

## أمثلة اختبار لتحديد متيلة جين *TWIST2* بالاعتماد على تقانة MethylScreen

يمان الغميان<sup>1\*</sup> ، شادي سكرية<sup>2</sup> ، حسام مراد<sup>3</sup>

1. طالبة دكتوراه - قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة دمشق.
2. أستاذ مساعد - قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة دمشق.
3. مدير بحوث - قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية.

### الملخص:

يعرف *TWIST2* بأنه عامل انتساخ منظم للحوادث الضرورية للتكون الجنيني وتطور الأورام وتشكل النقائل. حددت الدراسات أن متيلة DNA إحدى التغيرات فوق الوراثة المسؤولة عن تنظيم تعبير الجين *TWIST2*. ويعد تحليل متيلة الحمض النووي بالطرق التقليدية إجراءً مستهلكاً للوقت والجهد.

قمنا في هذه الدراسة بتصميم اختبار وبادئات لدراسة متيلة 14 موقعاً من مواقع CpG في الجين *TWIST2* وذلك بالاعتماد على تقانة MethylScreen. تمت أمثلة شروط تفاعل الكشف واختبار صلاحية هذا الاختبار في الخطوط الخلوية SK-OV-3 و A2780 المشتقة من سرطان المبيض. كما تمت دراسة تغيرات التعبير الجيني في الخليين المدروسين بواسطة qPCR

أشارت نتائجنا إلى أن البادئات المصممة تعطي ناتج تضخيم وحيد وبطول 151bp، وأن درجة حرارة التصاق البادئات المثلى هي 60 °C. كما استطاعت البادئات تضخيم 50ng من DNA بشكل مبكر في تفاعل qPCR. بينت النتائج أيضاً أن الجين *TWIST2* غير ممتيلة في خلايا SK-OV-3، بينما ازدادت نسبة متيلة المنطقة المدروسة في الخلايا A2780 فكانت 3.7% ممتيلة بشكل مفرط و 88.5% متوسطة المتيلة و 7.8% غير ممتيلة. وارتبطت المتيلة في خلايا A2780 بانخفاض التعبير الجيني بمقدار 0.05 ضعف بالمقارنة مع خلايا SK-OV-3.

نستنتج أن الاختبار المصمم لكشف متيلة *TWIST2* قابل للاستخدام في تحديد متيلة الجين الهدف، ويتم الكشف فيه بمدة زمنية قصيرة نسبياً وبمراحل عمل قليلة وبتكلفة أقل بالمقارنة مع الطرق التقليدية.

الكلمات المفتاحية: متيلة DNA، *TWIST2*، تقانة MethylScreen، التضخيم بالزمن الحقيقي، سرطان المبيض.

تاريخ الإيداع: 2022/10/2

تاريخ الموافقة: 2023/1/15



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

## Optimizing a test for *TWIST2* gene methylation detection based on MethylScreen technology

**Yaman Alghamian<sup>1\*</sup>, Chadi Soukkarieah, Hossam Murad**

1.PhD degree Student- Department of Animal Biology-Faculty of Sciences-Damascus University.

2.Associate Prof - Department of Animal Biology-Faculty of Sciences-Damascus University.

3.Research Director- Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic energy Commission of Syria (AECS).

### Abstract:

**TWIST2** is a transcription factor that regulates events essential for embryogenesis, tumor development, and metastasis. Studies have identified DNA methylation as one of the epigenetic changes responsible for *TWIST2* gene expression regulation, so it is important to study *TWIST2* methylation changes in cancer cells. Analyzing DNA methylation by conventional methods is a time and effort consuming procedure.

In this study, we designed an assay and primers to study the methylation of 14 CpG sites in the *TWIST2* gene based on MethylScreen technology. We also optimized the detection reaction conditions and tested the validity of this assay in ovarian cancer SK-OV-3 and A2780 cell lines. Gene expression changes in the two cell lines were also studied by qPCR.

Our results indicated that the designed primers give a single 151 bp amplicon. The optimal annealing temperature of these primers is 60 °C. Tested primers were able to amplify 50ng of DNA in the early qPCR reaction. The results also showed that the *TWIST2* gene was not methylated in SK-OV-3 cells, While the percentage of methylation of the studied region increased in A2780 cells, it was 3.7% hypermethylated, 88.5% intermediately methylated, and 7.8% unmethylated. Increased Methylation in A2780 cells was associated with a 0.05-fold decrease in gene expression when compared to SK-OV-3 cells.

We conclude that the designed test can be used to determine the methylation of the *TWIST2* gene, in a relatively short period of time and at a lower cost compared to the traditional methods.

**Key words:** DNA Methylation, *TWIST2*, Methylscreen Assay, Qpcr, Ovarian Cancer.

Received :2022/10/2

Accepted:2023/1/15



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

## المقدمة:

تعد متيلة DNA (DNA methylation) من أهم الآليات فوق الوراثة التي تنظم العديد من العمليات الحيوية [1]، كتنظيم التعبير الوراثي [2]، وإسكات العناصر الانتقالية (transposable elements) [3]، التبصيم الوراثي (imprinting) [4]، والمحافظة على تشبيط الصبغي X لدى إناث الثدييات (X-inactivation) [5، 6]، والإبقاء على استقرار الجينوم (genome stability) [7]. تحدث متيلة DNA غالباً في المناطق الغنية بتتابع كبير من نكليوتيدات السيتوزين - غوانين (CG-rich regions) والتي تدعى بجزر CpG (CpG islands)، وتتميز منطقة المحضض (promoter regions) في 70% من المورثات بكونها غنية بجزر CpG وتحدد درجة متيلة تلك الجزر الحالة الوظيفية لتلك المورثات ومستوى تعبيرها [8، 9]. يسبب حدوث تغيرات في متيلة DNA إلى تطور العديد من الأمراض كالسرطان، والأمراض المزمنة عند البالغين. يفتح هذا الارتباط الوثيق بين تغيرات المتيلة وتطور السرطان الباب أمام تطوير تقنيات كشف جديدة حساسة وسريعة، قابلة للتطبيق ذات تكلفة مقبولة من أجل استخدامها في كل من الأبحاث فوق الوراثة والتشخيص وتقييم الإنذار. وتُقسم الطرق المستخدمة في تحديد متيلة DNA إلى: طرق قادرة على التحديد الكيفي (qualitative analysis) وطرق قادرة على التحديد الكيفي والكمي معاً (qualitative and quantitative DNA methylation analysis). تستطيع الطرق الكيفية تمييز المحضضات غير الممتيلة عن المحضضات الممتيلة بصرف النظر عن كمية متيلتها. من هذه الطرق طريقة الـ MSP (Methylation Specific PCR) [10] والطرق المشتقة منها (MSP-derived techniques) مثل تحليل الانصهار المعتمد على الـ MSP (melting curve analysis based MSP -MCA-MSP) [11]. أما الطرق الكمية فتستطيع تحديد مقدار متيلة تسلسل معين، مثل طريقة السلسلة بعد المعالجة بمادة البيسلفيت (bisulfite-sequencing)، وطريقة مسح الجينوم باستخدام نقاط علام لمواقع أنزيمات التقييد (restriction landmark genomic scanning, RLGS) [12] وطريقة الـ MS-MLPA (methylation) bisulfite conversion لثمالات السيتوزين غير الممتيلة مثل الـ MSP-methylation-specific PCR و MethyLight وسلسلة البيسلفيت Bisulfite sequencing [10، 14]. ولكن تستغرق عملية تحويل البيسلفيت الكثير من الوقت والمواد ويحدث فيها بعض الأخطاء ناتجة عن فشل التحويل من السيتوزين الغير ممتيل إلى الثايمين [15].

