خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۰ شماره ۱ بهار ۹۲ (۳۹-۳۱)

مقاله پژوهشی

ارزیابی الگوی متیلاسیون در نواحی پروموتوری دو ژن P15 و P16 و وضعیت بیان این فاکتورها در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ خون بند ناف

مهدی آزاد[۱]، سعید کاویانی[۲]، یوسف مرتضوی[۳]، مهرداد نوروزی‌نیا[۴]، مسعود سلیمانی[۵]،
سعید آبرون[۶]، زهرا ذنوبی[۷]، امیر آتشی[۶]

چکیده

سابقه و هدف

عناصر پیامدهی داخل سلول نظیر P15 و P16 ، نقش به سزایی در تمایز سلول‌های اولیه به گونه‌های سلولی متنوع، ایفا می‌کنند. فاکتورهای مذکور توسط مکانیسم‌های مختلفی در کنترل بیان ژن دخیلند که در بین آن‌ها، اپی‌ژنتیک به خصوص متیلاسیون قابل ذکر است. اهداف اصلی در این مطالعه، پی بردن به وضعیت بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ بند ناف و تعیین تغییرات متیلاسیون ژن‌های مورد نظر در همین مرحله بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پس از جمع‌آوری کیسه‌های خون بند ناف و تخلیص و ازدیاد سلول‌های بنیادی، ژنوم سلولی جدا شد. در مراحل بعد به ترتیب از RNA و DNA سلول‌های اولیه، cDNA و Bisulfite treated DNA ساخته شد. در ادامه نیز برای هر دو ژن، واکنش‌های PCR و Methylation Specific PCR انجام گرفت.

یافته‌ها

پس از انجام MSP ، مشخص شد که P15 دارای متیلاسیون و بیان نسبی در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ بوده و ژن دیگر یعنی P16 نیز فاقد متیلاسیون در این مرحله و دارای بیان کامل است. نتایج PCR ، نشان‌دهنده بیان هر دو ژن انتخاب شده، در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ می‌باشد.

نتیجه گیری

همواره، الگوی بیان ژن توسط هر بافت یا هر سلول، متناسب با عملکردهای آن می‌باشد. بیان مشخص P15 و P16 نیز، می‌تواند بیانگر نقش آن‌ها در بیولوژی سلول‌های بنیادی $CD34^+$ خون بند ناف باشد. همواره هم‌خوانی قابل توجهی میان بیان یک ژن و تغییرات اپی‌ژنتیک وجود دارد.

کلمات کلیدی: متیلاسیون، سلول‌های بنیادی، بند ناف

تاریخ دریافت : ۹۱/۱/۱۹
تاریخ پذیرش : ۹۱/۴/۲۸

۱- دانشجوی دکترای هماتولوژی و بانک خون ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD هماتولوژی ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان ـ زنجان ـ ایران
۴- PhD ژنتیک پزشکی ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۵- PhD هماتولوژی ـ دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۶- PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۷- متخصص زنان و زایمان ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مطالعه‌های انجام شده روی مکانیسم‌های شکل‌گیری گونه‌های مختلف سلولی در محیط‌های آزمایشگاهی خارج از بدن، منجر به دست‌یابی بشر به مفاهیم پایه در ارتباط با مکانیسم‌های عمومی کنترل نسخه‌برداری و تنظیم بیان ژن شده است(۵-۱). در واقع، فرآیندهای تمایزی در سلول‌های ابتدایی، شدیداً وابسته به کنترل بیان ژن و نظارت دقیق بر پیامدهی داخل سلول می‌باشند که مرتبط با آن، نیاز مبرم و مسجل سلول به فاکتورهای کنترلی خاص نظیر سیتوکین‌ها، فاکتورهای نسخه‌برداری ویژه، عناصر کنترل‌کننده چرخه سلولی، تکثیر و آپوپتوز، کاملاً موجه خواهد بود(۸-۶).

