خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۱ شماره ۲ تابستان ۹۳ (۱۴۶-۱۳۷)

مقاله پژوهشی

فرکانس متیلاسیون ژن *P15* و بیان آن در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد

عصمت کمالی دولت‌آبادی[۱]، محمدرضا استاد علی دهقی[۲]، ناصر امیری‌زاده[۳]، کاظم پریور[۴]، رضا مهدیان[۵]

چکیده

سابقه و هدف

در بدخیمی‌های خونی، افزایش متیلاسیون در پروموتر ژن‌های سرکوبگر تومور به عنوان یکی از رخدادهای شایع در مسیر اپی‌ژنتیک گزارش شده است که قابل بازگشت می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی، میزان بسامد متیلاسیون پروموتر ژن *P15* در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد و بررسی ارتباط متیلاسیون پروموتر ژن *P15* با بیان آن بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی، بیماران مراجعه‌کننده به مرکز خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی، در دو بازده زمانی چهار ماهه، بعد از تایید بیماری لوسمی میلوئیدی حاد وارد مطالعه شدند. متیلاسیون پروموتر ژن *P15* در ۵۹ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد با روش بررسی منحنی ذوب مورد مطالعه قرار گرفت و میزان بیان این ژن با روش Real Time PCR و به روش محاسباتی ΔΔCT انجام شد. یافته‌ها توسط آزمون‌های کای‌دو و دقیق فیشر و نرم‌افزار SPSS ۱۸ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

۴۰/۷٪ (۲۴ از ۵۹) بیماران وارد مطالعه شده افزایش متیلاسیون پروموتر ژن *P15* را نشان دادند. بدون در نظر گرفتن الگوی متیلاسیون، ۹۲/۹٪ از کل جمعیت بیماران کاهش بیان این ژن را نشان دادند. ۹۰/۹٪ از بیمارانی که متیلاسیون در ژن *P15* خود داشتند(۲۲ از ۲۴) و ۸۸/۵٪ (۳۱ از ۳۵) از بیمارانی که متیلاسیون در ژن *P15* نداشتند، کاهش بیان در ژن *P15* را نشان دادند.

نتیجه گیری

تغییرات اپی‌ژنتیک رخ داده در ژن‌های تنظیم‌گر و یا ژن‌های القا کننده بیان در تنظیم بیان ژن *P15* نقش داشته و علاوه بر آن دیگر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک مانند تغییرات هیستونی در تنظیم بیان نیز دخالت دارند.

کلمات کلیدی: **اپی‌ژنتیک، لوسمی میلوئید حاد(AML) ، متیلاسیون**

تاریخ دریافت : ۹۲/۴/۲۲
تاریخ پذیرش : ۹۲/۹/۱۷

۱- مؤلف مسؤول: دانشجوی دکترای تخصصی زیست‌شناسی با گرایش سلولی و مولکولی ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۱۱۴
۲- دکترای تخصصی ایمونولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی ـ بیمارستان دکتر شریعتی ـ تهران ـ ایران
۳- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- دکترای تخصصی زیست‌شناسی سلولی و تکوین ـ استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات ـ تهران ـ ایران
۵- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

مقدمه

لوسمی میلوئید حاد(Acute myeloid lukemia)، یک اختلال کلونال خونساز بوده که ممکن است از سلول‌های بنیادی خونساز(hematopoietic stem cell) و یا از یک سلول نیای رده خاص(lineage-specific progenitor cell) مشتق شود. ناهنجاری‌های کروموزومی غیر تصادفی مانند حذف، وارونگی و جابه‌جایی، و هم چنین تغییرات اپی‌ژنتیکی بدون این‌که تغییری در توالی ژن ایجاد کنند، نقش مهمی در پاتوژنز بیماری لوسمی میلوئیدی حاد دارند(۳-۱). تغییر الگوی متیلاسیون ژن‌ها مانند افزایش متیلاسیون در پروموتر ژن‌های سرکوبگر تومور و یا کاهش متیلاسیون در سرتاسر ژن از مهم‌ترین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی می‌باشد(۸-۴). اگر چه تغییرات هیستونی نیز از مکانیسم‌های دیگر اپی‌ژنتیک بوده که مطالعه کمتری بر روی آن صورت گرفته‌است(۹). در واقع متیلاسیون نابه‌جا (aberrant) در ناحیه '۵ پروموتر ژن‌های سرکوبگر تومور، در بسیاری از سرطان‌ها به عنوان مهم‌ترین مکانیسم اپی‌ژنتیک یاد شده است(۱۲-۱۰). بر خلاف تغییرات ژنتیکی که غیرقابل برگشت می‌باشد، این تغییرات اپی‌ژنتیکی قابل بازگشت هستند(۱۳).

