متصل به اکسین توسط CK-1 و GSK-3، آن را برای یوبی کوئیتیناسیون و تخریب پروتئازومی نشان گذاری میکند (۱۱). بتا-کاتنین نقش مستقلی در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های هدف Wnt دارد و یک عامل رونویسی مهم در سیگنال‌دهی Wingless-Int است و نقش مهمی در تجدید سلول‌های بنیادی و بازسازی اندام ها ایفا می‌کند. در بسیاری از سرطان‌ها، جهش اجزای مسیر Wnt منجر به فعال شدن انکوژن‌ها توسط کمپلکس فاکتور رونویسی TCF-β-catenin می‌شود (۱۹). سیگنال‌دهی با واسطه بتا-کاتنین، که فرآیندهای رشد را تنظیم می‌کند، ممکن است به عنوان یک ارتباط بالقوه بین التهاب و سرطان عمل کند (٦، ٤۰). پروتئین بتا-کاتنین جزء ضروری

اتصالات بین سلولی و مسیر سیگنال دهی فاکتور رشد Wnt است (۱۰). Wntها گلیکوپروتئین‌های ترشح-شونده‌ای هستند که نقش مهمی در تنظیم سرنوشت سلولی، تکثیر و تمایز در طول رشد را در بافت‌های مختلف بالغ دارند (۳). حداقل دو مخزن مجزا از بتا-کاتنین در سلول‌ها وجود دارد: ۱- مخزن مرتبط با غشای پلاسمایی بتا-کاتنین-E-کادهرین و ۲- مخزن سیتوپلاسمی/هسته‌ای مرتبط با بتا کاتنین در سیگنال-دهی Wnt. مخزن دوم تا حدی توسط یک مجتمع چند پروتئینی متشکل از سرکوبگر تومور پلیپوز کلی آدنوماتوز (APC)، اکسین و پروتئین‌های گلیکوژن سنتاز کیناز β۳ تنظیم می‌شود (۲۳). بتا-کاتنین می‌تواند بین سیتوپلاسم و هسته حرکت کند. یک پروتئین هسته‌ای کلاسیک حاوی یک توالی محلی سازی هسته‌ای (NLS) است که به شدت به پروتئین منافذ هسته‌ای، ایمپورتین/کاریوفرین متصل می‌شود. با کمک Ran GTPase، محموله از درون پوشش هسته-ای جابجا شده و در هسته آزاد می‌شود. با این حال، بتا-کاتنین، NLS ندارد. مشخص شده است که بتا-کاتنین می‌تواند به روشی مستقل وارد هسته شود. از آنجایی که بتا-کاتنین و ایمپورتین دامنه‌های تکرار آرمادیلو مشابهی دارند، بتا-کاتنین ممکن است مستقیماً با اجزای منافذ هسته‌ای تعامل داشته باشد و پروتئین‌های ایمپورتین/کاریوفرین را دور بزند (۳۸).

انتقال اپیتلیال- مزانشیمی (EMT) یک فرآیند رشدی مهم که با تغییر در چسبندگی سلول به سلول تعدیل می‌شود. در طول EMT، سلول‌های اپیتلیال نسبتاً بی-حرکت قطبی شده مورفولوژی خود را به سلول‌های مزانشیمی فیبروبلاستوئید بسیار متحرک تغییر می‌دهند. EMT نقش مهمی را در طی رشد جنین ایفا می‌کند همچنین باعث تهاجم سرطان و تشکیل متاستازها می‌شود (۲۹). یکی از مشخصه‌های EMT ناپدید شدن E-cadherin از غشای سلولی و جایگزینی آن با N-cadherin است. کاهش E-cadherin اغلب با افزایش سطح سیتوپلاسمی آزاد بتا-کاتنین مرتبط است، که در صورت فرار از تخریب سیتوپلاسمی می‌تواند منجر به افزایش رونویسی بتا-کاتنین (۲۰). در فرایندهای مرتبط با پیشرفت سرطان، فعال‌سازی جهش‌های بتا-کاتنین می‌تواند رونویسی را افزایش دهد، که این امر ممکن است پیامدهایی برای پیشرفت EMT داشته باشد. بسیاری از عوامل و مولکول‌های دیگر مؤثر بر EMT یا چسبندگی سلولی هستند که توسط سیگنال‌دهی Wnt/β-catenin تنظیم می‌شوند و برعکس، نقص در چسبندگی اپیتلیال پلاریزه می‌تواند بر خروجی رونویسی سیگنال‌دهی Wnt/β-catenin تأثیر بگذارد (۲۵). درمان هدفمند بیماران ESCC نه تنها هزینه‌های ناشی از شیمی‌درمانی و رادیوتراپی بی-هدف را کاهش می دهد بلکه به نحو قابل توجهی اثرات جانبی ناشی از این روش‌های درمانی در بیماران را نیز می کاهد. هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر EZH2 بر میزان بیان بتا-کاتنین به دنبال خاموش‌سازی ژن EZH2 در رده سلولی کارسینومای سنگفرشی مری YM-1 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای ترانسفورمیشن وکتور خاموش‌سازی EZH2 و وکتور GFP از باکتری E. Coli TOP10 استفاده شد. یک تک کلنی از پلیت آگار جامد توسط لوپ حرارت دیده از سطح پلیت برداشته شد و در لوله‌ی استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB در کنار شعله اضافه گردید، سپس لوله در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد شیکردار قرار داده شد تا بعد از حدود ۱۵ ساعت رشد باکتری به فاز لگاریتمی رسیده و آماده ترانسفورماسیون شود.