دو مورد از این فاکتورهای حیاتی که در گروه پروتئین‌های سرکوبگر تومور دسته‌بندی می‌شوند عبارتند از مهارگر کینازهای وابسته به سایکلین نوع 2A و 2B که به ترتیب P16 و P15 نامیده می‌شوند. P16 ، در دسته عناصر سرکوبگر تومور و نیز عوامل کنترل‌کننده چرخه سلولی قرار می‌گیرد(۹). پر رنگ شدن نقش P16 در خونسازی به یک مطالعه در سال ۲۰۰۳ توسط مینامی و همکارانش بر می‌گردد که در آن تحقیق، نشان داده شد که p16 قادر به کنترل تمایز و آپوپتوز در رده‌های اریتروبید می‌باشد(۱۰). پروتئین‌های کینازی CDK-4 و CDK-6 ، که توسط P16 مهار می‌شوند، قادرند پروتئینی به اسم mdm 2 را در حالت طبیعی فعال کنند. mdm 2 ، خود یک مهارگر بالقوه برای P53 می‌باشد و P53 نیز در واقع یکی از پروتئین‌های نظارت‌کننده بر چرخه سلولی است. بنابراین در حضور P16 ، به صورت زنجیره‌وار، P53 نیز سالم مانده و مانع از ایجاد تومور در بدن می‌شود(۱۱).

ژن‌های مربوط به P15 و P16 ، هم‌جوار با یکدیگر و روی کروموزوم ۹ قرار دارند و حذف آن‌ها در اکثر تومورها با هم رخ می‌دهد(۱۳-۱۱). محصول ژن P15 نیز، یک پروتئین سرکوبگر تومور می‌باشد که به طور بالقوه، کمپلکس سایکلین D را با کینازهای CDK4 و CDK6 مهار کرده و به این ترتیب، چرخه سلولی را در نقطه G_1 کنترل می‌نماید(۱۵، ۱۴).

این دو فاکتور، با توجه به بیان آن‌ها، می‌بایست نقش مهمی در کنترل و تغییر الگوی ژنی سلول‌های بنیادی داشته باشند که از مکانیسم‌های کنترلی آن‌ها نیز می‌توان اپی‌ژنتیک را نام برد. اپی‌ژنتیک مساله مهمی است که امروزه به عنوان یکی از مسیرهای کنترل بیان ژن معرفی شده و به تغییر در بیان ژن بدون تغییر پایه در سکوئنسینگ اطلاق می‌گردد(۱۸-۱۶).

یکی از مکانیسم‌های مهم و تاثیرگذار اپی‌ژنتیک، متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن‌هاست که خاموش شدن ژن‌های مورد نظر را در پی دارد(۲۰، ۱۹).

اپی‌ژنتیک و مکانیسم‌های آن نظیر متیلاسیون و استیلاسیون، در واقع قادرند مراحل تکثیر و تمایز را در گروهی از سلول‌ها و بافت‌های ویژه، دست‌کاری کنند(۲۲، ۲۱).

با توجه به این که الگوی متیلاسیون و وضعیت بیان P15 و P16 به عنوان فاکتورهای مؤثر در کنترل تکثیر و تمایز سلولی، در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف، تاکنون مشخص نشده است، در این مطالعه به این امر پرداخته و الگوی بیان ژن‌های ذکر شده در سلول‌های بنیادی تخلیص شده از خون بند ناف، مورد ارزیابی قرار گرفت و در مرحله دوم نیز الگوی متیلاسیون این دو فاکتور سرکوبگر تومور مورد بررسی و آزمون قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادین $CD34^+$:

در یک مطالعه تجربی، در چندین مرحله کیسه‌های خون بند ناف از بیمارستان صارم و سازمان انتقال خون تهران تهیه شد. در گام بعدی، سلول‌های $CD34^+$ با استفاده از کیت Indirect CD34 MicroBead شرکت میلتن بیوتک و روش جداسازی سلولی با آنتی‌بادی منوکلونال(MACS) و طبق دستورالعمل کیت، تخلیص شد.