متیلاسیون سیتوزین در نواحی پالیندرومیک CpG پروموتر ژن‌ها، نقش مهمی را در خاموشی اپی‌ژنتیک ژن‌هایی مانند IGSF4 ، ESR1 و CDKN2 در طی توسعه، پیشرفت و عود لوسمی بازی می‌کند(۱۷-۱۳، ۳). پروتئین CDKN4B که به عنوان یک سرکوبگر تومور چندگانه ((multi tumor suppressor 2 (MTS2)) شناخته شده است توسط ژن *CDKN2B* رمزگذاری می‌شود. این ژن در کنار ژن سرکوبگر تومور CDKN2A بر روی کروموزم ۹ قرار گرفته و میزان بسامد موتاسیون در این ژن زیاد می‌باشد(۲۲-۱۸). ژن *CDKN2B* مهار کننده کیناز وابسته به سیکلین P15InK4B را رمزگذاری کرده که با CDK4 و CDK6 تشکیل کمپلکسی داده و از طریق مهار سایکلین D سبب جلوگیری از فعال شدن کینازهای وابسته به سیکلین شده و در نهایت عملکرد خود را از طریق مهار گذر سلول از فاز G1 انجام می‌دهند. بیان این ژن به طور چشمگیری توسط ژن *TGF* بتا القا شده و از سویی دیگر نقش و عملکرد این ژن(*P15*) به عنوان ژن سرکوبگر تومور در غیاب ژن *P16* بسیار مهمتر و بارزتر است(۲۵-۲۳). اگر چه متیلاسیون پروموتر ژن *P15* که منجر به خاموشی نسخه‌برداری شده، یکی از مکانیسم‌های مهم غیر فعال شدن ژن در لوسمی میلوئید حاد می‌باشد، ولی حذف هموزیگوتی و یا مکانیسم‌های موتاسیون داخل ژنی نیز در لوسمی میلوئید حاد به طور نادر گزارش شده است(۲۶، ۲۲).

در این مطالعه متیلاسیون پروموتر P15 CDKN2B در بین بیماران لوسمی میلوئید حاد مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی تهران در یک بازه زمانی ۵ ماهه، به منظور بررسی بسامد متیلاسیون در این ژن و نیز بررسی رابطه متیلاسیون و میزان بیان این ژن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی، نمونه خون محیطی و یا نمونه مغز استخوان ۵۹ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئید حاد مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران در یک بازه زمانی ۵ ماهه جمع‌آوری گردید. قبل از نمونه‌گیری، رضایت‌نامه مطابق با قوانین بیمارستان و مرکز تحقیقات از بیماران گرفته شد. آزمایش CBC با دستگاه sysmex k502 و بررسی لام خون محیطی و مغز استخوان بیماران به منظور اندازه‌گیری WBC ، PLT، HCT ، Hb و تعیین درصد بلاست بیماران به طور جداگانه انجام شده و ثبت گردید. بعد از تشخیص احتمالی نوع سرطان خون بر اساس طبقه‌بندی FAB با رنگ‌آمیزی رومانوسکی لام خون محیطی و یا لام مغزاستخوان بیمار، تشخیص با بررسی مارکرهای سطحی به روش فلوسیتومتری تایید شد.

استخراج DNA و بی‌سولفیته کردن آن‌ها:

سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه خون و یا مغز استخوان بیماران با استفاده از فایکول(bio West) جدا شده و سپس DNA با استفاده از مینی‌کیت استخراج DNA (CA،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

Valencia و کیاژن) استخراج شد. کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت و بعد از حصول اطمینان از کیفیت آن، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

۱۰۰۰ نانوگرم از DNA ی هر بیمار با استفاده از کیت بی‌سولفیت سدیم(کیاژن) EpiTect Bisulfite Kit با توجه به دستوالعمل کارخانه سازنده، بی‌سولفیته شده و در نهایت DNA در ۲۰ میکرولیتر از بافر الوشن کیت حل شد. نمونه‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. با انجام این مرحله، سیتوزین‌های غیر متیله تبدیل به تیمین شده و سیتوزین‌های متیله دست‌نخورده باقی می‌ماند.

طراحی آغازگر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت بررسی منحنی ذوب:

با استفاده از نرم‌افزار(Molecular Biology Insights، آمریکا، CO و Cascade) Oligo ۱/۰ software آغازگر برای نواحی دو طرف پروموتر ژن طراحی شده و سپس با نرم‌افزارهای MethBlast و GeneRunner مورد بررسی قرار گرفت. ساختار ثانویه آغازگر با نرم‌افزار GeneRunner چک شده و و دمای ذوب(Melt temprature) آغازگر و منحنی ذوب با نرم‌افزار DNA melting simulation software و Oligocalculate مورد بررسی قرار گرفت. بعد از حصول اطمینان از طراحی آغازگرها، توالی آغازگر جهت ساخت به شرکت MWG آلمان ارسال شد(جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرها

F: GGT TGG TTT TTT ATT TTG TTA GAG	*P15* primers (MCA)
R: CCT AAA TTA CTT CTA AAA AAA AAC	
F: TGG CCG GAG GTC ATG ATG	*P15* primers (real-time)
R: GGG CAG CAT CAT GCA CCG	
F: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	*GAPDH primers*
R: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	

بعد از بهینه‌سازی PCR ، PCR از منطقه مورد نظر با استفاده از مستر میکس تاکارا حاوی سایبرگرین SYBR Premix EX Taq TM II(Cat.# RR820L) با ۵۰ نانوگرم از DNA بیسولفیت شده در دستگاه ABI StepOnePlus در دمای آنیلینگ ۵۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

کنترل‌های به کار رفته در بررسی منحنی ذوب:

کنترل‌های به کار رفته در بررسی منحنی ذوب شامل کیت کنترل متیلاسیون(کیاژن) و DNA بی‌سولفیت شده ۱۰ فرد نرمال بود. کیت کنترل متیلاسیون حاوی کنترل غیر متیله بی‌سولفیت شده(به عنوان کنترل ۰٪ متیله)، کنترل متیله بی‌سولفیت شده(به عنوان کنترل ۱۰۰٪ متیله) و DNA انسانی بی‌سولفیت نشده(جهت بررسی موفقیت‌آمیز بی‌سولفیته کردن نمونه‌ها) می‌باشد. منحنی ذوب هر بیمار با منحنی‌های ذوب ۱۰ کنترل نرمال، کنترل‌های غیر متیله تجاری و کنترل‌های متیله تجاری مقایسه گردید. بیمارانی که منحنی ذوب آنان انحراف به راست داشته و حد فاصل بین منحنی‌های ذوب کنترل‌های متیله تجاری و غیر متیله تجاری قرار می‌گرفت به عنوان جزیی متیله در نظر گرفته شدند. قابل ذکر است که منحنی ذوب کنترل‌های نرمال منطبق بر منحنی ذوب کنترل‌های غیر متیله تجاری است.

بررسی بیان با روش Real Time PCR

استخراج RNA و ساخت cDNA:

۲×۱۰^{۶} سلول از هر بیمار در ۱ سی‌سی ترایزول حل شده و RNA توتال‌آن بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد به روش اتانول سرد و کلروفرم جدا شد(۲۸، ۲۷). بعد از حصول اطمینان از کیفیت RNA ، RNA به ۸۰- انتقال داده شد. با استفاده از کیت فرمنتاز(#K1622 ، #K1621 و فرمنتاز) و با توجه به دستورالعمل کیت، cDNA با ۳۰۰۰ نانوگرم RNA ساخته شد. cDNA با آغازگرهای HPRT چک شد. آغازگرهای بیان ژن با دو نرم‌افزار Primer Express و AlleleID به صورت exon-exon junction طراحی شد. ساختار ثانویه آغازگر، دمای ذوب و منحنی ذوب آن با نرم‌افزارهای Generunner ، Oligocalculate و DNA melting simulation software چک شد. بعد از حصول اطمینان از طراحی آغازگرها، توالی آغازگر جهت ساخت به شرکت MWG آلمان ارسال گردید(جدول ۱).

بعد از بهینه‌سازی روش، جهت بررسی بیان ژن P15 ، Real Time با نمونه cDNA در دستگاه ABI StepOnePlus

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

در دمای آنلینگ ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتیجه نهایی میزان بیان ژن به روش ΔΔCT محاسبه گردید. از ژن *GAPDH* به عنوان ژن رفرانس استفاده شد.

آزمایش‌های آماری:

در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۸ و آزمایش‌های Fishers Exact Test و pearson chi sqaure محاسبات آماری انجام گرفت. p< ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

متیلاسیون پروموتر ژن *P15* و بیان آن در ۵۹ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئید حاد اولیه و ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات سیتوژنتیکی، خون‌شناسی، نوع لوسمی میلوئید حاد، سن و جنس بیماران وارد مطالعه شده در جدول ۲ آورده شده است. در گروه مورد مطالعه، ۷۱/۲٪ از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات در بازه زمانی مشخص شده مرد بودند. ۸۳/۱٪ بیماران مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات در بازه زمانی مشخص شده جوانتر از ۵۶ سال با متوسط سنی ۳۶ سال(۸۶-۸) بودند. در بررسی سیتوژنتیک، ۶۷/۸٪ (۴۰ از ۵۹) بیماران طبیعی و ۳۲/۲٪(۱۹ از ۵۹) بیماران دارای سیتوژنتیک غیر طبیعی بودند. در هنگام تشخیص، ۳۲/۲٪ (۱۹ از ۵۹) بیماران مورد مطالعه در نمونه مغز استخوان خود بلاست کمتر از ۵۰٪ و ۶۷/۸٪ (۴۰ از ۵۹) بیماران بلاست بیش از ۵۰٪ داشتند.

در بررسی متیلاسیون پروموتر ژن P15 در بیماران وارد مطالعه شده، ۴۰/۷٪ بیماران در ناحیه پروموتری این ژن متیله بوده ولی میزان متیلاسیون آن‌ها متفاوت بود. منحنی ذوب در بیمارانی که کاملاً مطابق با نمونه کنترل متیله بود به عنوان متیله و در بیمارانی که منحنی ذوب آن‌ها بین منحنی‌های ذوب متیله و غیر متیله قرار گرفتند و متمایل به راست بودند، به عنوان جزیی متیله در نظر گرفته شد(شکل‌های ۵-۱).

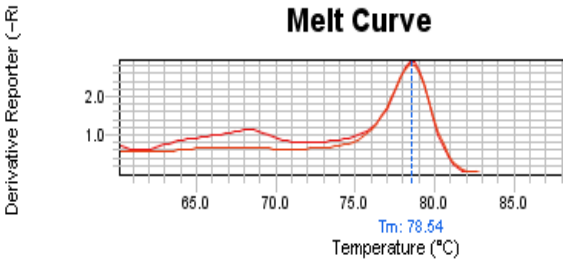
به منظور بررسی پیامدهای عملکرد متیلاسیون در ناحیه پروموتری ژن *P15*، بیان ژن با استفاده از Real Time به روش محاسباتی ΔΔCT مورد بررسی قرار گرفت که در مقایسه با افراد نرمال، بیان ژن *P15* در گروه مورد مطالعه ۰/۰۱۲-۲/۹۷ با میانگین ۰/۶۶۴بود.