آماده‌سازی سلول‌های شایسته به روش شیمیایی: باکتری استوک بدون تلقیح وکتور در محیط حاوی

آنتی‌بیوتیک توانایی رشد ندارد. به این منظور وکتور حاوی ژن مورد نظر که دارای ژن مقاومت آنتی‌بیوتیک می‌باشد به روش شوک حرارتی وارد باکتری شد تا باکتری نوترکیب حاوی وکتور شناسایی شود. باکتری نوترکیب به آنتی‌بیوتیک مقاوم شده و بر روی پلیت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک، کلنی‌های نوترکیب تشکیل دادند. پس از کشت باکتری ابتدا غلظت باکتری با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد تا مطمئن شویم باکتری در فاز لگاریتمی رشد خود قرار دارد (OD=600 nm). میزان ۱۳۰۰ ماکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری در کنار شعله به یک میکروتیوپ استریل ۱/۵ منتقل شده و به مدت ۳ دقیقه در سرعت rpm۹۰۰۰ سانتریفوز شد. مایع رویی را خارج کرده و رسوب در ۱۰۰۰ ماکرولیتر محلول کلرید کلسیم خنک ٤ درجه سانتیگراد کاملا حل شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه میکروتیوپ بر روی یخ انکوبه شد. مجددا به مدت ۳ دقیقه در سرعت rpm۹۰۰۰ سانتریفوز شد. مجددا مایع رویی را دور ریخته و رسوب در ٦۰۰ ماکرولیتر محلول کلرید کلسیم حل گردید و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ باقی ماند. میکروتیوپ حاوی سلول‌های مستعد در دور ۹۰۰۰ rpmبه مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. اینبار پس از خارج نمودن محلول رویی رسوب باکتری در ۳۰۰ ماکرولیتر محلول کلرید کلسیم حل شد و ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد (در این مرحله باکتری‌ها مستعد شده را می‌توان به مدت ۳ روز در یخچال ٤ درجه سانتیگراد نگهداری کرد). مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون حاوی سلول‌های مستعد را به یک میکروتیوپ جدید منتقل نمودیم و سپس به میزان ۱ ماکرولیتر از وکتور اضافه کردیم سپس به مدت ۳۰ دقیقه میکروتیوپ را روی یخ انکوبه کردیم.

ترانسفورمیشن شوک حرارتی وکتور به درون سلول‌های مستعد *E. Coli*: میکروتیوپ به بن ماری ٤۲ درجه سانتیگراد منتقل و ۹۰ ثانیه انکوبه شد. سپس بلافاصله بدون تکان شدید میکروتیوپ روی یخ ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. در این مرحله به میزان ۹۰۰ ماکرولیتر از محیط کشت مایع براث فاقد آنتی‌بیوتیک به محتویات میکروتیوپ افزوده و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا باکتری‌های حاوی وکتور نوترکیب در محیط مساعد رشد قرار گیرند. پس از خارج کردن باکتری‌های نوترکیب از انکوباتور میکروتیوپ به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد تا باکتری‌های نوترکیب رسوب کنند. به میزان ۷۰۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت رویی به آرامی خارج و رسوب باکتری به خوبی در ۳۰۰ ماکرولیتر باقی مانده حل شد. مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی بر روی پلیت بدون آنتی-بیوتیک آگار جامد و مقدار ۲۰۰ ماکرولیتر روی یک پلیت آگار حاوی آمپی‌سیلین افزوده و به خوبی به کمک یک لوپ استریل حرارت دیده در کنار شعله کشت چمنی داده شد. به مدت یک شبانه روز پلیت-های کشت داده شده به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شدند. برای انتخاب کلونی نوترکیب، بعد از گذشت ۲٤ ساعت انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد کاملا کلنی‌ها رشد کرده بودند و تک کلنی‌های درشت و کره‌ای ابتدا انتخاب شده و توسط یک شناساگر پشت پلیت علامت‌گذاری شدند. سپس هر تک کلنی به یک لوله حاوی محیط کشت براث (به میزان ۵ میلی‌لیتر که حاوی آنتی‌بیوتیک) با یک لوپ استریل حرارت دیده منتقل شد و به مدت ۱۵ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه شیکردار قرار داده شد.

استخراج پلاسمید از باکتری توسط کیت Thermo: مقدار ۱۰۰۰ ماکرولیتر از محلول باکتری را به یک میکروتیوپ ۱/۵ منتقل کرده و به مدت ۱ دقیقه با سرعت rpm8000 سانتریفیوژ نمودیم .سوپرناتانت

رویی را خارج نمودیم و رسوب باکتری در ۲۵۰ ماکرولیتر محلول رسوسپانسیون کیت Resuspension solution حل شد. سپس مقدار ۲۵۰ ماکرولیتر محلول لیزکننده‌ی کیت Lysis solution افزوده و چند بار به آرامی سرو ته شد. بلافاصله مقدار ۳۵۰ ماکرولیتر محلول نوترالایز کیت Neutralization solution افزوده و به مدت ٦ دقیقه با سرعت rpm13400 دور سانتریفوژ شد. ستون‌های کیت را داخل میکروتیوپ‌های کیت قرار دادیم و محلول رویی را خیلی آهسته خارج نمودیم و برروی ستون منتقل کردیم.سپس ستون‌ها با دور rpm13400 به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شدند. ستون را خارج کردیم و محلول عبور کرده از ستون را دور ریختیم سپس محلول شتشو کیت Wash solution به میزان ۵۰۰ ماکرولیتر روی ستون افزوده و با دور rpm 13400و به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد. مجددا مرحله شتشو تکرار گردید تا تمامی آلودگی‌های پروتئینی حذف شوند. سپس ستون به میکروتیوب ۱/۵ انتقال داده شد و به مقدار ٤۰ ماکرولیتر محلول الوت کننده کیت Elution buffer افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس سانتریفوژ با سرعت rpm13400 به مدت ۳ دقیقه انجام داده شد. برای حصول به غلظت بالاتر وکتور مجددا محلول زیری روی ستون ریخته و مرحله‌ی فوق تکرار شد.