سپس با استفاده از محیط Stem Span که از قبل به آن فاکتورهای رشد Flt3 ، TPO و SCF ، با غلظت نهایی ۵۰ ng/mL اضافه شده بود، سلول‌های جدا شده را یک تا دو روز تکثیر داده و در نهایت پس از شست و شو با بافر PBS ، جهت ادامه آزمون‌ها از محیط جداسازی کردیم.

www.SID.ir

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در روش RT-PCR

Oligo name	توالی
P15-F	GGGAAAGAAGGGAAGAGTGTCGTT
P15-R	GCATGCCCTTGTTCTCCTCG
P16-F	GGGGGACCAGAGGCAGT
P16-R	GGTTGTGGCGGGGGCAGTT

جدول ۲: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در روش MSP

ژن	سایز (bp)	چرخه	دما (درجه سانتی‌گراد)	نوع آغازگر	توالی '5 to 3'
P15	۲۴۹	۳۸	۵۰	UF	TGT GAT GTG TTT GTA TTT TGT GGT T
				UR	CCA TAC AAT AAC CAA ACA ACC AA
	۲۳۷	۳۸	۶۰	MF	GCG TTC GTA TTT TGC GGT T
				MR	CGT ACA ATA ACC GAA CGA CCG A
P16	۱۵۱	۳۵	۶۰	UF	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT
				UR	CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A
	۱۵۰	۳۵	۶۵	MF	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC
				MR	GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA

جداسازی DNA و RNAی سلول‌های تکثیر شده:

DNA و RNAی سلول‌های مورد نظر با کیت‌های تخلیص DNA و RNA کیاژن، بر اساس دستورالعمل‌های کیت، جداسازی شده و جهت ادامه آزمون‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش بیان ژن‌های مورد مطالعه با روش RT-PCR:

در این مرحله، سنتز cDNA با کیت کیاژن و با استفاده از RNA ذخیره شده در مراحل قبلی بر اساس دستورالعمل کیت، انجام شد و با آغازگرهای سفارش داده شده جهت بررسی بیان ژن، واکنش PCR برای هر ژن به طور جداگانه انجام گرفت(جدول ۱). دمای آنیلینگ مناسب برای این آغازگرها، ۶۰-۵۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و برای دیگر مواد موردنیاز هم از Taq PCR Master mix کیاژن استفاده شد.

پردازش DNA و انجام واکنش MSP جهت سنجش الگوی متیلاسیون:

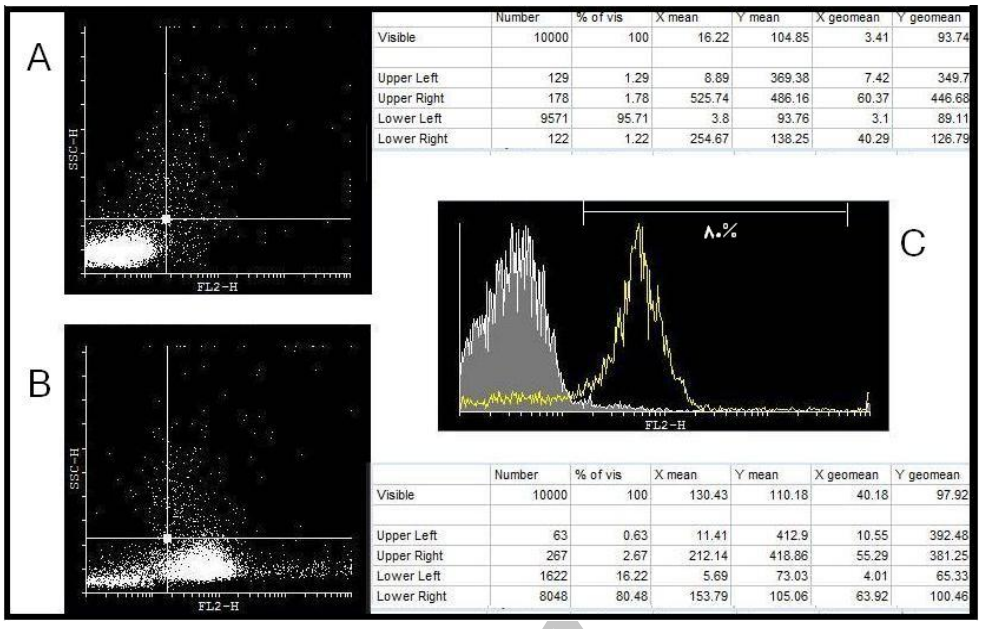
در مرحله اول، DNA ذخیره شده از مراحل قبل با کیت EpiTect ® Bisulfite کیاژن و طبق دستورالعمل کیت تحت پردازش قرار گرفت و برای استفاده درMSP (Methylation-Specific PCR) آماده شد. در مرحله بعد، با استفاده از DNA پردازش شده، واکنش MSP برای هر ژن به طور جداگانه انجام شد(جدول ۲). دمای آنیلینگ مناسب برای این آغازگرها، از ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد متغیر می‌باشد.