تسمح تقانة MethylScreen عندما تقترن مع PCR كمي بالكشف الحساس والتحديد الكمي لمتيلة جزر CpG في المواقع الجينية [16]. تعتمد تقانة MethylScreen على أنزيمات تقييد حساسة للمتيلة واعتمادية المتيلة واستخدامها في عمليات هضم مفردة ومزدوجة. حيث يساعد إدراج أنزيم التقييد المعتمد على المتيلة (Methylation Dependent Restriction Enzyme- MDRE) في تصميم الاختبار في إلغاء الإيجابيات الكاذبة، وتوفير معلومات إضافية حول كثافة المتيلة الموجودة في المنطقة المدروسة. وتعتبر تقانة MethylScreen طريقة سريعة وفعالة وقابلة للتطبيق في المجالات السريرية عالية الإنتاجية. لا تعتمد هذه التقانة على تحويل البيسلفيت، مما يسمح بإجراء الكشف على كميات قليلة من DNA من رتبة النانوجرام.

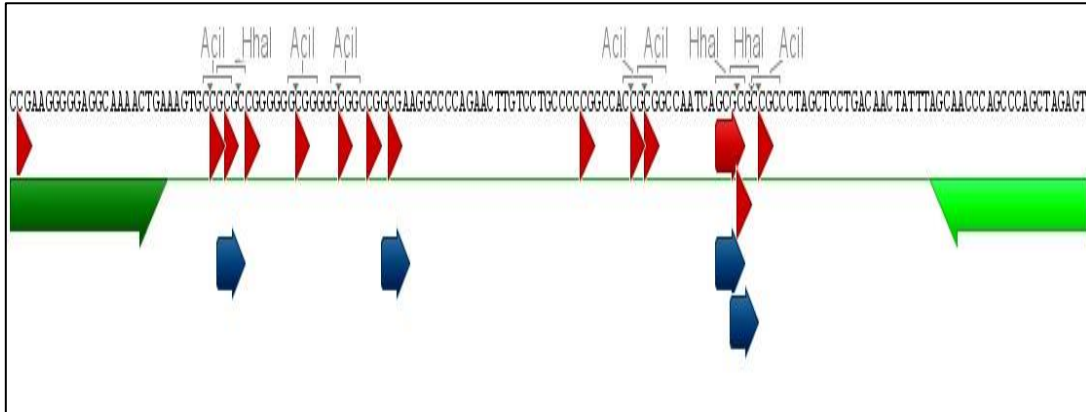
يعد *TWIST2* عامل نسخ له دور مهم في تنظيم تطور الأورام، والتحول الظهاري الميزانشيمي (EMT- Epithelial Mesenchymal Transition) [17]. يتم إسكات الجين *TWIST2* بمتيلة محضضها بشكل انتقائي في ابيضاض الدم اللغواني المزمن وبيضاض الدم اللغواني الحاد وله دور في تحديد المقاومة للأدوية الكيميائية [18، 19]. كما يرتبط انخفاض تعبير الجين *TWIST2* مع وجود متيلة في جزر CpG التابعة لمحضض الجين في أورام البروستات [20]. بينت الدراسات أن تعبير الجين *TWIST2* يعد عامل محدد لزمان البقاء في سرطان المبيض ويعتبر ارتفاع التعبير عن الجين عامل إنذار سيء ويرتبط مع نمط ظاهري ميزانشيمي [21، 22]. أظهر Wang وزملائه أن *TWIST2* له دور مهم وأساسي في تحديد مقاومة سرطان المبيض للعلاج الكيميائي وأن الخط الخلوي السرطاني المشتق من سرطان المبيض C13K والمقاوم للعلاج الكيميائي يمتلك تعبيراً مرتفعاً عن الجين *TWIST2* [23].

## أهداف البحث:

يتضح مما سبق أهمية وجود طريقة سريعة وفعالة تكشف متيلة الجين *TWIST2* في السرطانات المختلفة، لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى تطوير اختبار لكشف متيلة محض الجين *TWIST2* بالاعتماد على طريقة MethylScreen في الخليين الخلويين SK-OV-3 وA2780 المشتقين من سرطان المبيض وربط حالة متيلة جزر CpG بالتعبير الجيني.

## طرائق البحث:

**أولاً: التنبؤ بجزر CpGs في الجين *TWIST2* وتصميم البادئات لاختبار كشف المتيلة بالاعتماد على طريقة MethylScreen:**  
حددت حالة المتيلة لمحض جين *TWIST2* بالاعتماد على طريقة MethylScreen والتي تستخدم التضخيم بالزمن الحقيقي لكشف كمية DNA المتبقية بعد الهضم بأنزيم تقييد حساس للمتيلة (Ms- Methylation Sensitive) وأنزيم تقييد اعتمادي المتيلة (Md- Methylation Dependent). تم البحث عن الجين المراد دراسة متيلة جزر الـ CpG التابعة لها واستخراج تسلسلها من قاعدة البيانات الـ NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). وتم التنبؤ بمواقع جزر CpG الموجودة في محض الجين تقع بحدود 1000 bp صعداً من موقع بدء النسخ للجين (transcription start site, tss) باستخدام برنامج حاسوبي (emboss-cpgplot) على شبكة الانترنت (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) التابع لمعهد المعلوماتية الحيوية الأوروبي (European Bioinformatics Institute). تم تصميم بادئات لتضخيم المنطقة المدروسة من الجينوم الحاوية على 14 من ثنائية CpG في الموقع -328 إلى -177bp، بطول 151bp وبلغت نسبة CG ضمن البادئات 59%، وبلغت حرارة انصهارها ~ 59°C. كما تم التنبؤ بمواقع قطع أنزيمات التقييد حساسة واعتمادية المتيلة ومعرفة مدى تكراريتها ضمن القطعة المدروسة باستخدام برنامج Geneious (الشكل 1).



الشكل (1) شكل يبين مواقع البادئات المستخدمة في طريقة MethylScreen ومواقع CpGs المدروسة ومواقع تقييد الأنزيمات المستخدمة.

تحتوي المنطقة المدروسة (-328 إلى -177) على 6 مواقع تقييد Acil و3 HhaI و4 مواقع تقييد MCrBc (الشكل 1). يقطع أنزيم التقييد الحساس للمتيلة HhaI الحمض النووي في التسلسل 5'... GCG▼C... 3'، ويتعرف الأنزيم Acil على الموقع 5'... C▼CGC... 3'. أما الأنزيم MCrBC فهو أنزيم اعتمادي المتيلة ويتعرف على الموقع (N40-3000) mC (G/A).. 5'... 3' (G/A) mC. تم وضع تسلسل البادئات وطول القطعة وتفاصيل تكرارية ثنائية CpG ومواقع التقييد بالجدول 1.

الجدول (1) تسلسلات البادئات المستخدمة في طريقة Methylsreen

اسم الجين	المنطقة المدروسة وعدد CpGs	الأنزيمات المستخدمة وعدد مواقع تقييدها	تسلسل البادئات (5'-3')	طول الشدفة المضخمة
TWIST2	-328 to -177 14 CpG	6 Acil 3 HhaI 4 MCrBc	F-CCGAAGGGGGAGGCAAACTGA	151 bp
			R- ACTCTAGCTGGGCTGGGTTGCT	

**ثانياً: الزراعة الخلوية:**

زُرِعَ الخطان الخلويان المشتقان من سرطان مبيض SK-OV-3 و A2780 (Sigma, USA) ضمن عبوات زراعة خلوية في وسط RPMI-1640 (Sigma, USA) حاوٍ على 10% مصل البقر الجنيني (Sigma, USA, FBS, fetal bovine serum) و 2mM غلوتامين (Gibco, USA)، بوجود الصادين الحيويين البنسيلين والستربتوميسين بتركيز 1% (Gibco, USA)، عند درجة الحرارة 37°C وجو نصف رطب مزود بغاز CO<sub>2</sub> بتركيز 5% في حاضنة CO<sub>2</sub> (Binder, USA).