سکانس پلاسمید برای تایید مراحل کلونینگ: برای تایید کلونینگ و استخراج پلاسمید ابتدا دو پرایمر برای منطقه ورود بروی وکتور را طراحی نمودیم و سپس به میزان ۲۵ ماکرولیتر با غلظت ۲۰۰ نانو گرم از محصول استخراج پلاسمید خود را به شرکت تکاپو زیست ارسال کردیم و نتایج حاصل از سکانسینگ را توسط نرم افزار CLC main workbench 8 بلاست نمودیم و نتایج کار تایید گردید. همچنین پلاسمید استخراج شده را روی ژل آگارز ۰/۸ درصد التروفورز نمودیم تا دقیقا سایز باند حاصل از پلاسمید را بررسی نماییم، تعیین غلظت پلاسمید توسط دستگاه نانودارپ نیز انجام شد.

خاموش‌سازی ژن EZH2 توسط وکتور sh-RNA PSIREN EZH2در رده سلولی YM-۱ مری: از رده‌ی سلولی YM-1 استفاده شد. رده‌ی سلولی YM-1 از دانشکده‌ی علوم پزشکی گلستان تهیه گردید که مربوط به یک خانم ۵۰ ساله ایرانی بوده و در دانشکده‌ی پزشکی گرگان رده‌سازی و ثبت جهانی گردید. محیط کشت سلولی محیطی می‌باشد که سلول بتواند در آن به رشد، تکثیر و بقای خود ادامه دهد. محیط‌های کشت متفاوتی تاکنون ساخته شده است. محیط کشت، شامل انواع اسیدهای آمینه ضروری (در محیط کشت‌های ساده مانند MEM و یا تکمیلی در محیط کشت‌های پیچیده مانند RPMI-1640 و -DMEM، ویتامین‌ها، مواد معدنی و نوکلئوزیدها می‌باشد. هر نوع سلولی نوع محیط کشت اختصاصی خود را نیاز دارد به عنوان مثال در پژوهش فوق رده‌ی سلولی YM-1 به محیط کشت اختصاصی DMEM برای رشد خود نیاز دارند. در وهله‌ی اول برای کشت سلولی حتما باید زیر هودلامینار کلاس ۲ و یا بالاتر و در شرایط کاملا استریل فعایت نمود. محیط کشت مورد استفاده جهت کشت رده‌ی سلولیYM-1 ،محیط کشت -DMEM/ حاوی ۱۰ FBS درصد می‌باشد. به این صورت که برای آماده‌سازی محیط کشت در حجم ۵۰ میلی‌لیتر، ابتدا به میزان ٤۵ میلی-لیتر از محیط DMEM را در یک فالکون استریل ۵۰ ریخته سپس ٤/۵ میلی لیتر از سرم FBS را افزوده و نهایتا ۵۰۰ ماکرولیتر از آنتی‌بیوتیک ترکیبی پنی‌سیلین (۲۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۲۰ واحد در میلی‌لیتر)، به منظور پیشگیری از آلودگی قارچی-باکتریایی اضافه شد.

ترنسفکشن رده سرطانی سلولی مری بنیادین سرطانی توسط کیت X-treme GENE HP DNA: ROCHE بدین منظور نیاز به وکتور بیانی کدکننده‌ی خاموش‌سازی EZH2 بود تا پس از ترانسفکشن آن میزان بیان EZH2 در سلول‌های سرطانی مری کاهش یابد. بدین منظور از وکتور خاموش‌سازی PSIREN EZH2 استفاده شد. ابتدا شیشه حاوی محلول ترانسفکشن به دمای اتاق رسید و حدود ۱۵ ثانیه ورتکس انجام شد. توسط جدول پروتکل کیت مقدار غلظت نانوگرم لازم از DNA پلاسمید محاسبه شد. حجم محاسبه شده از وکتور با OPTIMEM به خوبی مخلوط و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مقدار متناسب از محلول کیت دقیقا در مرکز میکروتیوپ بدون کوچکترین تماسی با دیواره پلاستیکی میکروتیوب وارد و به آرامی پیپتاژ گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در فضای تاریک و دمای اتاق میکروتیوپ انکوبه شد. محتویات میکروتیوپ قطره قطره به سلول‌های مورد نظر افزوده شد. باید توجه داشت در این مرحله وجود FBS و آنتی‌بیوتیک مانع از ترانسفکشن با کارایی بالا می‌گردد به همین منظور حدود ٦ الی ۸ ساعت بعد FBS افزوده شد. پس از گذشت ۲ روز از ترانسفکشن وکتور حامل GFP توسط میکروسکوپ فلورسنت کارایی ترانسفکشن بررسی گردید.

تست آنالیز بیان ژن توسط Real-time PCR: ابتدا توالی ژن‌های مورد نظر از NCBI، Gene Bank Ensemble استخراج و سپس برای طراحی پرایمرها برای ژن EZH2 و ژن‌های سلول‌های بنیادی سرطانی هدف، کنترل داخلی GAPDH از نرم افزار Allele ID6 استفاده شد. پرایمرهای طراحی شده همگی دارای شرایط بهینه از نظر محتوای GC در حد ۵۰ ای ٦۰ درصد بوده و دمای Melting Temperature پرایمرهای F و R به یکدیگر نزدیک بود. برای بلاست پرایمرها از سایت مرجع NCBI استفاده و پس تایید نهایی به شرکت پیشگام سفارش سنتز پرایمر داده شد. توالی پرایمرهای این مطالعه در جدول ۱ مشاهده می‌شود.سنجش بیان ژن توسط تست Real-time PCR برای ژن EZH2 و ژن بتا-کاتنین به صورت دوتایی انجام گردید. حجم نهایی هر استریپ در این تست ۲۰ ماکرولیتر بوده و از (SYBR Green Master Mix TAKARA) استفاده گردید. ژن GAPDH را به عنوان نرمالایزر و سلول‌های ترانسفکت شده توسط وکتور GFPرا به عنوان سلول نرمال (کنترل) برای سنجش بیان ژن‌ها استفاده نمودیم .برای انجام تست Real-time PCR از دستگاه LightCycler® 96 Instrumen Roche استفاده شد. آنالیز داده‌های Real-time PCR به‌صورت fold change محاسبه شد. میزان معناداری کاهش بیان و یا افزایش بیان کمتر از ۲- و بیش از +۲ در نظر گرفته شد و بین -۲ تا +۲ به عنوان عدم تغییر بیان ژن محسوب گردید.