یافته‌ها

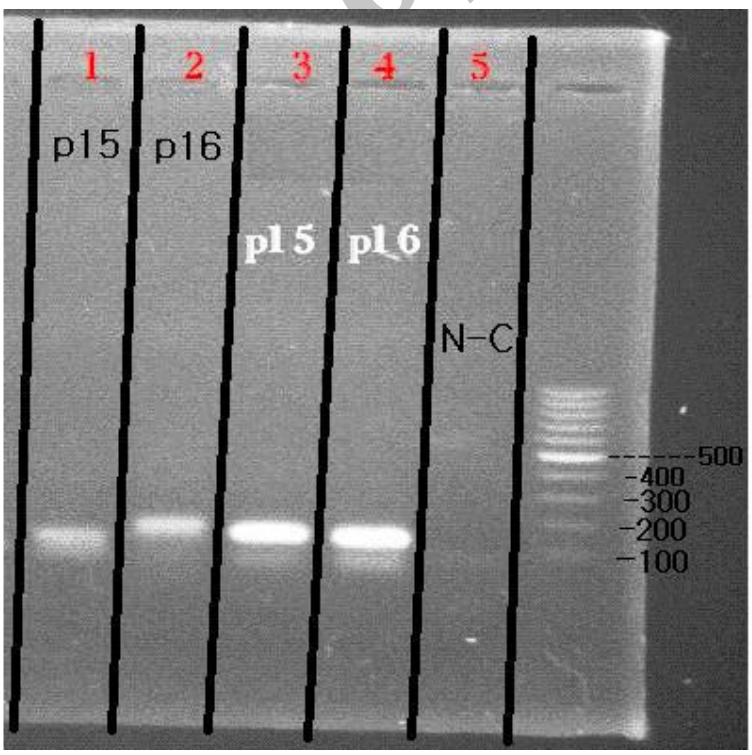
نتایج فلوسیتومتری برای میزان خلوص سلول‌های هماتوپویتیک جدا شده از خون بند ناف با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال CD34 و دستگاه فلوسیتومتر BD، به دست آمد(شکل ۱). رنگ فلورسنت مورد استفاده برای نشاندار کردن آنتی‌بادی در این مرحله برای CD34 ، فیکو اریترین می‌باشد. نرم‌افزار مورد استفاده برای تفسیر داده‌های فلوسیتومتری، Cyflogic است. تصویر A-۱ مربوط به کنترل ایزوتیپ و تصویر B-۱ نیز مربوط به آنتی‌بادی CD34 می‌باشد. تصویر C-۱ میزان خلوص ۸۰ درصدی را در سلول‌های جدا شده از خون بند ناف نشان می‌دهد.