**ثالثاً: عزل DNA:**

عزل DNA جينومي من الخلايا SK-OV-3 و A2780 باستخدام كيت QIAamp DNA Mini kit (Germany, Qiagen) وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. ومن ثم قيس تركيز DNA بطريقة ضوئية باستخدام جهاز NanoVue Plus (UK, Bioch Rom).  
**رابعاً: اختبار البادئات المصممة لكشف متيلة الجين TWIST2 وأمثلة شروط التضخيم:**

تم إجراء تفاعل تضخيم بتقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز التقليدي Classic-PCR على DNA معزول من كريات بيضاء بالطريقة المذكورة سابقاً وذلك لمعرفة قدرة البادئات على التضخيم وأمثلة حرارة التصاق البادئات باستخدام كيت (Promega) وجهاز المدور الحراري (Eppendorf) باستخدام برنامج تضخيم متعدد درجات tm حسب الجدول 2. كما تم ترحيل نواتج التضخيم على هلام أغاروز 2% وإظهار نواتج التضخيم باستخدام جهاز موثق الهلام (Biorad-USA).  
تم استخدام برنامج التضخيم الأمثل ودرجة الالتصاق الأمثل في تجربة التضخيم بالزمن الحقيقي بجهاز Step One Real-Time PCR (USA, Applied Biosystems)، باستخدام كميتين مختلفتين من DNA الجينومي ضمن التفاعل 50 ng و 100 ng، وبادئات بتركيز نهائي 300 nM، وكيت Maxima™ SYBR Green/ROX 2x qPCR Master Mix (Thermo Scientific، USA) وفقاً للبرنامج المذكور في الجدول 2. ولاختبار التضخيم النوعي للبادئات تم تحليل منحنى الانصهار للشدفة المضخمة حيث يجب أن يظهر في المنحنى قمة واحدة تدل على التضخيم النوعي وذات نقطة انصهار واحدة.

الجدول (2) البرنامج المستخدم في تفاعل التضخيم بالزمن الحقيقي في هذه الدراسة

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة
1	10 min	95 °C
45 دورة	30s	95 °C
	1 min	درجة حرارة الالتصاق المثلى
تحليل الانصهار	1°C/1s	60-95 °C

**خامساً: الهضم بأنزيمات حساسة واعتمادية المتيلة وإجراء اختبار MethylScreen للكشف عن متيلة الجين TWIST2 في الخطين الخلويين SK-OV-3 و A2780:**

تم تقسيم DNA جينومي المعزول من الخلايا SK-OV-3 و A2780 إلى أربعة أقسام مختلفة النوعية: Rs: تم الهضم في هذا التفاعل بواسطة أنزيمي التقييد HhaI + Acil1 الحساسين للمتيلة (MSRE) والتي تقطع DNA غير الممتل، التفاعل Rd: تم الهضم في هذا التفاعل بواسطة أنزيم التقييد MCrBC اعتمادي المتيلة (MDRE) والذي يقطع DNA الممتل، التفاعل Rsd: تفاعل هضم مزدوج يحوي الأنزيمات الحساسة واعتمادية المتيلة HhaI و Acil1 و MCrBC، التفاعل R0: لا يحوي التفاعل أيًا من

الأنزيمات السابقة. كل تفاعل يحوي 1ug من DNA، المحلول الموقى 1x CutSmart Buffer، 100 µg/mL bovine serum، 50 % glycerol، 1 mM guanosine-5'-triphosphate، 3 % glycerol، 10 U من كل أنزيم مستخدم، وتم استخدام 50 % albumin، في التفاعل الذي لا يحوي أنزيمات وذلك للمحافظة على تجانس تفاعل الهضم. حضنت الأنابيب الحاوية على تفاعلات الهضم الأربعة لمدة 6 ساعات على درجة الحرارة 37 °C. وتم إيقاف التفاعل الأنزيمي بالحضن على درجة الحرارة 65 °C لمدة 20 دقيقة. تم شراء جميع مكونات مزيج تفاعلات الهضم من شركة New England Biolabs (USA). أجري تفاعل التضخيم لنواتج الهضم في الزمن الحقيقي باستخدام الكيت Maxima™ SYBR™ Green/ROX 2x qPCR Master Mix و 50 ng من DNA الجينومي المقطع باستخدام أنزيمات التقييد في تفاعلات القطع سابقة الذكر، وبادئات بتركيز نهائي 300 nM، وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة في جهاز Step One Real-Time PCR (USA، Applied Biosystems). وقد أخذت قيم دورات العتبة (Ct) من أجل استخدامها في حساب النسب المئوية لـ DNA الممتيل (M) وغير الممتيل (UM).

#### سادساً: حساب متيلة DNA:

أخذت قيم دورات العتبة (Ct) تضخيم التفاعلات Rs، Rd، Rsd، R0 من أجل حساب كمية DNA في كل من تفاعلات التقطيع الأربعة السابقة الذكر حسب التالي:

$$\begin{aligned} CM_s &= 2^{-Ct(Rs)} \\ CR_d &= 2^{-Ct(Rd)} \\ CR_{sd} &= 2^{-Ct(Rsd)} \\ CR_0 &= 2^{-Ct(R0)} \end{aligned}$$

تم حساب النسبة المئوية لمتيلة DNA حسب التالي:

- النسبة المئوية لـ DNA الممتيل كاملاً- مفرط المتيلة (hypermethylated DNA-HM)

$$HM = R_s / (R_0 - R_{sd}) \times 100$$

- النسبة المئوية لـ DNA غير الممتيل (Unmethylated DNA-UM)

$$UM = R_d / (R_0 - R_{sd}) \times 100$$

- النسبة المئوية لـ DNA الممتيل بشكل غير كامل (متوسط المتيلة/غير مفرط المتيلة) (Intermediately methylated DNA-IM)

$$IM = 1 - HM - UM$$

- كفاءة التقطيع بأنزيمات التقييد حساسة واعتمادية المتيلة:

تمثل الاختلافات بين قيم Ct تضخيم نواتج القطع المزوج ونواتج تضخيم التفاعل الشاهد ما يسمى بالنافذة التحليلية (analytical window)، يجب أن تكون قيمة النافذة التحليلية لطريقة الكشف الناجحة أكبر من 3:  $\Delta Ct [Msd - Mo] > 3$ .

#### سابعاً: دراسة التعبير الجيني بتقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز بالزمن الحقيقي Real Time PCR:

عزل RNA الكلي من الخطين الخلويين A2780 و SK-OV-3 باستخدام طاقم العزل RNeasy Mini kit (Qiagen، Germany). تم تحويل RNA 3µg إلى cDNA باستخدام كيت النسخ العكسي M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen، USA) حسب تعليمات الشركة المصنعة. تم التضخيم بالزمن الحقيقي Real Time PCR باستخدام الجهاز StepOne (USA، Applied Biosystems) باستخدام كيت Maxima SYBR Green Master Mix (Thermo، USA). حسب التغير النسبي في التعبير الجيني بطريقة  $\Delta\Delta Ct$  باستخدام الجين GAPDH كجين مرجعية. وتستخدم GAPDH كجين مرجعية في العديد من الدراسات لامتلاكها تعبير مرتفع وثابت لا يتغير بتغير الشروط التجريبية في العديد من الخطوط الخلوية السرطانية ومنها سرطان الثدي [24، 25]. تم حساب التغير النسبي في التعبير الجيني في خلايا الخط الخلوي A2780 وذلك للجين TWIST2، وتم إعطاء قيمة تعبير لهذه الجين 1 في الخط SK-OV-3 وذلك لأن الخط SK-OV-3 هو العينة

المرجعية والتي يتم نسب التعبير الجيني إليها لذا يأخذ التعبير فيها القيمة 1 حسب Pfaffl [26]، تم إجراء التفاعلات بثلاثة مكررات. ويوضح الجدول 3 تسلسلات البادئات المستخدمة في تفاعل Real Time PCR.