بررسی مهاجرت سلول‌ها تحت تاثیر بیان EZH2: برای دستیابی به این هدف از تست خراش سلولی (Scratch Assay) استفاده نمودیم. طبق این تست پس انجام ترانسفکشن سلولی ابتدا سلول‌ها را تریپسینه کرده و شمارش کردیم، تعداد یک میلیون سلول را در هر چاهک از ظرف(پلیت) ٦ خانه که توسط محیط کشت اختصاصی فاقد FBS مربوط به هر سلول پر شده بود کشت دادیم. سپس ۲٤ ساعت سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و کاملا به کف ظرف متصل شدند. سپس توسط یک سرسمپلر زرد به صورت یه خط صاف کف ظرف خراش داده و عکسبرداری از سلول‌ها انجام گرفت. بعد از گذشت ۲٤ و ٤۸ ساعت نیز از سلول‌ها عکس گرفته شد و میزان مهاجرت سلولی محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری میزان مهاجرت سلولی از نرم‌افزار Image J v 4. 21 استفاده شد.

نتایج

هر دو وکتور خاموش‌سازی EZH2 و GFP با روش شوک حرارتی –Cacl2 ترانسفورم کرده روی پلیت آگار برده شد و تک کلنی‌های حاصل مجددا در محیط کشت مایع LB برده و نهایتا استخراج پلاسمید انجام شد. پس از اینکه باکتری‌ها در محیط کشت مایع رشد کردند و به فاز لگاریتمی رسیدند. استخراج پلاسمید انجام شد و روی ژل آگارز برده شد که نتایج در شکل ۱ گزارش گردید. همچنین برای تایید نهایی وکتور استخراج شده خاموش‌سازی EZH2 برای تعیین توالی مورد بررسی قرار داده شد. در انتها غلظت وکتورها برای محاسبه در ترانسفکشن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (نانودراپ) اندازه‌گیری گردید.

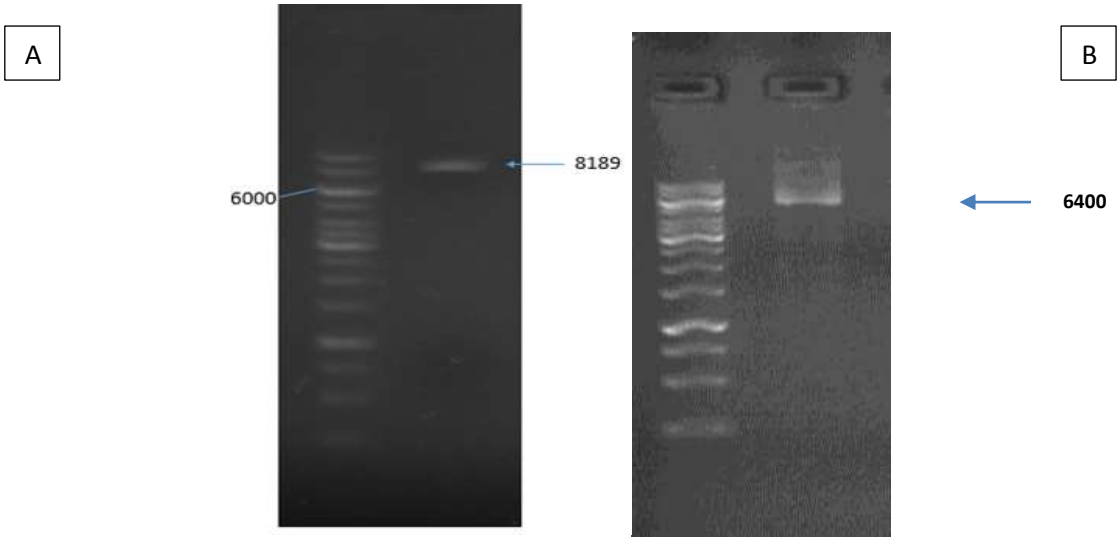
ترنسفکشن GFP در رده سلولی YM-۱: برای بررسی ابتدایی موفق بودن شرایط ترانسفکشن از وکتور GFP استفاده شد. پس از ۲٤ الی ٤۸ ساعت توسط میکروسکوپ فلورسنت به رصد سلول‌های بیان‌کننده‌ی GFP پرداخته شد. به منظور تایید وکتورهای حاوی EZH2 برای ژن EZH2 از تست Real Time PCR استفاده شد. شکل ۲ ترانسفکشن GFP را نشان می‌دهد. درصد سلول‌های بیان کننده GFP بعد از ٤۸ ساعت بیشتر شده و همچنین میزان بیان GFP که با شدت نور سبز مشخص می‌باشد نیز بعد از ٤۸ ساعت افزایش یافت. با استناد به همین موضوع سلول‌های ترانسفکت شده بعد از ٤۸ ساعت تریپسینه و برای استخراج RNA اقدام شد.

استخراج RNA: به جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده نمونه‌های سلولی استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد ران گردید تا پس از مشاهده‌ی باندهای 18s و 28s کیفیت RNAهای استخراجی تایید و برای سنتز CDNA و تست Real Time PCR اقدام شود.