در ادامه، cDNA تهیه شده از ژنوم سلول‌های بنیادی، با روش RT-PCR جهت سنجش بیان یا عدم بیان ژن‌های مورد مطالعه در سلول‌های هماتوپویتیک بند ناف، پس از تخلیص و تکثیر، مورد آزمون قرار گرفتند. طول باند DNA برای محصولات PCR برای P15 و P16 تقریباً در یک

Archive of SID
www.SID.ir

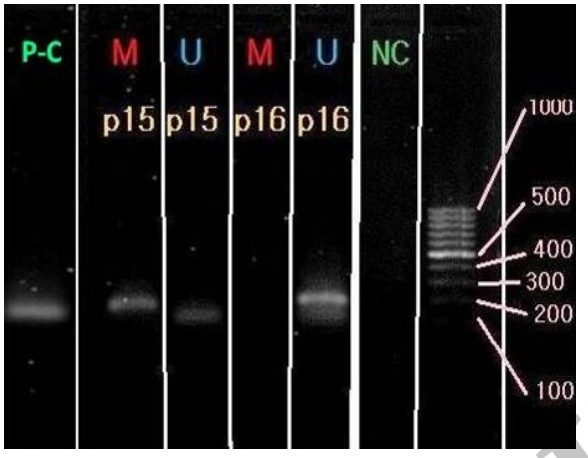


شکل ۱: میزان بیان مارکر CD34 ، بر روی سلول‌های هماتوپویتیک که از خون بند ناف جدا شده است.



شکل ۲: ژل آگاروز ۱/۵٪ است که باندهای قابل مشاهده در آن نشان‌دهنده محصولات واکنش PCR برای ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد. N-C بیانگر کنترل منفی می‌باشد (واکنشی که در آن از نمونه cDNA، استفاده نشده است). باندهای مربوط به خانه‌های یک و سه مربوط به ژن P15 می‌باشند که در دو دمای آنیلینگ متفاوت به صورت گرادیان گذاشته شده است. باندهای مربوط به خانه‌های دو و چهار نیز مربوط به ژن P16 می‌باشند که در دو دمای آنیلینگ متفاوت به صورت گرادیان گذاشته شده است. با توجه به شکل، هر دو فاکتور مورد مطالعه در این تحقیق، در سلول‌های بنیادی مورد نظر، کم و بیش بیان می‌شوند.

www.SID.ir



شکل ۳: ژل آگاروز ۱/۵٪ که باندهای قابل مشاهده در آن نشان‌دهنده محصولات واکنش PCR برای حالت‌های متیله یا غیر متیله ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق است.

محدوده و به ترتیب ۱۰۴ bp و ۱۵۹ bp می‌باشد.

در این مرحله از تحقیق، محصولات PCR برای ثبت باند مربوط به هر ژن، روی ژل تهیه شده از پودر آگاروز بارگذاری شد. سپس ژل مورد نظر برای مشاهده باند، زیر نور UV قرار گرفت. شکل ۲، که توسط دستگاه Biometra Gel Doc ثبت شده است، مشخص‌کننده وجود باند در همه چاهک‌های ژل بوده و بیان ژن‌های مربوطه را در سلول‌های بنیادی مورد نظر نشان می‌دهد.

همان‌طور که ذکر شد، با آغازگرهای طراحی شده جهت استفاده در Real Time PCR و نیز cDNA سنتز شده از ژنوم سلول‌های بنیادی پس از تکثیر، واکنش PCR برای هر دو ژن انجام شد. با توجه به مشروحات بالا، مشاهده باند در این مرحله در هر صورت نشان‌دهنده بیان ژن مورد نظر در سلول هماتوپویتیک است و با توجه به این که در همه خانه‌های ژل در این مرحله، باند DNA ، در همان محدوده قابل انتظار مشاهده می‌شود، می‌توان به این نتیجه رسید که هر دو فاکتور مورد مطالعه در این تحقیق، در الگوی بیان ژنی سلول‌های بنیادی $CD34^+$ بند ناف وجود دارند.

