

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

عصمت کمالی دولت آبادی^۱، محمدرضا استاد علی دهقی^۲، ناصر امیری زاده^۳، کاظم پریور^۴، رضا مهدیان^۵

چکیده

سابقه و هدف

در بدخیمی های خونی، افزایش متیلاسیون در پروموتور ژن های سرکوبگر تومور به عنوان یکی از رخداد های شایع در مسیر اپی ژنتیک گزارش شده است که قابل بازگشت می باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی، میزان بسامد متیلاسیون پروموتور ژن P15 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد و بررسی ارتباط متیلاسیون پروموتور ژن P15 با بیان آن بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه مقطعی، بیماران مراجعه کننده به مرکز خون و انکولوژی بیمارستان شریعی، در دو بازه زمانی چهار ماهه، بعد از تایید بیماری لوسمی میلوئیدی حاد وارد مطالعه شدند. متیلاسیون پروموتور 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 $\Delta\Delta CT$ انجام شد. یافته ها توسط آزمون های کای دو و دقیق فیشر و نرم افزار SPSS ۱۸ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

۴۰/۷٪ (۲۴ از ۵۹) بیماران وارد مطالعه شده افزایش متیلاسیون پروموتور 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 اپی ژنتیک رخ داده در ژن های تنظیم گر و یا ژن های القا کننده بیان در تنظیم بیان ژن P15 نقش داشته و علاوه بر آن دیگر مکانیسم های اپی ژنتیک مانند تغییرات هیستونی در تنظیم بیان نیز دخالت دارند.

کلمات کلیدی: اپی ژنتیک، لوسمی میلوئید حاد (AML)، متیلاسیون

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۷

۱- مؤلف مسؤول: دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی با گرایش سلولی و مولکولی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات - تهران - ایران - صندوق پستی:

۱۴۱۴

۲- دکترای تخصصی ایمونولوژی - استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی - بیمارستان دکتر شریعی - تهران - ایران

۳- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- دکترای تخصصی زیست شناسی سلولی و تکوین - استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات - تهران - ایران

۵- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

مقدمه

لوسمی میلوئید حاد (Acute myeloid leukemia)، 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 (۱-۳). تغییر الگوی متیلاسیون ژن‌ها مانند افزایش متیلاسیون در پروموتور ژن‌های سرکوبگر تومور و یا کاهش متیلاسیون در سرتاسر ژن از مهم‌ترین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی می‌باشد (۴-۸). اگر چه تغییرات هیستونی نیز از مکانیسم‌های دیگر اپی‌ژنتیک بوده که مطالعه کمتری بر روی آن صورت گرفته است (۹). در واقع متیلاسیون نابه‌جا (aberrant) در ناحیه ۵' پروموتور ژن‌های سرکوبگر تومور، در بسیاری از سرطان‌ها به عنوان مهم‌ترین مکانیسم اپی‌ژنتیک یاد شده است (۱۰-۱۲). بر خلاف تغییرات ژنتیکی که غیرقابل برگشت می‌باشد، این تغییرات اپی‌ژنتیکی قابل بازگشت هستند (۱۳).

متیلاسیون سیتوزین در نواحی پالیندرومیک CpG پروموتور ژن‌ها، نقش مهمی را در خاموشی اپی‌ژنتیک ژن‌هایی مانند ESR1، IGSF4 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 کروموزوم 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 پروموتور 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 پروموتور 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 مغز استخوان بیمار، تشخیص با بررسی مارکرهای سطحی به روش فلوسیتومتری تایید شد.

استخراج DNA و بی‌سولفیت‌دهی 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 مینی کیت استخراج DNA (CA،

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

طراحی آغازگر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت بررسی منحنی ذوب:

با استفاده از نرم‌افزار (Molecular Biology Insights، آمریکا، CO و Cascade ۱/۰ software) Oligo آغازگر برای نواحی دو طرف پروموتور ژن طراحی شده و سپس با نرم‌افزارهای MethBlast و GeneRunner مورد بررسی قرار گرفت. ساختار ثانویه آغازگر با نرم‌افزار GeneRunner چک شده و دمای ذوب (Melt temperature) 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 سانتی گراد 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 بی سولفیت شده ۱۰ فرد نرمال بود. کیت کنترل متیلاسیون حاوی کنترل غیر متیله بی سولفیت شده (به عنوان کنترل ۰٪ متیله)، کنترل متیله بی سولفیت شده (به عنوان کنترل ۱۰۰٪ متیله) و DNA انسانی بی سولفیت نشده (جهت بررسی موفقیت آمیز بی سولفیت 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:

۱۰^۶ × ۲ سلول از هر بیمار در ۱ سی‌سی تریزول حل شده و RNA توتال آن 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 فرمتاز (#K1622، #K1621) و فرمتاز) 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

۰/۰۱۲-۲/۹۷ با میانگین ۰/۶۶۴ بود.