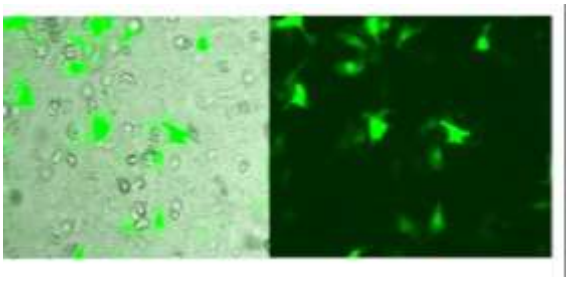
بیان ژن EZH2: در اولین گام باید میزان بیان ژن EZH2 در سلول‌های YM-1 ترانسفکت شده تایید - شود. به این منظور ابتدا Real Time PCR برای ژن EZH2 در سلول‌های ترانسفکت شده بررسی شدند. سلول‌های ترانسفکت شده توسط وکتور GFP به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سلول‌هایی که با وکتور خاموش‌سازی EZH2 ترانسفکت شده بودند کاهش بیان ژن EZH2 را به میزان ۹.۵۱- Log2 Fold Change به در سلول YM-1 نشان دادند.

اثر بیان خاموش‌سازی EZH2 بر بیان بتا-کاتنین: نتایج حاصل از تست Real Time PCR در شکل ٤ نشان داده شده است.

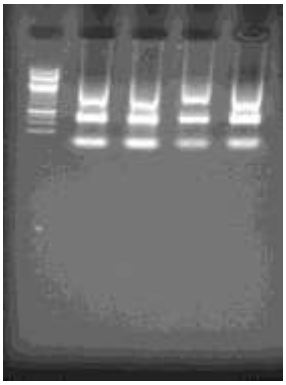
مهاجرت سلولی توسط تستScratch assay: سرعت رشد و مهاجرت سلول‌های ترنسفکت شده با EZH2خاموش‌سازی نسبت به سلول‌های کنترل، رشد بسیار آهسته‌تری داشتند (شکل‌های ۵ و ٦).



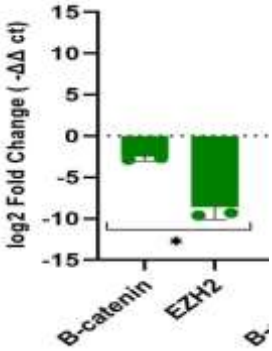
شکل ۱- نتایج حاصل از ران وکتورها بر ژل آگارز. A: وکتور GFP با طول ۸۱۸۹ جفت باز. B: وکتور خاموش‌سازیEZH2 با ٦٤٠٠ جفت باز



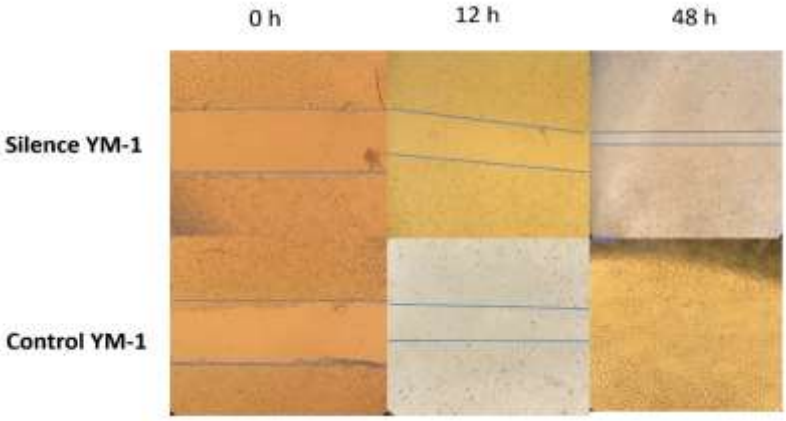
شکل ۲- رده‌ی سلولی YM-1پس از ترانسفکشن با وکتورGFP پس از گذشت ٤٨ ساعت



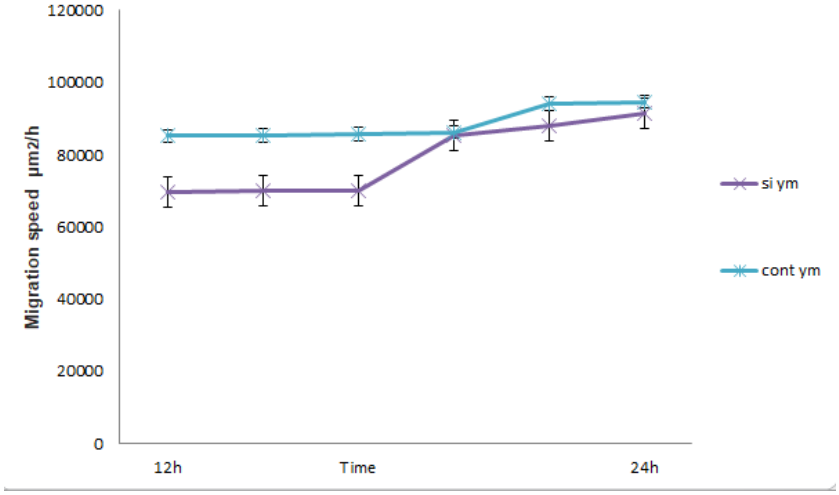
شکل ۳- نتایج حاصل از استخراج RNA دو وکتورGFP و خاموش‌سازیEZH2 می‌باشد. RNA استخراج شده پس از الکتروفورز باند های s ۱۸و s ۲۸در هر نمونه استخراج شده مشهود می‌باشد



شکل ٤- بیان نسبی ژن EZH2 در سلول YM-1 ترانسفکت شده با وکتور بیانی خاموش‌سازی. در تصویر بررسی بیان ژن EZH2 پس از گذشت ٤٨ ساعت از ترانسفکشن به نسبت سلول‌های کنترل ترانسفکت شده با وکتور GFP مشاهده می‌گردد.



شکل ٥- تست مهاجرت سلولی سلول‌های سرطانی مری تحت اثر القاء وکتور خاموش‌کننده ژن EZH2 در مقایسه با سلول‌های کنترل. در رده‌ی با EZH2 کاهش یافته، مهاجرت سلولی نسبت به سلول‌های کنترل طی ١٢ و ٤٨ ساعت کاهش چشمگیری از خود نشان دادند.