در بخش دیگر تحقیق، DNA از سلول‌های هماتوپویتیک بند ناف، پس از تخلیص و تکثیر و پردازش برای بررسی الگوی متیلاسیون، با روش MSP مورد آزمون قرار گرفت. از مشکلات مرتبط با MSP ، در واقع دشواری قابل توجه مرحله تنظیم، برای این روش است و در این مطالعه نیز مدت زمان زیادی جهت این منظور اختصاص یافت که در مدت حدود چند ماه، نتایج و تصاویر زیادی ثبت شد. اندازه باند DNA برای محصولات MSP برای ژن‌های مختلف مورد مطالعه، باز هم تقریباً در یک محدوده و به طور دقیق از این قرار بود:

Methylated P16 Gene – 150 bp
Unmethylated P16 Gene – 151 bp
Methylated P15 Gene – 148 bp
Unmethylated P15 Gene – 154 bp

بر اساس یکی از بهترین و گویاترین تصاویر ثبت شده در این مرحله، می‌توان نتایج را به این صورت تفسیر کرد (شکل ۳):

در مورد ژن P15 با توجه به مشاهده باند در هر دو واکنش مربوط به آغازگرهای متیله و غیر متیله، یک متیلاسیون نسبی در پروموتور این ژن در این مرحله قابل پیشگویی می‌باشد که نشان‌دهنده بیان نسبی ژن است. در مورد ژن دیگر یعنی P16 ، فقط در خانه‌های مربوط به آغازگر غیر متیله، باند دیده می‌شود که بیانگر عدم متیلاسیون ژن فوق در این مرحله و بنابراین بیان آن می‌باشد. در شکل ۳، خانه‌هایی که با حرف M (قرمز رنگ) نشان داده شده است، مربوط به واکنش‌هایی است که در آن‌ها از آغازگرهای مربوط به ژن مورد نظر در حالت متیله استفاده شده است و خانه‌هایی که با حرف U (آبی رنگ) نشان داده شده است، مربوط به واکنش‌هایی است که در آن‌ها از آغازگرهای مربوط به ژن مورد نظر در حالت غیر

Archive of SID
www.SID.ir

متیله استفاده شده است. N-C و P-C، به ترتیب بیانگر وضعیت کنترل منفی و کنترل مثبت MSP می‌باشند. در کنترل مثبت، از نمونه DNA استفاده می‌شود که از قبل، با یک آنزیم متیلاز نظیر Sss1 ، پردازش شده و از متیلاسیون آن، اطمینان خاطر وجود دارد. بنابراین در واکنش MSP ، باید مثبت شود تا صحت باندهای دیگر، مورد تایید قرار بگیرد. در وضعیت کنترل منفی نیز، از نمونه DNA پردازش نشده استفاده شد که طبیعتاً نباید محصولی نیز در MSP داشته باشد.

بحث

همان‌طور که شرح داده شد، اپی‌ژنتیک، علم تغییر بیان ژن بدون تغییر در توالی نوکلئوتیدی می‌باشد. مکانیسم‌های مختلف اپی‌ژنتیک، به خصوص متیلاسیون، قادر است همه مراحل رشد و تمایز سلولی را تحت تاثیر قرار دهد(۲۰-۱۶).

بر مبنای تحقیقات فراوان بر روی مکانیسم‌های تکوینی مختلف، تمایز به گروه‌های سلولی، در سطح بالایی وابسته به کنترل دقیق بیان ژن و عناصر متنوع پیامدهی داخل سلول نظیر فاکتورهای نسخه‌برداری و سرکوبگر تومور است که دو مورد از این عناصر حد واسط عبارتند از فاکتورهای(P16 INK 4a) و (P15 INK 4b) که به ترتیب P16 و P15 نامیده می‌شوند. این دو فاکتور از پروتئین‌های سرکوبگر تومور هستند که از نقش‌های دیگر آن‌ها مهار CDK-4 ، CDK-6 و کنترل چرخه سلولی در نقطه G_1 می‌باشد(۱۰-۶).