جدول ۲: مشخصات خون‌شناسی و سیتوزنتیک بیماران

اطلاعات	شاخص
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)
سایتوزنتیک، تعداد بیماران(%)	
طبیعی	۴۰ (۶۷/۸)
غیر طبیعی	۱۹ (۳۲/۲)
طبقه‌بندی سایتوزنتیک، تعداد بیماران(%)	
مساعد	۹ (۱۵/۳)
متوسط	۴۰ (۶۷/۷)
نامساعد	۸ (۱۳/۶)
نامشخص	۲ (۳/۴)
میانگین سن بر اساس سال	۳۶ (۸-۸۶)
میانگین شمارش سلول‌های سفید ($\times 10^9/L$)	۱۲/۸۷ (۱/۲-۲۴۵/۶)
میانگین درصد بلاست مغز استخوان	۶۷ (۵-۱۰۰)
میانگین شمارش پلاکتی ($\times 10^9/L$)	۴۰ (۴-۳۷۱)
میانگین هموگلوبین (g/dL)	۸/۵ (۳-۱۷/۱)

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

آزمایش‌های آماری:

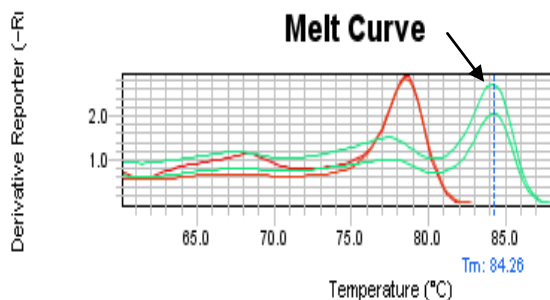
در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۸ و آزمایش‌های pearson chi square و Fishers Exact Test محاسبات آماری انجام گرفت. $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

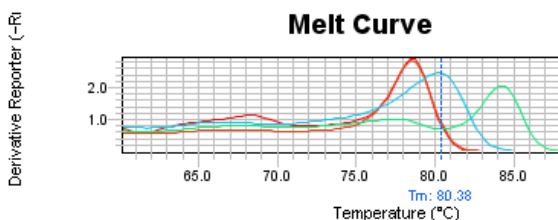
متیلاسیون پروموتور ژن *P15* و بیان آن در ۵۹ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئید حاد اولیه و ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات سیتوزنتیکی، خون‌شناسی، نوع لوسمی میلوئید حاد، سن و جنس بیماران وارد مطالعه شده در جدول ۲ آورده شده است. در گروه مورد مطالعه، ۷۱/۲٪ از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات در بازه 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 (۸-۸۶) بودند. در بررسی سیتوزنتیک، ۶۷/۸٪ (۴۰ از ۵۹) بیماران طبیعی و ۳۲/۲٪ (۱۹ از ۵۹) بیماران دارای سیتوزنتیک 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 پروموتور ژن *P15* در بیماران وارد مطالعه شده، ۴۰/۷٪ بیماران در ناحیه پروموتوری 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 جزئی متیله در نظر گرفته شد (شکل‌های ۱-۵).

به منظور بررسی پیامدهای عملکرد متیلاسیون در ناحیه پروموتوری ژن *P15*، بیان ژن با استفاده از Real Time به روش محاسباتی $\Delta\Delta CT$ مورد بررسی قرار گرفت که در مقایسه با افراد نرمال، بیان ژن *P15* در گروه مورد مطالعه



شکل ۴: 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.



شکل ۵: 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 غیر متیله (دو منحنی منطبق بر هم سمت چپ) به سمت راست شیف‌ت نموده و در بررسی جزئی متیله در نظر گرفته می‌شود.

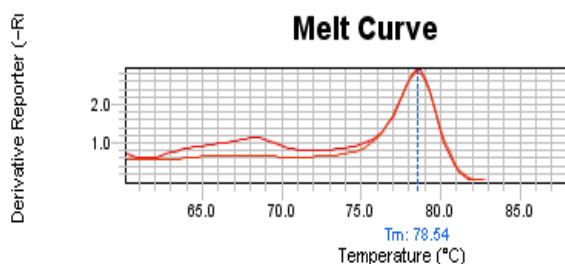
بدون در نظر گرفتن متیلاسیون و عدم متیلاسیون در ژن P15، ۹۲/۹٪ بیماران وارد مطالعه شده کاهش بیان ژن P15 را نشان دادند (۰/۹۷۱-۰/۰۱۲). ۲۲ از ۲۴ بیماری که پروموتور ژن آن‌ها متیله بود (۹۰/۹٪) و ۳۱ از ۳۵ (۸۸/۵٪) بیماری که در ژن P15 آن‌ها متیلاسیون شناسایی نشده بود، کاهش بیان در این ژن را نشان دادند.

در محاسبات آماری بیماری‌هایی 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 جزئی متیله بود، بین میزان متیلاسیون و میزان بیان ارتباط معناداری به دست نیامد.