شکل ٦- سرعت مهاجرت سلولی مربوط به سلول‌های سرطانی مری تحت اثر القاء وکتور خاموش‌کننده‌ی ژن EZH۲ شده در مقایسه با سلول‌های کنترل. همانطور که در تصویر مشهود می‌باشد کمترین ترخ سرعت رشد مربوط به سلول‌های YM-1 تحت خاموش‌سازی ژن EZH2 می‌باشد.

بحث

در دنیای امروز، سرطان مری به یک تومور بدخیم شایع تبدیل شده است که نقش قابل توجهی در مرگ و میر ناشی از سرطان ایفا می‌کند. متاسفانه، شیوع سرطان مری به طور پیوسته در حال افزایش است و اکثر بیماران ESCC در مراحل پیشرفته یا دیررس تشخیص داده می‌شوند و علاوه بر درمان جراحی کاندیدای شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و درمان‌های کمکی نیز هستند (۱۷). تحقیقات اخیر نشان داده است که ۲۱ تا ۳۹ درصد از بیماران سلول‌های سنگفرشی کارسینومای مری پس از درمان کامل همچنان دچار عود مجدد می‌شوند (۱۳، ۲۲، ۲۷). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که ژن‌های EZH2 و بتا-کاتنین با تهاجم، متاستاز در بسیاری از سرطان‌ها مرتبط می‌باشند (۱). شناسایی مارکرهای جدید درمانی سرطانی مری می‌تواند بینش جدیدی در درمان بیماران ESCC ارائه دهد. ژن‌های خانواده‌ی پلی‌کامپ کدکننده‌ی تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی هستند که تغییرات خاص پس از ترجمه هیستون را کاتالیز می‌کنند. EZH2 تکثیر و تمایز ماهیچه‌های اسکلتی خونساز و سلول‌های بنیادی مغز را نیز انجام می‌دهد (۳۱). اکثر مطالعات عملکرد EZH2 را به عنوان یک سرکوب‌کننده رونویسی در سرطان بررسی کردند. اما EZH2، عملکرد مهمی در تکثیر و نگهداری سلول‌های سرطانی نیز دارد. EZH2 موجب افزایش مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر شیمی و رادیو درمانی می‌شود. EZH2 به عنوان یک نشانگر سلول‌های سرطانی عمل می‌کند. بیان ژن EZH2 در سلول‌های سرطانی در طیفی از تومورهای بدخیم، از جمله ملانوما، سرطان سینه، سرطان تخمدان، سرطان پانکراس، سرطان پوست، سرطان روده بزرگ و سرطان خون افزایش می‌یابد. همچنین، EZH2 علاوه بر مقاومت در برابر شیمی درمانی و رادیوتراپی برای خودنوسازی CSC و تومورزایی نیز ضروری می‌باشد (۷). در این پژوهش سلول‌های سرطانی مری را تحت خاموش سازی ژن EZH2 بررسی نمودیم که می‌تواند پتانسیل درمان سرطان مری بصورت چشمگیری افزایش دهد و برای اولین بار نشان دادیم که به عنوان یک ژن تنظیم‌کننده‌ی ژن بتا-کاتنین در سرطان مری می‌باشد. جهش و بیان بیش از حد بتا-کاتنین با بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان کبد، سرطان روده بزرگ، سرطان ریه، تومورهای بدخیم پستان، سرطان تخمدان و آندومتر مرتبط است. کاهش بیان بتا کاتنین باعث کاهش چسبندگی سلولی سلول‌های بدخیم شود و به رفتار بدخیم سلول‌های تومور کمک کند (۴۰). فعال‌سازی بتا-کاتنین ژن‌های مرتبط با اتصال سلولی را کاهش می‌دهد و باعث انتقال اپیتلیال به مزانشیمی در سرطان‌های کولورکتال می‌شود (۳۳). EMT شامل تضعیف اتصالات سلول-سلول مبتنی بر کادرین هموتیپ بین سلولی و لنگرگاه کادهرین-کاتنین به اسکلت سلولی است، در حالی که باعث القای بیان مولکول‌های چسبندگی می‌شود که چسبندگی ضعیف تر و هتروتیپی را منتقل می‌کنند. این ویژگی‌ها توانایی سلول‌های سرطانی را برای جدا شدن از بافت اولیه، اتصال به اجزای ECM و سایر سلول‌ها (به عنوان مثال، فیبروبلاست‌ها) و مهاجرت به سمت سیستم‌های لنفاوی و خونی افزایش می‌دهد. سلول‌های تومور مهاجم علاوه بر نمایش خواص مشابه EMT، ویژگی‌هایی را که در سلول‌های بنیادی طبیعی دیده می‌شود نشان می‌دهند و بنابراین به عنوان سلول‌های بنیادی سرطانی توصیف می‌شوند (٤). افزایش بیان EZH2 موجب افزایش تمایل کمپلکس PRC2 به پروتئین HERES شده که خود موجب فعال‌سازی مسیر Wnt و افزایش بیان بتا کاتنین می‌شود (۳۹). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد

EZH2 توانایی کنترل بیان بتا-کاتنین را دارا می‌باشد. در واقع بیان بتاکاتنین تحت القای کاهشی ژن EZH2 بررسی شد که ارتباط تنظیمی مثبت را با ژن EZH2 نشان داد. یعنی با کاهش بیان EZH2 ژن بتاکاتنین کاهش بیان از خود نشان داد. احتمالا EZH2 از طریق مسیرهای سیگنال‌دهی و یا حد واسط‌های مولکولی بیان بتا-کاتنین را تنظیم می‌کند. همچنین ژن بتاکاتنین از جمله ژن‌های مهم مسیر WNT/BCAT می‌باشد. بررسی سایر ژن‌های این مسیر نیازمند بررسی در تحقیقات آتی خواهد بود. مطالعات پیشین نشان دادند که بیان غیر طبیعی EZH2 در ۱۶/۹ درصد از تومورهای ESCC مشاهده شد واین بیان افزایش یافته‌ی EZH2 با ویژگی‌های بالینی آسیب شناختی مانند اندازه، متاستاز و میزان بقا در بیماران ESCC همراه بود (۱۲). کاهش بیان EZH2 احتمالا با کاهش متاستاز نیز مرتبط می‌باشد. در تایید این موضوع تست مهاجرت سلولی نیز بیانگر کاهش مهاجرت و رشد سلولی در سلول‌های با EZH2 خاموش یافته بود. بنابراین با القا کاهش بیان EZH2 احتمال متاستاز در بیماران درگیر با سرطان ESCC قابل کنترل و مهار خواهد بود که همین امر از بدخیمی و کشندگی این بیماری می‌کاهد.