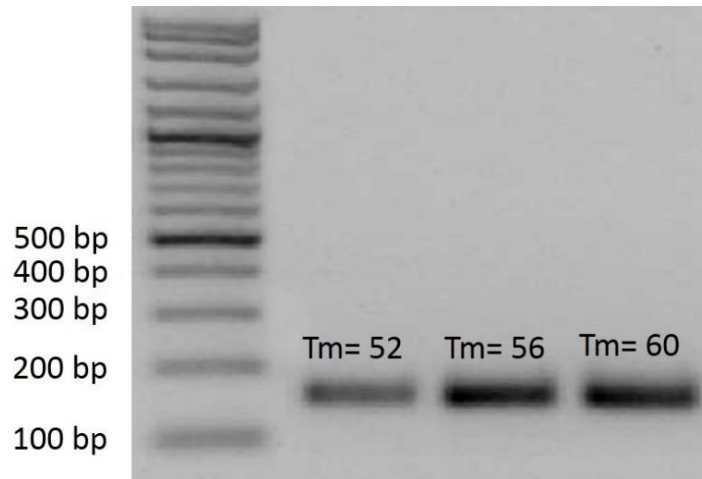
الجدول (3) تسلسلات البادئات المستخدمة في تفاعل التضخيم بالزمن الحقيقي في هذه الدراسة

رمز الجين	تسلسل البادئات (5'-3')	حجم الشدفة المضخمة
<i>TWIST2</i> NG_032754.2	F-CAAGCTGAGCAAGATCCAGACGC	97bp
	R-GGTCATCTTATTGTCCATCTCGTCG	
<i>GAPDH</i> NG_007073.2	F- ATGACCCCTTCATTGACC	131bp
	R- GAAGATGGTGATGGGATTTC	

### النتائج:

أولاً: اختيار درجة الالتصاق المثلى للبادئات المستخدمة في التفاعل السلسلي للبوليميراز التقليدي:

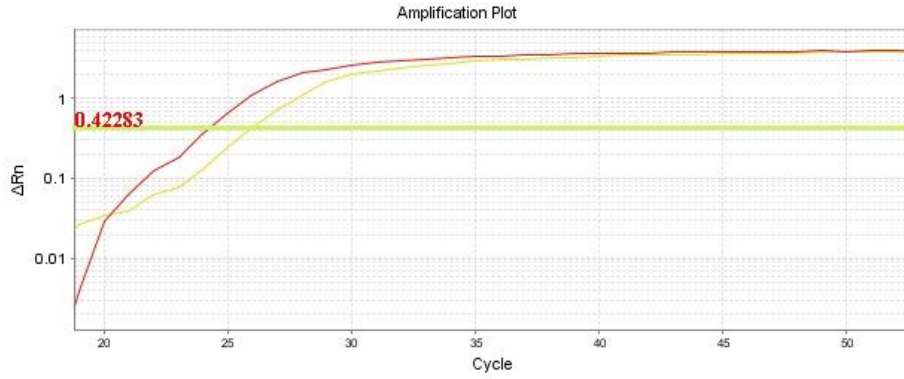
لمعرفة نوعية التضخيم باستخدام البادئات المصممة ودرجة الحرارة المثلى لالتصاق البادئات، تم ترحيل نواتج تضخيم تفاعل التفاعل السلسلي للبوليميراز التقليدي عند درجات حرارة التصاق متزايدة (52 و 56 و 60). يبين الشكل 2 أن جميع درجات الحرارة السابقة تعطي ناتج تضخيم وحيد وبطول 151bp، وأن درجة حرارة التصاق البادئات المثلى هي 60 °C، حيث كان الناتج أكثر تركيزاً لأن عصابة الترحيل ذات فلورة أكبر.



الشكل (2) صورة للرحلان الكهربائي لنواتج تضخيم المنطقة المدروسة وذلك باختلاف درجات حرارة التصاق البادئات المصممة.

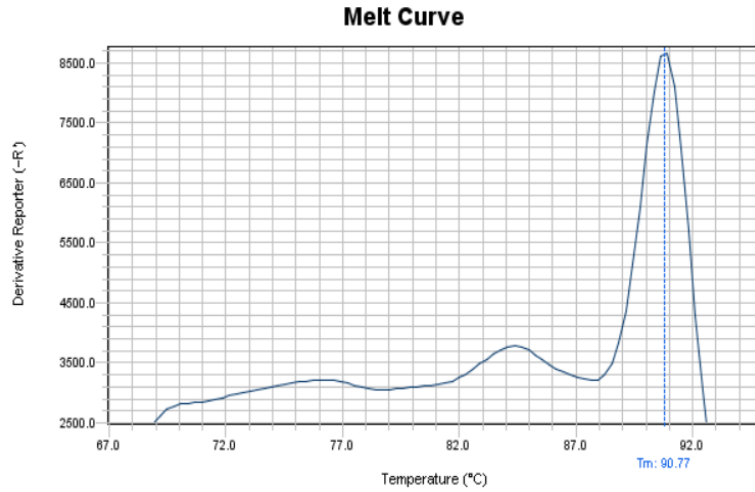
ثانياً: اختيار كمية DNA المستخدمة في تفاعل MethyIscreen وتحليل منحنى الانصهار لاختبار نوعية التضخيم:

أظهرت نتائج التضخيم بـ qPCR أن عتبة دورة التضخيم Ct كانت 25 في التفاعل الحاوي 50ng من DNA، وبلغت 23 في التفاعل الحاوي 100ng من DNA، الأمر الذي يبين أن كفاءة التضخيم جيدة وأن كمية 50ng من DNA مناسبة لاستخدامها في طريقة MethyIscreen لكشف متيلة *TWIST2* (الشكل 3).



الشكل (3): مخطط تضخيم المنطقة المراد دراستها بـ qPCR وذلك باختلاف الكميات البدائية من DNA.

ولمعرفة نوعية التضخيم في تفاعل qPCR تم تحليل منحنى الانصهار لنواتج التفاعل (Melting Curve). يبين الشكل 4 وجود قمة واحدة ذات درجة انصهار  $90.77^{\circ}\text{C}$  في منحنى انصهار نواتج تضخيم TWIST2-Methylscreen مما يدل على نوعية التضخيم وعلى عدم وجود primer-dimer.



الشكل (4) منحنى انصهار ناتج تضخيم المنطقة المدروسة. يبين منحنى الانصهار وجود قمة واحدة تدل على نوعية التضخيم.