جدول ۲: مشخصات خون‌شناسی و سیتوژنتیک بیماران

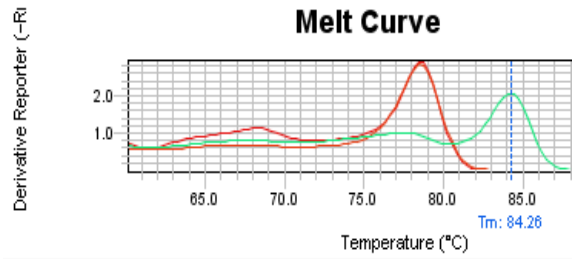
شاخص	اطلاعات
سن، تعداد بیماران(٪)	
زیر ۵۶ سال	۴۹ (۸۳/۱)
بالای ۵۶ سال	۱۰ (۱۶/۹)
جنس، تعداد بیماران(٪)	
زن	۱۷ (۲۸/۸)
مرد	۴۲ (۷۱/۲)
دسته‌بندی بر اساس FAB ، تعداد بیماران(٪)	
M1	۶ (۱۰/۲)
M2	۱۸ (۳۰/۵)
M3	۷ (۱۱/۹)
M4	۹ (۱۵/۳)
M4E	۱ (۱/۷)
M5	۸ (۱۳/۶)
M6	۳ (۵/۱)
موارد دیگر	۷ (۱۱/۹)
سایتوژنتیک، تعداد بیماران(٪)	
طبیعی	۴۰ (۶۷/۸)
غیر طبیعی	۱۹ (۳۲/۲)
طبقه‌بندی سایتوژنتیک، تعداد بیماران(٪)	
مساعد	۹ (۱۵/۳)
متوسط	۴۰ (۶۷/۷)
نامساعد	۸ (۱۳/۶)
نامشخص	۲ (۳/۴)
میانگین سن بر اساس سال	۳۶ (۸۶-۸)
میانگین شمارش سلول‌های سفید ($\times 10^9$/L)	۱۲/۸۷ (۱/۲-۲۴۵/۶)
میانگین درصد بلاست مغز استخوان	۶۷ (۱۰۰-۵)
میانگین شمارش پلاکتی ($\times 10^9$/L)	۴۰ (۳۷۱-۴)
میانگین هموگلوبین(g/dL)	۸/۵ (۱۷/۱-۳)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

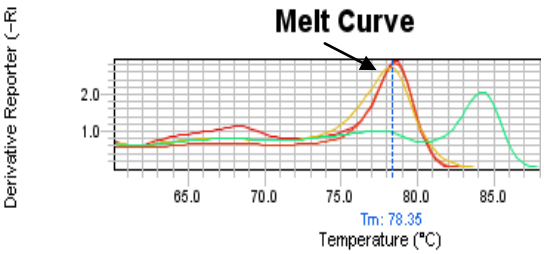
بدون در نظر گرفتن متیلاسیون و عدم متیلاسیون در ژن *P15* ، ۹۲/۹٪ بیماران وارد مطالعه شده کاهش بیان ژن *P15* را نشان دادند(۰/۹۷۱– ۰/۰۱۲). ۲۲ از ۲۴ بیماری که پروموتر ژن آن‌ها متیله بود(۹۰/۹٪) و ۳۱ از ۳۵(۸۸/۵٪) بیماری که در ژن *P15* آن‌ها متیلاسیون شناسایی نشده بود، کاهش بیان در این ژن را نشان دادند.



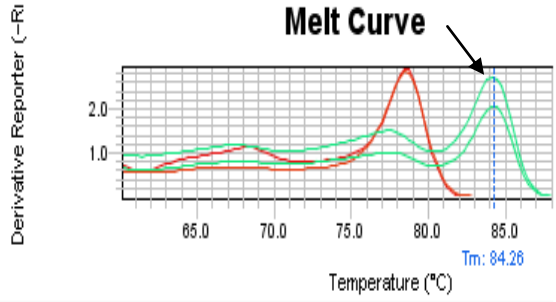
شکل۱: منحنی کنترل غیر متیله و منحنی کنترل نرمال که دقیقاً بر روی منحنی کنترل غیر متیله قرار گرفته است. Tm منحنی‌های کنترل نرمال و کنترل غیرمتیله ۷۸/۵۴°C می‌باشد.



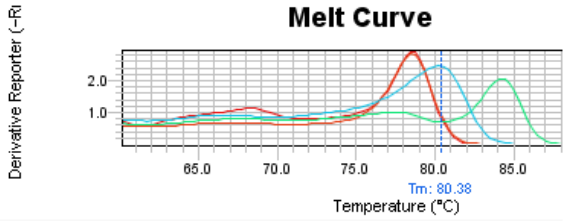
شکل۲: منحنی کنترل متیله(منحنی سمت راست) در مقایسه با کنترل‌های غیر متیله و نرمال(دو منحنی بر هم افتاده در سمت چپ). Tm کنترل متیله(سمت راست) ۸۴/۲۶ °C می‌باشد.



شکل۳: منحنی دمای ذوب بیمار در مقایسه با منحنی‌های متیله (منحنی سمت راست)، غیر متیله و کنترل نرمال(دو منحنی بر روی هم افتاده در سمت چپ). Tm منحنی ذوب بیمار(منحنی سمت چپ مشخص شده با پیکان) مشابه منحنی کنترل نرمال و کنترل غیرمتیله است.