نتیجه‌گیری

در مجموع ژن EZH2 هم در تومورزایی، متاستاز، مقاومت به شیمی درمانی تهاجم سلول‌های سرطانی نقش بسیار مهمی را ایفا نموده. تمامی بررسی‌های بالینی حاکی از آن هستند که مشکلات اساسی بیماران ESCC در وهله ی اول متاستاز بوده و در وهله‌ی دوم عود مجدد تومور می‌باشد که تمامی این مشکلات تحت پوشش درمان با EZH2 حل شده و امید به درمان در بیماران کارسیونومای سلول‌های سنگفرشی مری را افزایش می‌دهد. در واقع درمان بر پایه‌ی ژن EZH2 به صورت موثری هم شناسایی تومور در مراحل اولیه و هم بازده درمان سرطان ESCC را افزایش می‌دهد.

منابع

1. Abbaszadegan M.R. Bagheri V., Razavi M.S., Momtazi A.A., Sahebkar A., Gholamin M. 2017. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 232(8):2008-2018.

2. Abnet C.C., Arnold M., Wei, W.Q. 2018. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 154:360-373.

3. Azbazdar Y., Karabicici M. 2021. Regulation of Wnt signaling pathways at the plasma membrane and their misregulation in cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:631623.

4. Balzer E.M., Konstantopoulos K., 2012. Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4(2):171-181.

5. Baskaran N.U., Rajendiran A.M.S. 2020. 506 to study the clinical impact and prognostic value of tumor infiltrating Lymphocyts in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus*, 33(1):1-4.

6. Bertrade C., Mbom W., Nelson J., 2013. β-catenin: A multi-functional protein's role at the centrosome and implications for a broader role in cell division. *Bioessays*, 35(9):804–809.

7. Bu J., Gu L., Liu X., Nan X., Zhang X., Meng L., Zheng Y., Liu F., Li J., Li Z., Sang M., Shan B. 2022. The circRNA circADAMTS6 promotes progression of ESCC and correlates with prognosis. *Scientific Reports*, 12(1):13757.

8. Fiera Costa E., Delgado Roel M, Paradela de la Morena M. 2019. *Atlas of Uniportal Video Assisted Thoracic Surgery*, pp: 109-114.

9. Ganji A., Esmaeilzadeh A., Hatef M. 2012. Prevalence of osteopenia and osteoporosis in patients with celiac disease in northeastern Iran. *Govaresh*, 16:223-227.

10. Gopalkrishna Pai S., Carneiro B.A., 2017. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology and Oncology*, 10:101

11. Hagen T., Vidal-Puig A. 2002. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2):324-328.

12. He L., Liu M.Z. 2010. High expression of EZH2 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma treated with definitive chemoradiotherapy. *International Journal of Cancer*, 127(1):138-47.

13. Jipping K.M., Hulshoff J.B., van Amerongen E.A., Bright T.I., Watson D.I., Plukker J.T.M. 2017. Influence of tumor response and treatment schedule on the distribution of tumor recurrence in esophageal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Journal of Surgical Oncology*, 116(8):1096-1102.

14. Kim E., Kim M., Woo D.H., Shin Y., Shin J., Chang N., Oh Y.T., Kim H., Rheey J., Nakano I., Lee C., Joo K.M., Rich J.N., Nam D.H., Lee J. 2013. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell*, 23(6):839-852.

15. Kim K.H., Roberts C.W. 2016. Targeting EZH2 in cancer. *Nature Medicine*, 22(2):128-134.

16. Kim W.K., Kwon Y., Jang M., Park M., Kim J., Cho S., Jang D.G., Lee W.B., Jung S.H., Choi H.J., Min B.S., Il Kim T., Hong S.P., Paik Y.K., Kim H. 2019. β-catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers. *Scientific Reports*, 9(1):18440.

17. Liu B., Wang C., Chen P., Cheng B., Cheng, Y. 2018. RACKI induces chemotherapy resistance in esophageal carcinoma by upregulating the PI3K/AKT pathway and Bcl-2 expression. *Onco Targets and Therapy*, 11:211-220.

18. Liu J., Xiao Q., Xiao J., Niu C., Li Y., Zhang X., Zhou Z., Shu G., Yin G. 2022. Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Target Therapy*, 7(1):3.

19. Loh C.Y., Yi Chai J. 2019. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells*, 8(10):1118.

20. Mahara S., Lee P.L., Feng M., Tergaonkar V., Chng W.J., Yu Q. 2016. HIFI-α activation underlies a functional switch in the paradoxical role of Ezh2/PRC2 in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26):E3735-E3744.

21. Meguid R.A., Hooker C.M., Taylor J.T., Kleinberg L.R., Cattaneo S.M., Sussman M.S., Yang S.C., Heitmiller R.F., Forastiere A.A., Brock MV. 2009. Recurrence after neoadjuvant chemoradiation and surgery for esophageal cancer: does the pattern of recurrence differ for patients with complete response and those with partial or no response. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 138(6):1309-1317.

22. Orsulic S., Huber O., Aberle H., Arnold S., Kemler R. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *Journal of Cell Sciences*, 112(Pt 8):1237-1245.