### ثالثاً: إجراء تفاعل Methylscreen لمعرفة نسبة متيلة TWIST2 في الخطين

SK-OV-3 و A2780:

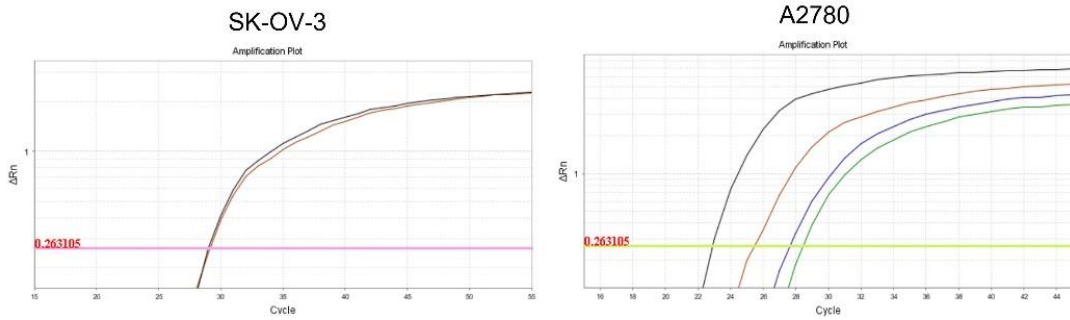
أجري تفاعل التضخيم لنواتج التقطيع بالأنزيمات Acil و Hha1 و MCrBc لجينوم الخطين SK-OV-3 و A2780، وتبين مخططات qPCR (الشكل 5) نتائج تضخيم المنطقة المدروسة للجين TWIST2، تم ترميز نتائج تضخيم كل جينوم بالألوان حسب نوع معالجتها: تفاعل R0 أسود، تفاعل MSRE أزرق، تفاعل MDRE أحمر، وتفاعل DD أخضر. بلغت النافذة التحليلية في طريقة كشف متيلة الجين TWIST2 في جينوم الخلايا SK-OV-3  $\Delta\text{CT} [\text{Msd} - \text{Mo}] > 15$ ، وبلغت لجينوم الخلايا A2780 5.7، مما يدل أن الطريقة حساسة ولا توجد كمية DNA مقاومة للهضم بالأنزيمات المستخدمة لأن  $\Delta\text{CT} [\text{Msd} - \text{Mo}] > 3$ .



أظهر تحليل المتيلة لجين *TWIST2* أن ما نسبته 3.7% كان ممتيلاً بشكل مفرط من جينوم الخط الخلوي A2780 و 88.5% كان متوسط المتيلة و 7.8% كان غير ممتيلاً. أما بالنسبة لجينوم الخط الخلوي SK-OV-3 فقد كانت المنطقة المدروسة من الجين *TWIST2* غير ممتيلة (الجدول 4).

الجدول (4) الحسابات المستخدمة في تحديد متيلة الجين *TWIST2* في الخطين SK-OV-3 و A2780

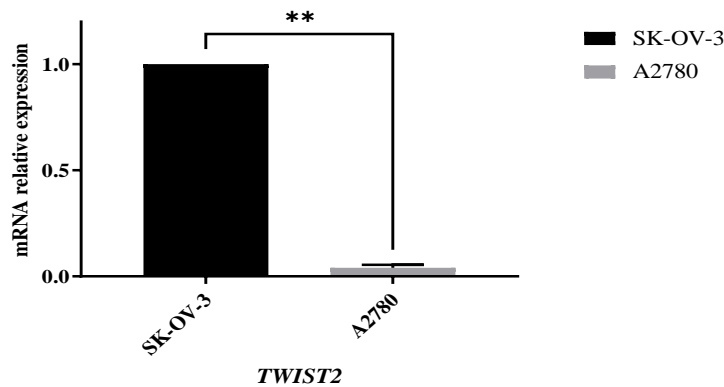
	A2780	SK-OV-3
CMs	$2^{-27.1}$	Not Determined
CRd	$2^{-26}$	$2^{-28.706}$
CRsd	$2^{-28}$	Not Determined
CR0	$2^{-22.3}$	$2^{-28.943}$
HM = Rs/(R0-Rsd) x 100	3.7%	0.001%
UM = Rd/(R0-Rsd) x 100	7.8%	99.999%
IM = 1-HM-UM	88.5%	%0

الشكل (5) طريقة Methyلسcreen لكشف متيلة *TWIST2*.

يظهر الشكل مخططات qPCR لتضخيم المنطقة المدروسة من الجين *TWIST2* في الخطين الخلويين SK-OV-3 و A2780.

رابعاً: دراسة التعبير عن الجين *TWIST2* في الخطين الخلويين SK-OV-3 و A2780:

تمت دراسة التعبير الجيني للجين *TWIST2* والتي تتدخل في التحول إلى الشكل الميزانثيمي في خلايا الخط الخلوي A2780 حيث نسبت نتائج التعبير الجيني إلى التعبير الجيني في خلايا الخط الخلوي SK-OV-3 وحسبت قيمة التغير النسبي في التعبير الجيني Relative quantification (Rq) حسب قاعدة  $\Delta\Delta C_t$  [26] وذلك بتقانة Real Time PCR. بلغت قيم التغير النسبي في التعبير الجيني للجين *TWIST2* في خلايا الخط الخلوي A2780 ضعف (fold) (الشكل 6).



الشكل (6) دراسة التعبير عن الجين *TWIST2* المرمزة لبروتين يتدخل في التحول إلى الشكل الميزانثيمي في الخط الخلوي A2780 بالمقارنة مع الخط SK-OV-3 بطريقة qPCR.

## المناقشة:

يتوافق نشوء وتطور السرطان مع حدوث تبدلات عميقة في متيلة DNA، حيث كانت مثل هذه التغيرات أولى التبدلات فوق الوراثة التي تم كشفها في السرطان [27]. تؤثر الآليات فوق الوراثة على العديد من السبل الخلوية وذلك بإعادة تنظيم تعبيرها المورثي [28, 29]. أظهرت العديد من الدراسات حدوث تغيير في متيلة DNA منطقة المحضض لبعض المورثات الورمية والمورثات الكابحة للورم، الأمر الذي يسبب خللاً في التحكم بالتعبير المورثي في الخلايا السرطانية [30]. وبشكل عام، ترتبط حالة فرط متيلة محضضات المورثات (hypermethylation) بانخفاض للانتساخ، بينما ترتبط حالة عدم وجود المتيلة بزيادة للتعبير المورثي [29]. ويتغير نمط المتيلة بشكل متكرر في الخلايا السرطانية، حيث يحدث نقص عام في متيلة DNA الجينوم، كما يحدث فرط متيلة نوعي في بعض جزر CpG [31, 32].

يعتبر بروتين TWIST2 عامل انتساخ من نمط حلزون عروة حلزون، يقوم بوظيفة منظمة أساسية في تطور العظام والسرطان وفي زيادة خباثة السرطان عن طريق آلية أساسية تدعى التحول الظهاري الميزانشيمي (mesenchymal-EMT-epithelial transition) [33, 34]. ينظم TWIST2 نشاط العديد من العائلات المعروفة من عوامل الانتساخ، من خلال ارتباطه بعوامل الانتساخ وعزلهم في السيتوبلازما أو من خلال تعطيل عوامل الانتساخ وظيفياً [19]. يتم التعبير عن البروتين TWIST2 بشكل مرتفع في العديد من السرطانات ويقوم بدور بروتين ورمي بينما من الممكن أن ينخفض تعبيره في سرطانات أخرى فيؤدي دوراً كابحاً للورم [35-37]. وجد الباحثون أن مستويات التعبير عن الجين TWIST2 منخفضة في سرطان العظم ويتم الإسكات الجيني النوعي بزيادة متيلة محضض الجين في عدة أنواع من سرطان الدم اللمفاوي الحاد والمزمن (chronic lymphocytic leukemia، leukemia) [19]. كما بينت الأبحاث أن زيادة التعبير عن الجين TWIST2 ترتبط بالحالة الخبيثة والقدرة على تشكيل النقائل في سرطان عنق الرحم [38]. لوحظت تغيرات المتيلة في جين TWIST2 في العديد من السرطانات مثل سرطان القولون والبروستات وسرطان الدم اللمفاوي الحاد والمزمن ومن الممكن أن تكون التغيرات فوق الوراثة هي الآلية التي تقوم بتنظيم التعبير عن هذا الجين [20, 39]. إلا أنه لم يتم دراسة متيلة الجين TWIST2 وربطها مع التعبير الجيني في سرطان المبيض من قبل.