شکل۴: منحنی ذوب بیمار(منحنی سمت راست مشخص شده با پیکان) دقیقاً منطبق بر روی منحنی کنترل متیله(منحنی سمت راست زیر آن) می‌باشد. کنترل‌های نرمال و غیر متیله در سمت چپ و دقیقاً بر روی هم قرار گرفته‌اند.



شکل۵: منحنی ذوب بیمار با دمای ذوب ۸۰/۳۸ (منحنی بین دو منحنی سمت راست و چپ). منحنی ذوب در این نمونه در مقایسه با نمودارهای کنترل نرمال و کنترل غیرمتیله (دو منحنی منطبق بر هم سمت چپ) به سمت راست شیفت نموده و در بررسی جزئی متیله در نظر گرفته می‌شود.

بدون در نظر گرفتن متیلاسیون و عدم متیلاسیون در ژن *P15* ، ۹۲/۹٪ بیماران وارد مطالعه شده کاهش بیان ژن *P15* را نشان دادند(۰/۹۷۱– ۰/۰۱۲). ۲۲ از ۲۴ بیماری که پروموتر ژن آن‌ها متیله بود(۹۰/۹٪) و ۳۱ از ۳۵(۸۸/۵٪) بیماری که در ژن *P15* آن‌ها متیلاسیون شناسایی نشده بود، کاهش بیان در این ژن را نشان دادند.

در محاسبات آماری بیمارانی که بیان ژن *P15* در آن‌ها کاهش یافته بود هیچ ارتباط معناداری بین متیلاسیون/ عدم متیلاسیون و کاهش بیان ژن به دست نیامد. در بیماران که ژن *P15* آن‌ها متیله و یا جزیی متیله بود، بین میزان متیلاسیون و میزان بیان ارتباط معناداری به دست نیامد.

بحث

یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک در غیرفعال کردن ژن‌های سرکوبگر تومور مانند P15 ARF ، CDKN2A ،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

CDKN2B متیلاسیون نواحی CPG در پروموتر ژن و توالی‌های تنظیمی این ژن‌ها می‌باشد(۲۹). CDKN2B(P15) یک ژن سرکوبگر تومور شناخته شده است که بر روی کروموزم ۹ قرار گرفته و غیرفعال شدن آن در بسیاری از تومورها و لوسمی میلوئید حاد گزارش شده است(۳۲-۳۰). در این مطالعه متیلاسیون ژن *CDKN2B* و میزان بیان این ژن در گروه ۵۹ نفری بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد مورد بررسی قرار گرفت. ۴۰/۷٪ از بیماران بدون در نظر گرفتن میزان متیلاسیون، در ناحیه پروموتری ژن افزایش متیلاسیون نسبت به افراد نرمال نشان دادند که این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعه‌های شیماموتو (۳۱/۶۱) ۵۱٪ ، گوا (۱۵/۲۹) ۵۲٪ و شاکانکری(۲۹/۵۹) ۴۹٪ تا حدودی هم‌خوانی داشت(۳۵-۳۳). میزان متیلاسیون در ژن *CDKN2B* از ۳۱٪ تا ۹۳٪ در مطالعه‌های مختلف گزارش شده است(۴۱-۳۶، ۳۱، ۱۰). این اختلافات گزارش شده در میزان متیلاسیون این ژن ممکن است به دلیل تنوع در تعداد بیماران مورد بررسی قرار گرفته و یا حساسیت روش‌های به کار رفته در روش تشخیص باشد(۴۲، ۴۰، ۳۲).

در بررسی ناحیه پروموتری ژن *P15* در بیماران وارد مطالعه شده در تمام زیر گروه‌های FAB به غیر از M6 ، تغییرات الگوی متیلاسیون دیده شد. بیشترین فرکانس موتاسیون به ترتیب در M2 ۶۴/۲٪، M5 ۴۲/۹٪، M1 ۴۰٪ بوده در حالی که فرکانس متیلاسیون در M3 ۲۸/۵٪ و در M4 ۲۲/۲٪ بود. نتایج حاصله از این تحقیق مشابه نتایج به دست آمده در مطالعه شاکانکری بود ولی با نتایج تحقیقات دیگر کمی متفاوت بود. تفاوت در نتایج به دست آمده از مطالعه‌های مختلف در جمعیت‌های گوناگون ممکن است به دلیل تعداد کم بیماران در هر زیر گروه FAB و روش‌های به کار رفته در مطالعه‌ها باشد(۴۱، ۴۰، ۳۸، ۳۲). تغییر الگوی متیلاسیون در پروموتر ژن *P15* در بیش از ۵۰٪ افراد مبتلا به بیماری لوسمی میلوئید حاد گزارش شده است. هم چنین در بررسی‌های صورت گرفته ارتباط معناداری بین درصد بلاست و میزان متیلاسیون *P15* گزارش شده است(۴۳). ۶۷/۸٪ بیماران وارد مطالعه شده دارای بلاست بیش از ۵۰٪ در مغز استخوان خود بوده و نتایج حاصل از بررسی این مطالعه رابطه معناداری بین درصد بلاست و متیلاسیون نشان داد(p= ۰/۰۰۷).