سلول‌های بنیادی با توجه به این که در تمام طول عمر خود دارای قدرت خود نوسازی می‌باشند، از سلول‌های دیگر و پروژنیتورهای خود، متفاوت بوده و دارای الگوی بیان ژن به صورت مجزا و منحصر به فرد هستند. قدرت خودنوسازی سلول‌های بنیادی با ظرفیت تمایزی آن‌ها همواره در تعدیل است. الگوی بیان ژن در سلول‌های اولیه عموماً مرتبط با گروهی از ژن‌هاست که در فرآیندهای نسخه‌برداری عمومی، تنظیم سیکل سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول دخیل هستند. دو مورد از این ژن‌ها، P16 و P15 هستند که در این مطالعه به بررسی آن‌ها پرداخته شده است. در واقع مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن، الگوی بیان و جزییات دقیق آن در سلول‌های هماتوپویتیک بند ناف، هنوز تا حدود زیادی ناشناخته باقی مانده است(۵-۳).

متیلاسیون جزایر غنی از سیتوزین و گوانین، پدیده اپی‌ژنتیکی شایعی است که در ارتباط با بیان اکثریت پروتئین‌های سرکوبگر تومور در بدن رخ می‌دهد و از مسیرهای اصلی تنظیم بیان، برای این ژن‌ها محسوب می‌گردد. تعدادی از مسیرهای سلولی که توسط متیلاسیون، غیر فعال یا کنترل می‌شوند عبارتند از: تعمیر DNA آسیب‌دیده(hMLH1 و MGMT)، چرخه سلولی(P14 ، P15 و P16)، آپوپتوز(DAPK)، چسبندگی سلولی(CDH1-13)، سمیت‌زدایی(GSTP1) و ...(۱۲). اگر چه هنوز در این رابطه، ناگفته‌های زیادی باقی مانده است، این که همه ژن‌های مذکور، در تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی، چگونه ایفای نقش می‌کنند و این تنظیمات تا چه حد با متیلاسیون این ژن‌ها ارتباط دارد، هنوز مجهول و ناگفته است. ولی با همه این تفاسیر، از زمانی که روش‌های بررسی متیلاسیون ژن‌ها نظیر MSP شناخته شده، به گروهی از این سؤالات نیز پاسخ داده شده است. در این مطالعه برای بررسی الگوی متیلاسیون از MSP و برای تایید نتایج آن، از بررسی بیان ژن بهره برده شده است.

در سال ۱۹۸۶ به این نکته اشاره شد که معمولاً متیلاسیون یک ژن در نواحی پروموتوری آن رخ می‌دهد و این متیلاسیون به طور دقیق مربوط به جزایر CpG (نواحی غنی از سیتوزین و گوانین) می‌باشد(۲۰). در آن زمان مشخص شد که نواحی CpG ، عمدتاً در انتهای '۵ قسمت غیرقابل ترجمه ژن‌ها قرار دارد که گاهاً در اولین اگزون نیز گزارش شده است(۱۹). از نظر تاریخچه، متیلاسیون یک ژن سرکوبگر تومور، برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ و در مورد رتینوبلاستوما مطرح شد(۱۵). در ادامه در سال ۱۹۹۴، هیپرمتیلاسیون ژن vHL (فون هیپل لیندا) و غیر فعال شدن آن در بدخیمی‌های انسانی گزارش شد(۱۸). یک سال بعد یعنی در ۱۹۹۵، غیر فعال شدن ژن P16 ، در بدخیمی‌ها توسط متیلاسیون نواحی پروموتوری، نشان داده شد و به این ترتیب، نقش متیلاسیون در نواحی پروموتوری

Archive of SID
www.SID.ir

ژن‌های سرکوبگر تومور، به عنوان یکی از مسیرهای کنترل بیان ژن، پر رنگ شده و مورد توجه محافل علمی قرار گرفت(۱۲). در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد در بافت‌هایی که دارای متیلاسیون در نواحی پروموتوری هستند، فعالیت آنزیم‌های متیل ترانسفراز نیز افزایش می‌یابد. در راستای این مطالعه‌ها، ژن‌هایی معرفی شد که کدکننده آنزیم‌های متیل ترانسفراز هستند(DNMT1 ، DNMT2 ، DNMT3a و DNMT3b)(۲۰).