وتُقسم الطرق المستخدمة في تحديد متيلة DNA إلى: طرق قادرة على التحديد الكيفي [10] وطرق كمية قادرة على التحديد الكيفي والكمي معاً [11]. تستطيع الطرق الكمية تحديد مقدار متيلة تسلسل معين، مثل طريقة MethylScreen [12]. في هذا البحث، قمنا بتطوير اختبار للكشف عن متيلة الجين TWIST2 يعتمد على تقانة MethylScreen. طورت طريقة MethylScreen في الكشف الكمي للمتيلة لأول مرة عام 2007 على يد الباحثين Holemon وزملائه وتم نشر نتائج هذه التقنية في مجلة BioTechniques وتم تطبيقها في كشف متيلة الجين GSTP1 [16]. وتعتمد تقنية MethylScreen على الجمع بين أنزيمات تقييد حساسة للمتيلة واعتمادية المتيلة في عملية هضم مفردة ومزدوجة. تتبع عملية الهضم تفاعل تضخيم بالزمن الحقيقي يستخدم زوج من البادئات لتضخيم جميع قوالب الحمض النووي المهضومة، دون الحاجة إلى ربط القياسات بمنحني عياري مما يزيد من إنتاجية الفحص. يتضمن تصميم البادئات اختيار مناطق التصاق البادئات تحيط بالمنطقة المراد دراسة متيلتها، وتكون المنطقة المضخمة عبارة عن تسلسل فريد يوجد منه نسخة واحدة في كل الجينوم. ويتم اختيار زوج البادئات التي تحيط بمواقع تقييد أنزيمات MSRE و MDRE المستخدمة في عملية الهضم [16]. يتم دعم الكشف عن كثافة متيلة الحمض النووي بشكل أكبر وذلك باستخدام الأنزيم McrBC، الذي يقطع الحمض النووي في مواقع عشوائية بالقرب من الموقع A/GmC [40]. يمكن لهذه الطريقة أن تميز بين مجموعات الخلايا ذات الأحمال المختلفة من المتيلة، فتفرق بين DNA غير ممتيل و DNA متوسط المتيلة و DNA ممتيل بشكل كلي [16]. ويؤدي إدراج كل من أنزيم التقييد الحساس للمتيلة (MSRE) وأنزيم التقييد المعتمد على المتيلة

(MDRE) في تفاعل واحد إلى الحصول على معلومات إضافية ويمنع الحصول على الإيجابيات الكاذبة الناتجة عن الهضم غير الكامل، نظراً لأن فشل التقييد بواسطة كلا الأنزيمين ينتج عنه قياس مختلف تماماً للمتيلة عن ما هو موجود حقيقة [16]. قام عدة باحثين بالاعتماد على تقنية MethylScreen في تصميم اختبارات لكشف المتيلة لعدة جينات مهمة تتدخل في تطور بعض السرطانات والأمراض. مثلاً تم تطوير اختبار لكشف متيلة *IRX3* اعتماداً على طريقة MethylScreen وذلك للتأكد من نتائج مصفوفة المتيلة (OGHA v1.0) human array ولتكشف تغيرات المتيلة في سرطانات الدماغ [41]. طور الباحثون أيضاً اختباراً لفحص متيلة الجين *FXN* معتمداً على طريقة MethylScreen من أجل تسريع وتسهيل عملية التحديد الكمي للمتيلة في نماذج خلوية وعينات مرضى مصابين بمرض فريديريك Friedreich ataxia، حيث تتدخل متيلة الجين *FXN* في تطور المرض [42، 43]. كما صمم الباحثون بادئات تكشف متيلة الجين *WWOX* بطريقة MethylScreen في عينات سرطان القولون وأورام ويلمس' tumor و سرطان الأرومة العصبية Neuroblastoma [44-46]. وقد تم اعتماد تقانة MethylScreen في تطوير كيت EpiTect® Methyl II PCR Array System من شركة Qiagen الألمانية والمستخدم في الكشف الكمي للمتيلة للعديد من الجينات التي تتدخل في عدة سبل خلوية مهمة في تطور الأمراض والسرطانات، ولا تفصح الشركة عن تسلسل البادئات المستخدمة في الكشف وعن نوعية أنزيمات التقييد وعن مكان الكشف.

في هذه الدراسة تم تصميم بادئات الاختبار المطور والمعتمد على تقانة MethylScreen لدراسة المنطقة من -328 إلى -177 bp من جين *TWIST2* حيث أحاطت البادئات بـ 14 ثنائية CpG وتم اختيار الأنزيمات الحساسة واعتمادية المتيلة بحيث تغطي مواقع تقييدها أكبر عدد من CpG الموجودة في المنطقة المدروسة. لذا تم استخدام *Acil* الذي يقطع في مواقع 6 من CpG المنطقة الهدف والأنزيم *Hha1* والذي يقطع في مواقع 3 CpG والأنزيم *McrBc* الذي يقطع في 4 CpG من المنطقة الهدف. ويستطيع هذا الاختبار دراسة متيلة 14 CpG في المنطقة المستهدفة في الدراسة دفعة واحدة دون الحاجة إلى شواهد عيارية للمتيلة. ويعد استخدام عدة أنزيمات MSREs مختلفة في اختبار متيلة CpGs استراتيجية أفضل بكثير للتحقق من متيلة واحدة أو عدة CpGs داخل المنطقة المدروسة دفعة واحدة. وتؤمن الأنزيمات حساسة المتيلة المستخدمة *HhaI* و *AciI* تغطية لجينوم البشر وهي متوافقة مع شروط تفاعل قطع *McrBC*. بالمقارنة مع الاختبارات المطورة والمعتمدة على تقانة *MethylLight* والتي تعد من أكثر الطرق الكمية شيوعاً في كشف المتيلة نجد أن *MethylLight* تقيس متيلة الحمض النووي في موضع واحد فقط (CpG واحدة) بعد معالجته بالبيسلفيت ومن ثم تضخيمه بتقنية تفاعل البوليميراز بالزمن الحقيقي باستخدام نوعين من البادئات خاصة بالسيوتوزين الممتيل والسيوتوزين غير الممتيل، كما أنها تحتاج إلى شواهد عيارية مختلفة المتيلة من أجل التحديد الكمي (5، 6).