در مقایسه با افراد نرمال، بیان ژن *P15* در گروه مورد مطالعه در گستره‌ی ۲/۹۷-۰/۰۱۲ با میانگین ۰/۶۶۴بود. (۵۴ از ۵۹) ۹۲/۹٪ بیماران وارد مطالعه شده کاهش بیان ژن *P15* را نشان دادند(۰/۹۷۱-۰/۰۱۲). این گروه شامل ۲۲ بیمار از ۲۴ بیماری که پروموتر ژن آن‌ها متیله و ۳۱ از ۳۵ بیماری که پروموتر ژن *P15* آن‌ها غیرمتیله بود، بودند. در جمعیت ۹۲/۹٪ که کاهش بیان داشتند، هیچ ارتباط معناداری بین متیلاسیون/ عدم متیلاسیون و کاهش بیان ژن به دست نیامد(p= ۰/۰۶۲) به علاوه ارتباط معناداری بین میزان بیان ژن و میزان متیلاسیون(متیلاسیون و پارشیال متیلاسیون) وجود نداشت(p= ۰/۶۰۲). پریسلر و همکاران در مطالعه‌هایی که بر روی متیلاسیون و بیان ژن *P15* در بیماران مبتلا به AML انجام دادند، به نتایج مشابه رسیدند(p= ۰/۰۸)، اما به دلیل این که p< ۰/۱ را نتایج قابل قبول می‌دانستند، رابطه معنادار بین متیلاسیون و بیان ژن *P15* را گزارش کردند(۴۴).

این یافته که تقریباً همه بیمارانی که در ژن *P15* خود متیلاسیون نشان دادند کاهش بیان داشتند، این نکته را تایید می‌کند که متیلاسیون در پروموتر ژن‌ها به عنوان یکی از مکانیسم‌های کاهش بیان ژن می‌باشد که مشابه با یافته‌های حاصل از مطالعه‌های گذشته است(۴۵، ۳۷، ۳۵-۳۲، ۲۶-۲۳). ۳۱ نفر از ۳۵ بیمار کاهش بیان ژن *P15* بدون افزایش متیلاسیون در این ژن را نشان دادند که می‌تواند بیانگر این باشد که مکانیسم‌های دیگر اپی‌ژنتیک مانند تغییرات هیستونی و RNA غیر کدکننده در بیان ژن *P15* نقش داشته و از سویی دیگر باید نقش سایر ژن‌ها اعم از ژن‌های القاکننده مانند TGF بتا و ژن‌های تنظیم‌گر در بیان ژن *P15* را نیز در نظر گرفت(۵۰-۴۶). حساسیت روش‌های به کار رفته در تشخیص متیلاسیون ژن و گسترش گروه مورد مطالعه نیز در تائید یافته‌ها تاثیرگذار است(۵۲، ۵۱).

در ۲ بیمار از ۲۴ بیمار با وجود تغییرات متیلاسیون در ژن *P15* ، افزایش بیان این ژن دیده شد. هاپفرو همکاران در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به سندروم دیسپلازی میلوئیدی بر روی ژن *P16* ، *P73* ، *DAPK* و *P15* انجام

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

دادند در تعدادی از بیماران با وجود متیلاسیون در پروموتر ژن *P16* افزایش بیان را مشاهده نمودند. و دلایل افزایش بیان با وجود متیلاسیون را اینگونه ذکر کردند: ۱- ممکن است متیلاسیون در پروموتر ژن در سلول‌های مختلف ناهمگن باشد و سلول‌هایی که *P16* آن‌ها به‌گونه‌ای متیله است که با اکثریت سلول‌های غالب متفاوت است در این بیماران وجود داشته باشد. ۲- هایپر متیلاسیون تنها یکی از روش‌های کنترل بیان است(۵۳).

نتیجه‌گیری

بیان ژن *P15* بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد وارد مطالعه شده در مقایسه با افراد نرمال کاهش یافته بود اما بین میزان بیان ژن در این بیماران با متیلاسیون یا عدم متیلاسیون این ژن ارتباط معنی‌داری یافت نشد. این نتیجه بیانگر این امر است که متیلاسیون با کاهش بیان همراه است ولی تنها دلیل کاهش بیان نبوده و دیگر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک مانند تغییرات هیستونی نیز در تنظیم بیان ژن *P15* ممکن است نقش داشته باشد. مقایسه ناحیه پروموتری این ژن در افراد نرمال و افراد مبتلا به لوسمی میلوئید حاد نشان داد که در افراد سالم، ناحیه پروموتری این ژن هیستون H3 که لیزین شماره ۹ و ۱۴ آن استیله است (H3/ k9/k14) احاطه شده است، در حالی که در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد، این ناحیه با هیستون H3 که لیزین شماره ۹ و ۱۴ آن استیله و لیزین ۹ آن علاوه بر استیله بودن دی‌متیله و تری‌متیله نیز می‌باشد احاطه شده است. از سویی دیگر تفاوت در تغییرات هیستونی در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد با الگوی ناحیه پروموتری متیله ژن *P15* و غیر متیله این ژن نیز وجود دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که میزان و محتوای متیلاسیون لیزین شماره ۲۷ و لیزین ۴ هیستون ۳ در فعال‌سازی این ژن و یا کاهش بیان آن نقش داشته، هم چنین کاهش بیان این ژن با دی و تری‌متیلاسیون لیزین ۹ هیستون ۳ همراه است(۵۳). از سویی دیگر نقش سایر ژن‌ها اعم از ژن‌های القا کننده بیان مانند TGF بتا، ژن‌های تنظیم‌گر بیان و وجود پلی‌مورفیسم‌هایی تاثیرگذار بر بیان این ژن را باید در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از همکاری محسن کریمی ارزنانی، شهربانو رستمی، حبیبه قدیمی، بهرام چاردولی، نوشین نعیمی، آرزو اودی، مینا نوسعید تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1- Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. Chem Biol Interact 2010; 184(1-2): 16-20.
2- Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, *et al*. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties .Blood 1998; 92(7): 2322-33.
3- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet 2003; 33 Suppl: 245-54.
4- Ehrlich M, Woods CB, Yu MC, Dubeau L, Yang F, Campan M, *et al*. Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. Oncogene 2006; 25(18): 2636-45.
5- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, *et al*. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet 2005; 37(4): 391-400.
6- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, *et al*. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. Nucleic Acids Res 1983; 11(19): 6883-94.
7- Jost JP, Oakeley EJ, Zhu B, Benjamin D, Thiry S, Siegmann M, *et al*. 5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation. Nucleic Acids Res 2001; 29(21): 4452-61.
8- Seedhouse CH, Das-Gupta EP, Russell NH. Methylation of the hMLH1 promoter and its association with microsatellite instability in acute myeloid leukemia. Leukemia 2003; 17(1): 83-8.
9- Oki Y, Issa JP. Epigenetic mechanisms in AML - a target for therapy. Cancer Treat Res 2010; 145: 19-40.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