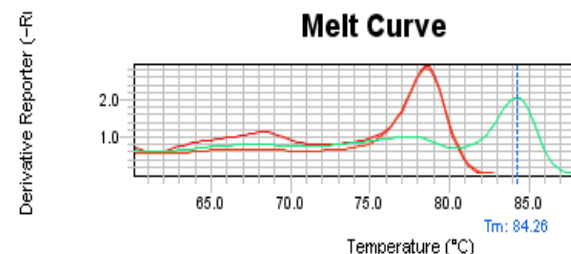
بحث

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

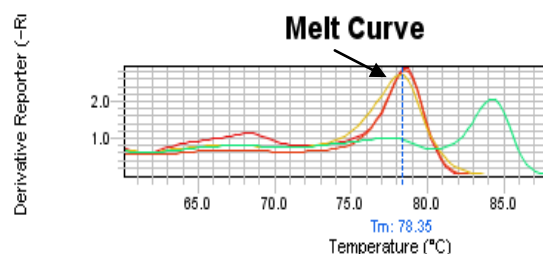
بدون در نظر گرفتن متیلاسیون و عدم متیلاسیون در ژن P15، ۹۲/۹٪ بیماران وارد مطالعه شده کاهش بیان ژن P15 را نشان دادند (۰/۹۷۱-۰/۰۱۲). ۲۲ از ۲۴ بیماری که پروموتور ژن آن‌ها متیله بود (۹۰/۹٪) و ۳۱ از ۳۵ (۸۸/۵٪) بیماری که در ژن P15 آن‌ها متیلاسیون شناسایی نشده بود، کاهش بیان در این ژن را نشان دادند.



شکل ۱: 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 غیر متیله ۷۸/۵۴°C می‌باشد.



شکل ۲: 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.



شکل ۳: 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 غیر متیله است.

نتایج حاصل از بررسی این مطالعه رابطه معناداری بین درصد بلاست و متیلاسیون نشان داد ($p=0/007$).

در مقایسه با افراد نرمال، بیان ژن P15 در گروه مورد مطالعه در گستره ۲/۹۷-۰/۱۲ با میانگین ۰/۶۶۴ بود. (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 پروموتور ژن آن‌ها متیله و ۳۱ از ۳۵ بیماری که پروموتور 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 ($p=0/062$) به علاوه ارتباط معناداری بین میزان بیان ژن و میزان متیلاسیون (متیلاسیون و پارشیال متیلاسیون) وجود نداشت ($p=0/062$). پریسلر و همکاران در مطالعه‌هایی که بر روی متیلاسیون و بیان ژن P15 در بیماران مبتلا به AML انجام دادند، به نتایج مشابه رسیدند ($p=0/08$)، اما به دلیل این که $p < 0/1$ 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 پروموتور 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 تایید 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

CDKN2B متیلاسیون نواحی CPG در پروموتور 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 پروموتوری 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 (۳۳-۳۵). میزان متیلاسیون در ژن CDKN2B از ۳۱٪ تا ۹۳٪ در مطالعه‌های مختلف گزارش شده است (۳۶-۴۱، 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 پروموتوری 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 پروموتور 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

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 استیل و لیزین ۹ آن علاوه بر استیل بودن دی‌متیل و تری‌متیل نیز می‌باشد احاطه شده است. از سویی دیگر تفاوت در تغییرات هیستونی در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد با الگوی ناحیه پروموتری متیل 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 القاکننده بیان مانند TGF β ، ژن‌های تنظیم‌گر بیان و وجود پلی‌مورفیسم‌هایی تاثیرگذار بر بیان این ژن را باید در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از همکاری محسن کریمی ارزانی، شهربانو رستمی، حبیه قدیمی، بهرام چاردولی، نوشین نعیمی، آرزو اودی، مینا نوسعید تشکر و قدردانی می‌نمایند.

دادند در تعدادی از بیماران با وجود متیلاسیون در پروموتور ژن P16 افزایش بیان را مشاهده نمودند. و دلایل افزایش بیان با وجود متیلاسیون را اینگونه ذکر کردند: ۱- ممکن است متیلاسیون در پروموتور ژن در سلول‌های مختلف ناهمگن باشد و سلول‌هایی که P16 آن‌ها به‌گونه‌ای متیل 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 استیل

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, Siegmund 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.

- 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 P15Ink4b regulates the differentiation and maturation of conventional dendritic cells. *Blood* 2012; 119(21): 5005-15.
- 23- Hannon GJ, Beach D. P15INK4B 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.* P15Ink4b 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(INK4c) 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 Res* 2000; 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 P15INK4B 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.

- 40- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of *P15INK4B* 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.* *P15INK4b* 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.* *P15INK4B* 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 *P15INK4B* 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 *P15INK4b*. *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.

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

¹Science and Research Branch Tehran Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Shariati Hospital, Hematology Oncology and Stem cell Transplantation Research Center, Tehran, Iran

³Blood Transfusion Research Center, High Institute for Education and Research in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

⁴Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

One of the common epigenetic pathways in all types of human haematopoietic 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 ($\Delta\Delta CT$ 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 of Islamic Azad University.

P.O.Box: 14114, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902626; Fax : (+9821) 88004140

E-mail: smat_kamali@yahoo.com