في هذا البحث تم أمثلة شروط تفاعل الاختبار الخاص بقياس متيلة *TWIST2* واختيار الكمية البدئية المناسبة من الجينوم المقطع بواسطة أنزيمات التقييد حساسة واعتمادية المتيلة، وكانت كمية 50ng مناسبة ويتم تضخيمها بكفاءة. ويكفي ناتج هضم 1µg من DNA في طريقتنا لحوالي 20 تفاعل الأمر الذي يسمح بتكرار التجربة لجعل النتائج أكثر دقة إحصائياً وبتكلفة قليلة. كما تتميز الطريقة بسرعة الكشف فعند الحصول على ناتج التقطيع يمكن إتمام تفاعل التضخيم ومعالجة النتائج بمدة صغيرة نسبياً تقدر بـ 2 ساعة. وعند المقارنة مع طريقة سلسلة البيسلفيت والتي تعد عملية مجهددة وطويلة وشاقة وذات تكلفة عالية، فمن أجل جعل الطريقة كمية يجب القيام بـ PCR للقطعة المدروسة بعد عملية تحويل بيسلفيت ومن ثم تنسيل ناتج PCR في بلاسميد ثم القيام بعملية تحويل بكتيري لتكثير البلاسميد الحاوي على القطعة المدروسة ومن ثم عزل البلاسميد وسلسلته، وبسبب تكلفة السلسلة العالية، يتم عادةً تحليل 10 نسخ من البلاسميدات فقط لكل عينة مما يقلل القوة الإحصائية لبيانات السلسلة ويرفع من التكلفة حوالي 5 أضعاف من تكلفة طريقة MethylScreen [47].

وفي دراسة أجريت لتحديد متيلة قطعة من جين *TWIST2* طولها 141 bp بطريقة Bio-COBRA، استخدم باحثون كميات بدئية كبيرة من DNA الجينومي تصل إلى 3.25 µg وأجروا عملية تحويل بيسلفيت ثم PCR للقطعة المستهدفة ثم هضم بأنزيمات التقييد

لنواتج PCR ومن ثم ترحيل الناتج في جهاز Bioanalyzer والذي يعد من الأجهزة النوعية عالية الكلفة، الأمر الذي يجعل كشف متيلة TWIST2 يحتاج زمن طويل وكلفة مادية عالية [47].

ويعد وجود DNA مقاوم للهضم من قبل نوعي الأنزيمات حساسة واعتمادية المتيلة في تقانة MethylScreen أحد العوائق الأساسية أمام نجاح كشف المتيلة الكمي حيث يجعل فشل التقييد، النافذة التحليلية للمقايسة صغيرة [16]. بلغت النافذة التحليلية في طريقة كشف متيلة الجين TWIST2 في جينوم الخلايا SK-OV-3  $\Delta CT [Msd - Mo] > 15$ ، وبلغت في جينوم الخلايا A2780 5.7، مما يدل أن الطريقة حساسة ولا توجد كمية DNA مقاومة للهضم بالأنزيمات المستخدمة لأن قيمة النافذة التحليلية المقبولة هي  $\Delta CT [Msd - Mo] > 3$ .

سمح لنا تطوير طريقة الكشف المعتمدة على تقانة MethylScreen بالكشف الكمي الحساس لمتيلة جزر CpG في جينوم نوعين من خلايا سرطان المبيض، حيث وجدنا أن ما نسبته 3.7% كان ممثيلاً بشكل مفرط في جينوم الخط الخلوي A2780 و 88.5% كان متوسط المتيلة و 7.8% كان غير ممثيلاً. أما بالنسبة لجينوم الخط الخلوي SK-OV-3 فقد كانت المنطقة المدروسة من الجين TWIST2 غير ممثيلة. استخدمت الدراسات السابقة طريقة سلسلة البيسلفيت لكشف متيلة الجين TWIST2 في عينات سرطان البروستات [20] وعند مرضى سرطان الدم اللمفاوي الحاد والمزمن [18]. كما تم استخدام تقانة pyrosequencing والتي تعد من التقانات المكلفة والمجهدة لكشف المتيلة في عينات من سرطان قولون [39]. وتم اعتماد طريقة COBRA والتي تستخدم نظير مشع للفوسفات في كشف متيلة الجين TWIST2 في عينات مرضى سرطان الدم اللمفاوي الحاد والمزمن [19].

تم في هذه الدراسة تحديد متيلة الجين TWIST2 لأول مرة في سرطان المبيض وربطها مع التعبير الجيني. حيث رصد انخفاض معنوي في التعبير الجيني للجين TWIST2 في الخلايا A2780 بشكل مترافق مع نسبة المتيلة المرتفعة للجين وذلك بالمقارنة مع الخلايا SK-OV-3. وقد لاحظ Li وزملاؤه أن التعبير عن TWIST2 يرتبط بخبثاء وقدرة الأورام على تشكيل النقائل والمقاومة للسيسبلاتين في سرطان المبيض [38]. بينت الأبحاث أن تعبير الجين TWIST2 يعتبر مؤشراً على البقاء في سرطانات المبيض، كما يرتبط التعبير المرتفع بإنذار سيء حيث يعطي التعبير المرتفع الصفة الميزانثيمية العدائية والمقاومة للأدوية [21-23]. هذه الدراسات تدفعنا لربط المتيلة والتعبير مع مقاومة الخلايا السرطانية A2780 و SK-OV-3 للأدوية في دراسات مستقبلية.

تظهر نتائجنا أن اختبار كشف متيلة TWIST2 سمح بالكشف الكمي الحساس لمتيلة 14 CpG في الموقع الجيني المدروس. حيث تم اختيار المنطقة المدروسة وتصميم البادئات واختبار كفاءة تضخيمها وكشفها لمتيلة الجين TWIST2 لأول مرة حيث لم يجر سابقاً اختبار متيلة TWIST2 بهذه الطريقة. يمكن أن تولد بسرعة نتائج دقيقة دون استخدام ببسلفيت الصوديوم التي تستغرق عملية التحويل فيه الكثير من الوقت والمواد ويحدث فيها بعض الأخطاء ناتجة عن فشل التحويل من السيتوزين الغير ممثيل إلى الثايمين [15]. وهي ذات تكلفة مقبولة بالمقارنة مع باقي الطرق [48] وبسيطة لا تحتاج الكثير من المراحل والأجهزة المعقدة بالمقارنة مع الطرق الأكثر تعقيداً كسلسلة pyrosequencing.

### الاستنتاجات:

سمح لنا تطوير اختبار تحديد متيلة TWIST2 المعتمد على تقانة MethylScreen بالكشف الكمي الحساس لمتيلة 14 CpG في الموقع الجيني قرب موقع بدء الانتساخ. تكون الجين TWIST2 غير ممثيلة في خلايا الخط الخلوي المشتقة من سرطان المبيض SK-OV-3، بينما ازدادت متيلة المنطقة المدروسة في الخلايا A2780. وارتبطت المتيلة المرتفعة في خلايا A2780 بانخفاض التعبير الجيني بالمقارنة مع خلايا SK-OV-3.

### التوصيات:

توصي دراستنا بمتابعة اختبار طريقة الكشف المطورة على عينات سرطانية أخرى وعلى عينات من أمراض مختلفة. كما أنه من المهم متابعة الدراسة لربط تغيرات المتيلة والتعبير مع المقاومة الخلوية للأدوية في خلايا سرطان المبيض A2780 و SK-OV-3. كما توصي دراستنا بتطوير دائم لطرق كشف سريعة وعملية لتغيرات المتيلة في السرطانات وغيرها من الأمراض لكون تغيرات المتيلة تعد واسمات حيوية للإمراضية والخبائة السرطانية ومقاومة الأدوية الأمر الذي يسهم في تحسين التشخيص وفعالية العلاج في المستقبل.