10- Galm O, Wilop S, Luders C, Jost E, Gehbauer G, Herman JG, *et al*. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. Ann Hematol 2005; 84 Suppl 1: 39-46.
11- Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, *et al*. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. Blood 2009; 113(6): 1315-25.
12- Ekmekci CG1, Gutiérrez MI, Siraj AK, Ozbek U, Bhatia K. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. Am J Hematol 2004; 77(3): 233-40.
13- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med 2003; 349(21): 2042-54.
14- Alvarez S, Suela J, Valencia A, Fernandez A, Wunderlich M, Agirre X, *et al*. DNA methylation profiles and their relationship with cytogenetic status in adult acute myeloid leukemia. PloS One 2010; 5(8): e12197.
15- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Res 2001; 61(8): 3225-9.
16- Kuipers JE, Coenen EA ,Balgobind BV, Stary J, Baruchel A, de Haas V, *et al*. High IGSF4 expression in pediatric M5 acute myeloid leukemia with t(9;11)(p22;q23). Blood 2011; 117(3): 928-35.
17- Rodrigues EF, Santos-Reboucas CB, Goncalves Pimentel MM, Mencalha AL, Dobbin J ,Da Costa ES, *et al*. Epigenetic alterations of *P15*(INK4B) and p16(INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome. Leuk Lymphoma 2010; 51(10): 1887-94.
18- Cao J, Zhou J, Gao Y, Gu L, Meng H, Liu H, *et al*. Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study. Clin Cancer Res 2009; 15(16): 5178-83.
19- Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Tamiya S, Takahira T, *et al*. Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. J Pathol 2003; 201(3): 487-95.
20- Oda Y, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, Kawaguchi K, Tateishi N, *et al*. Frequent alteration of p16(INK4a)/p14(ARF) and p53 pathways in the round cell component of myxoid/round cell liposarcoma: p53 gene alterations and reduced p14(ARF) expression both correlate with poor prognosis. J Pathol 2005; 207(4): 410-21.
21- Perrone F, Tamborini E, Dagrada GP, Colombo F, Bonadiman L, Albertini V, *et al*. 9p21 locus analysis in high-risk gastrointestinal stromal tumors characterized for c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha gene alterations. Cancer 2005; 104(1): 159-69.
22- Fares J, Koller R, Humeniuk R, Wolff L, Bies J. The tumor suppressor *P15*Ink4b regulates the differentiation and maturation of conventional dendritic cells. Blood 2012; 119(21): 5005-15.
23- Hannon GJ, Beach D. *P15*INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. Nature 1994; 371(6494): 257-61.
24- Krimpenfort P, Ijpenberg A, Song JY, van der Valk M, Nawijn M, Zevenhoven J, *et al*. *P15*Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. Nature 2007; 448(7156): 943-6.
25- Latres E, Malumbres M, Sotillo R, Martin J, Ortega S, Martin-Caballero J, *et al*. Limited overlapping roles of *P15*(INK4b) and P18(INK٤c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. EMBO J 2000; 19(13): 3496-506.
26- Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes *P15*, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. Leukemia 1998; 12(6): 845-59.
27- R Remáková M1, Škoda M, Faustová M, Vencovský J, Novota P. Validation of RNA extraction procedures focused on micro RNA expression analysis. Folia Biol (Praha) 2013; 59(1): 47-50.
28- Eikmans M, Rekers NV, Anholts JD, Heidt S, Claas FH. Blood cell mRNAs and microRNAs: optimized protocols for extraction and preservation. Blood 2013; 121(11): e81-9.
29- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res 1998; 72: 141-96.
30- Blum W, Marcucci G. Targeting epigenetic changes in acute myeloid leukemia. Clin Adv Hematol Oncol 2005; 3(11): 855-65, 882.
31- Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochim Biophys Acta 1998; 1378(2): F115-77.
32- Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. Aberrant *P15* promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. Blood 2000; 95(6): 1942-9.
33- El-Shakankiry NH, Mossallam GI. *P15* (INK4B) and E-cadherin CpG island methylation is frequent in Egyptian acute myeloid leukemia. J Egypt Natl Canc Inst 2006; 18(3): 227-32.
34- Guo SX, Taki T, Ohnishi H, Piao HY, Tabuchi K, Bessho F, *et al*. Hypermethylation of p16 and *P15* genes and RB protein expression in acute leukemia. Leuk Res2000; 24(1): 39-46.
35- Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Methylation of P15(INK4b) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. Leuk Res 2005; 29(6): 653-9.
36- Aggerholm A, Guldberg P, Hokland M, Hokland P. Extensive intra- and interindividual heterogeneity of *P15*INK4B methylation in acute myeloid leukemia. Cancer Res 1999; 59(2): 436-41.
37- Chen H, Wu S. Hypermethylation of the *P15*(INK4B) gene in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. Chin Med J (Engl) 2002; 115(7): 987-90.
38- Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL. Methylation of *P15* and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. J Clin Oncol 2001; 19(7): 2033-40.
39- Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of INK4/CDK/RB cell cycle pathway in acute leukemias. Ann Hematol 2003; 82(12): 738-42.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

40- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of *P15*INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Leukemia 2003; 17(9): 1813-9.
41- Das-Gupta EP, Russell NH. Anticorresponding *P15* promoter methylation and microsatellite instability in acute myeloblastic leukemia. Blood. 2000; 96(5): 2002.
42- Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, *et al*. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. Cancer Res 1999; 59(21): 5438-42.
43- Kim M, Oh B, Kim SY, Park HK, Hwang SM, Kim TY, *et al*. *P15*INK4b methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndromes in a dose dependent manner: quantitation using pyrosequencing study. Leuk Res 2010; 34(6): 718-22.
44- Preisler HD, Li B, Chen H, Fisher L, Nayini J, Raza A, *et al*. *P15*INK4B gene methylation and expression in normal, myelodysplastic, and acute myelogenous leukemia cells and in the marrow cells of cured lymphoma patients. Leukemia 2001; 15(10): 1589-95.
45- Sakashita K, Koike K, Kinoshita T, Shiohara M, Kamijo T, Taniguchi S, *et al*. Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of *P15* during human myeloid development. J Clin Invest 2001; 108(8): 1195-204.
46- Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk .PLoS Genet 2010; 6(12): e1001233.
47- Popov N, Gil J. Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. Epigenetics 2010; 5(8): 685-90.
48- Yu W, Gius D, Onyango P ,Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, *et al*. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene *P15* by its antisense RNA. Nature 2008; 451(7175): 202-6.
49- Basu S, Liu Q, Qiu Y, Dong F. Gfi-1 represses CDKN2B encoding *P15*INK4B through interaction with Miz-1. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(5): 1433-8.
50- Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massague J. TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor *P15*INK4b. Nat Cell Biol 2001; 3(4): 400-8.
51- Kristensen LS, Hansen LL. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. Clin Chem 2009; 55(8): 1471-83.
52- Li Y, Tollefsbol TO. Combined chromatin immunoprecipitation and bisulfite methylation sequencing analysis. Methods Mol Biol 2011; 791: 239-51.
53- Geyer CR. Strategies to re-express epigenetically silenced *P15*(INK4b) and p21(WAF1) genes in acute myeloid leukemia. Epigenetics 2010; 5(8): 696-703.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014; 11(2): 137-146

Original Article

Frequency of *P15* /INK4B CpG island methylation in AML patients

Kamali Dolatabadi E.[1], Ostadali Dehaghi M.R.[2], Amirizadeh N.[3], Parivar K.[1], Mahdian R.[4]

[1]Science and Research Branch Tehran Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Shariati Hospital, Hematology Oncology and Stem cell Transplantation Research Center, Tehran, Iran
[3]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Education and Research in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[4]Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

One of the common epigenetic pathways in all types of human haematopoeitic neoplasms is the hypermethylation promoter of tumor suppressor genes. It is usually associated with inactivation of the involved genes, and can be reversed using demethylating agents. The aim of this study was to evaluate the frequency of *P15* promoter methylation in Iranian acute myeloid leukemia (AML) patients. Furthermore, this study examined the correlation between *P15* promoter methylation and *P15* expression.

Materials and Methods

P15 promoter methylation has been investigated in 59 acute myeloid leukemia (AML) patients by melting curve analysis. *P15* mRNA expression has been analyzed using real-time PCR technique (ΔΔCT computational) to investigate the correlation between *P15* expression and *P15* promoter methylation.

Results

The aberrant methylation of the *P15* promoter was detected in 40.7% of all patients. Regardless of the methylation pattern, 92.9% of all patients showed a decrease in expression of *P15*. Out of the total number of patients, 90.9% who showed methylation of *P15* gene (22 of 24) and 88.5% (31 of 35) who did not, both illustrated reduction in *P15* expression level.

Conclusions

Despite the methylation of *P15* at a low expression level in most of the patients, no significant difference between methylated and unmethylated groups was observed.

Key words: Epigenetics, Acute Myeloid Leukemia, Methylation

Received: 13 Jul 2013
Accepted: 8 Dec 2013

Correspondence: Kamali Dolatabadi E., PhD Student of Molecular and Cellular Biology. Science and Research Branch ofIslamic Azad University.
P.O.Box: 14114, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902626; Fax : (+9821) 88004140
E-mail: *smat_kamali@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]