23. Sadjadi A., Marjani H., Semnani S., Naseri-Moghaddam S. 2010. Esophageal cancer in Iran: A review. *Middle East Journal of Cancer*, 1(1):5-14

24. Shang S., Hua F. 2017. The regulation of β-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*, 8(20):33972-33989.

25. Valenta T., Hausmann G. 2012. The many faces and functions of β-catenin. *EMBO Journal*, 31(12): 2714-2736.

26. Vallböhmer D., Hölscher A.H., DeMeester S., DeMeester T., Salo J., Peters J., Lerut T., Swisher S.G., Schröder W., Bollschweiler E., Hofstetter W. 2010. A multicenter study of survival after neoadjuvant radiotherapy/chemotherapy and esophagectomy for ypT0N0M0R0 esophageal cancer. *Annals of surgery*, 252(5):744-749.

27. van der Wal T., van Amerongen R. 2020. Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: a balancing act for β-catenin. *Open Biology*, 10(12): 200267.

28. Wang Y., Zhou B.P., 2011. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*, 30(9):603-611.

29. Wang J., Zhu X., Hu J., He G., Li X., Wu P., Ren X., Wang F., Liao W., Liang L., Ding

Y. 2015. The positive feedback between Snail and DAB2IP regulates EMT, invasion and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget*, 6(29):27427.

30. Wang W., Qin J.J. 2015. Polycomb group (PcG) proteins and human cancers: multifaceted functions and therapeutic implications. *Medicinal Research Reviews*, 35(6):1220-1267.

31. Wang B., Li X., Liu L., Wang M. 2020. β-Catenin: oncogenic role and therapeutic target in cervical cancer. *Biological Research*, 53(1):33.

32. Wen Y., Cai J., Hou Y., Huang Z., Wang Z. 2017. Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target. *Oncotarget*, 8:37974.

33. Xu K., Wu Z.J., Groner A.C., He H.H., Cai C., Lis R.T., Wu X., Stack E.C., Loda M., Liu T., Xu H., Cato L., Thornton J.E., Gregory R.I., Morrissey C., Vessella R.L., Montironi R., Magi-Galluzzi C., Kantoff P.W., Balk S.P., Liu X.S., Brown M. 2012. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb independent. *Science*, 338(6113):1465-1469.

34. Yao Y., Hu H., Yang Y., Zhou G., Shang Z., Yang X., Sun K., Zhan S., Yu Z., Li P., Pan G., Sun L., Zhu X., He S. 2016. Downregulation of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is essential for the induction of autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes*, 7(10):83.

35. Yasuda H., Soejima K., Watanabe H., Kawada I., Nakachi I., Yoda S., Nakayama S., Satomi R., Ikemura S., Terai H., Sato T., Suzuki S., Matsuzaki Y., Naoki K., Ishizaka A. 2010. Distinct epigenetic regulation of tumor suppressor genes in putative cancer stem cells of solid tumors. *International Journal of Oncology*, 37(6):1537-1546.

36. Yi X., Guo J., Guo J., Sun S., Yang P., Wang J., Li Y., Xie L., Cai J., Wang Z. 2017. EZH2-mediated epigenetic silencing of TIMP2 promotes ovarian cancer migration and invasion. *Scientific Reports*, 7(1):3568.

37. Yokoya F., Imamoto N. 1999. β-catenin can be transported into the nucleus in a ran-unassisted manner. *Molecular Biology of the Cell*, 10(4):1119-1131.

38. You B., Yoon J. 2019. HERES a lncRNA that regulates canonical and noncanonical Wnt signaling pathways via interaction with EZH2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(49):24620-24629.

39. Yu F., Yu C., Li F., Zuo Y., Wang Y., Yao L., Wu C., Wang C., Ye L. 2021. Wnt/β-catenin signaling in cancers and targeted therapies. *Signal Transduction and Target Therapy*, 6(1):307.

40. Zhao H., Ming T., Tang S., Ren S., Yang H., Liu M., Tao Q., Xu H. 2022. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular Cancer*, 21(1):144.

Functional evaluation of EZH2 Gene Silencing Effect on β-catenin Marker Expression in YM-1 Cell Line of Esophageal Cancer

Fatemeh Nourmohammadi[1], Mohammad Mahdi Forghanifard[1*], Vajiheh Zarrinpour[1], Mohammad Reza Abbaszadegan[2]

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2- Medical Genetics Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Abstract

Esophageal cancer ranks as the sixth leading cause of cancer-related deaths and the eighth most common cancer worldwide. One of the most characteristic features of this malignancy is its resistance to chemoradiotherapy and its high recurrence rate. β-Catenin is a key molecule associated with metastasis and invasion. *EZH2* gene acts as an epigenetic regulator of gene expression, promoting tumor cell proliferation and maintaining stem cell pluripotency. Aberrant expression of *EZH2* has been reported in various malignant cancers. β-Catenin is known as a structural component of adherens junctions (in association with cadherins) and as the main signaling mediator of the Wnt/β-catenin pathway in the nucleus. Dysregulated *β-catenin* expression frequently contributes to tumorigenesis and metastasis.In this study, an *EZH2* gene-silencing vector was cloned in *Escherichia coli* and subsequently purified. The *EZH2* gene was silenced in YM-1 esophageal cancer cells. After confirming *EZH2* knockdown, RNA extraction and cDNA synthesis were performed, followed by evaluation of *β-catenin* expression using real-time PCR. A cell migration assay was also conducted to assess the invasive potential of the cells after genetic manipulation.The results demonstrated a significant reduction in *β-catenin* expression in the YM-1 cell line following *EZH2* silencing. Furthermore, *EZH2* knockdown significantly decreased the proliferation and migration rates of esophageal cancer cells. Overall, these findings highlight the regulatory role of EZH2 on *β-catenin* gene expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Considering that tumor metastasis is one of the major factors contributing to ESCC malignancy and patient mortality, identifying effective molecular markers involved in cancer stem cell regulation could represent a promising strategy for ESCC treatment.

Keywords: Esophageal squamous cell carcinoma, EZH2, shRNA, β-catenin.