### معلومات التمويل :

هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

## المراجع:

- .1 Moore LD, Le T, Fan G: DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013, 38:23-38.
- .2 Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsuyama T, Nagase H, Held WA: Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:3336-3341.
- .3 Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T: Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol* 2000, 30:306-309.
- .4 Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS: The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 2000, 9:2885-2894.
- .5 Norris DP, Patel D, Kay GF, Penny GD, Brockdorff N, Sheardown SA, Rastan S: Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell* 1994, 77:41-51.
- .6 Lee JT, Jaenisch R: The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation. *Curr Opin Genet Dev* 1997, 7:274-280.
- .7 Gisselsson D, Shao C, Tuck-Muller CM, Sogorovic S, Palsson E, Smeets D, Ehrlich M: Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Chromosoma* 2005, 114:118-126.
- .8 Esteller M: CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002, 21:5427-5440.
- .9 Rauluseviciute I, Drablos F, Rye MB: DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation. *BMC Med Genomics* 2020, 13:6.
- .10 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:9821-9826.
- .11 Lorente A, Mueller W, Urdangarin E, Lazcoz P, von Deimling A, Castresana JS: Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semiquantitative real time PCR. *BMC Cancer* 2008, 8:61.
- .12 Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, et al: Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000, 24:132-138.
- .13 Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, Boots-Sprenger SH, Wesseling P: MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest* 2007, 87:1055-1065.
- .14 Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000, 28:E32.
- .15 Genreux DP, Johnson WC, Burden AF, Stoger R, Laird CD: Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic Acids Res* 2008, 36:e150.
- .16 Holemon H, Korshunova Y, Ordway JM, Bedell JA, Citek RW, Lakey N, Leon J, Finney M, McPherson JD, Jeddloh JA: MethylScreen: DNA methylation density monitoring using quantitative PCR. *Biotechniques* 2007, 43:683-693.
- .17 Zhu QQ, Ma C, Wang Q, Song Y, Lv T: The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol* 2016, 37:185-197.
- .18 Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, Bennett KL, Liyanarachchi S, Young DC, Rassenti L, Kipps TJ, Grever MR, Byrd JC, Plass C: TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005, 23:3877-3885.
- .19 Thathia SH, Ferguson S, Gautrey HE, van Otterdijk SD, Hili M, Rand V, Moorman AV, Meyer S, Brown R, Strathdee G: Epigenetic inactivation of TWIST2 in acute lymphoblastic leukemia modulates proliferation, cell survival and chemosensitivity. *Haematologica* 2012, 97:371-378.

- .20 Zhao C, Zhang W, Zhu X, Xu Y, Yang K, Wei D, Liang S, Zhao F, Zhang Y, Chen X, et al: TWIST2: A new candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Prostate* 2019, 79:1647-1657.
- .21 Li X, Yang J, Wang X, Li X, Liang J, Xing H: Role of TWIST2, E-cadherin and Vimentin in epithelial ovarian carcinogenesis and prognosis and their interaction in cancer progression. *Eur J Gynaecol Oncol* 2016, 37:100-108.
- .22 Mao Y, Xu J, Li Z, Zhang N, Yin H, Liu Z: The role of nuclear beta-catenin accumulation in the Twist2-induced ovarian cancer EMT. *PLoS One* 2013, 8:e78200.
- .23 Wang T, Li Y, Tuerhanjiang A, Wang W, Wu Z, Yuan M, Maitituoheti M, Wang S: Twist2 contributes to cisplatin-resistance of ovarian cancer through the AKT/GSK-3beta signaling pathway. *Oncol Lett* 2014, 7:1102-1108.
- .24 Liu LL, Zhao H, Ma TF, Ge F, Chen CS, Zhang YP: Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. *PLoS One* 2015, 10:e0117058.
- .25 Shi Y, Ye P, Long X: Differential Expression Profiles of the Transcriptome in Breast Cancer Cell Lines Revealed by Next Generation Sequencing. *Cell Physiol Biochem* 2017, 44:816-804:
- .26 Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:e45.
- .27 Feinberg AP, Vogelstein B: Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983, 301:89-92.
- .28 Jaenisch R, Bird A: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003, 33 Suppl:245-254.
- .29 Weber M, Schubeler D: Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 2007, 19:273-280.
- .30 Jones PA, Baylin SB: The epigenomics of cancer. *Cell* 2007, 128:683-692.
- .31 Esteller M, Herman JG: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002, 196:1-7.
- .32 Ehrlich M: DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009, 1:239-259.
- .33 Franco HL, Casasnovas J, Rodriguez-Medina JR, Cadilla CL: Redundant or separate entities?--roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res* 2011, 39:1177-1186.
- .34 Soldatov R, Kaucka M, Kastriti ME, Petersen J, Chontorotzea T, Englmaier L, Akkuratova N, Yang Y, Haring M, Dyachuk V, et al: Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science* 2019, 364.
- .35 Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi SI, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, et al: Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Sci* 2013, 104:8.888-80
- .36 Zhang X, Ma W, Cui J, Yao H, Zhou H, Ge Y, Xiao L, Hu X, Liu BH, Yang J, et al: Regulation of p21 by TWIST2 contributes to its tumor-suppressor function in human acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2015, 34:3000-3010.
- .37 Merindol N, Riquet A, Szablewski V, Eliaou JF, Puisieux A, Bonnefoy N: The emerging role of Twist proteins in hematopoietic cells and hematological malignancies. *Blood Cancer J* 2014, 4:e206.
- .38 Li Y, Wang W, Wang W, Yang R, Wang T, Su T, Weng D, Tao T, Li W, Ma D, Wang S: Correlation of TWIST2 up-regulation and epithelial-mesenchymal transition during tumorigenesis and progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2012, 124:112-118.
- .39 Galvan JA, Helbling M, Koelzer VH, Tschan MP, Berger MD, Hadrich M, Schnuriger B, Karamitopoulou E, Dawson H, Inderbitzin D, et al: TWIST1 and TWIST2 promoter methylation and protein expression in tumor stroma influence the epithelial-mesenchymal transition-like tumor budding phenotype in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015, 6:874-885.
- .40 Stewart FJ, Panne D, Bickle TA, Raleigh EA: Methyl-specific DNA binding by McrBC, a modification-dependent restriction enzyme. *J Mol Biol* 2000, 298:611-622.
- .41 Ordway JM, Bedell JA, Citek RW, Nunberg A, Garrido A, Kendall R, Stevens JR, Cao D, Doerge RW, Korshunova Y, et al: Comprehensive DNA methylation profiling in a human cancer genome identifies novel epigenetic targets. *Carcinogenesis* 2006, 27:2409-2423.

- .42 Al-Mahdawi S, Sandi C, Mouro Pinto R, Pook MA: Friedreich ataxia patient tissues exhibit increased 5-hydroxymethylcytosine modification and decreased CTCF binding at the FXN locus. *PLoS One* 2013, 8:e74956.
- .43 Mikaeili H, Sandi M, Bayot A, Al-Mahdawi S, Pook MA: FAST-1 antisense RNA epigenetically alters FXN expression. *Sci Rep* 2018, 8:17217.
- .44 Nowakowska M, Pluciennik E, Wujcicka WI, Sitkiewicz A, Kazanowska B, Zielinska E, Bednarek AK: The correlation analysis of WWOX expression and cancer related genes in neuroblastoma- a real time RT-PCR study. *Acta Biochim Pol* 2014, 61:91-97.
- .45 Pluciennik E, Nowakowska M, Wujcicka WI, Sitkiewicz A, Kazanowska B, Zielinska E, Bednarek AK: Genetic alterations of WWOX in Wilms' tumor are involved in its carcinogenesis. *Oncol Rep* 2012, 28:1417-1422.
- .46 Zelazowski MJ, Pluciennik E, Pasz-Walczak G, Potemski P, Kordek R, Bednarek AK: WWOX expression in colorectal cancer--a real-time quantitative RT-PCR study. *Tumour Biol* 2011, 32:551-560.
- .47 Brena RM, Auer H, Kornacker K, Hackanson B, Raval A, Byrd JC, Plass C: Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:e17.
- .48 Oakes CC, La Salle S, Robaire B, Trasler JM: Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics* 2006, 1:146-152.