در ادامه مطالعه‌های انجام شده، متیلاسیون ژن P15 ، در اکثریت لوسمی‌ها و متیلاسیون ژن P16 ، در طیف وسیعی از بدخیمی‌ها نشان داده شد(۱۱). نکته دیگری که قابل توجه و لازم به ذکر است، این است که متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن‌های P15 و P16 ، به عنوان یک مسیر تنظیم بیان ژن، نسبت به دیگر ژن‌های سرکوبگر تومور، بسیار رایج‌تر هستند(۲۱).

ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از دو جنبه مورد بررسی قرار گرفتند؛ یکی از این ابعاد، موضوع بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ می‌باشد. موضوع دیگر روشن شدن وضعیت متیلاسیون در نواحی پروموتور همین ژن‌هاست که از مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن محسوب می‌شود. به زبان دیگر اگر یک ژن در نواحی پروموتوری خود دارای جزایر غنی از سیتوزین و گوانین(GpG) باشد، این بدین معنا است که وضعیت متیلاسیون نواحی مزبور می‌تواند منتهی به خاموش شدن یا روشن شدن بیان ژن مورد نظر شود(۲۲-۲۰). حال آن که ممکن است در برخی موارد، پروموتور ژن‌ها به طور نسبی دچار متیلاسیون شوند که طبیعتاً تحت این شرایط، بیان نسبی ژن مربوطه، پیامد قابل انتظار شرایط فوق خواهد بود. بنابراین بیان یک ژن (Gene Expression) در الگوی سلول مد نظر در مرحله نسخه‌برداری، با اصولی هم چون اپی‌ژنتیک و متیلاسیون می‌تواند دارای ارتباط تنگاتنگ باشد(۲۲-۱۶).

در واقع همان طور که ذکر شد، نتایج MSP برای ژن P15 به صورت متیلاسیون نسبی و نتایج بررسی بیان ژن نیز برای مورد فوق مثبت است که می‌توان هم‌خوانی داده‌های به دست آمده را نتیجه‌گیری کرد.

از طرف دیگر برای ژن‌های P16 نیز، نتایج MSP بیانگر عدم متیلاسیون در این مرحله و نتایج آنالیز بیان ژن نشان‌دهنده وجود محصول قابل انتظار در PCR و در نهایت بیان مثبت ژنی می‌باشد که مجدداً هم‌خوانی داده‌ها قابل مشاهده است.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در مراحل مختلف مطالعه حاضر نشان می‌دهد که متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن‌های مورد مطالعه(P15-P16)، یکی از مسیرهای قطعی و مهم کنترل بیان فاکتورهای مورد نظر هستند. در واقع بیان هیچ کدام از فاکتورهای مورد بحث در سلول‌های هماتوپویتیک منفی نمی‌باشد و گویای این نکته است که هر دو ژن، در متابولیسم سلول‌های بنیادی $CD34^+$ ، دارای نقش مشخص هستند. در میزان بیان فاکتورهای مورد نظر و نیز الگوی متیلاسیون در نواحی پروموتوری فاکتورهای فوق نیز، هم‌خوانی قابل قبولی دیده می‌شود اگر چه وجود مغایرت در این رابطه نیز دور از انتظار نخواهد بود چرا که می‌توان گفت نتایج متیلاسیون در این تحقیق با استفاده از روش MSP به دست آمده است که قادر به گزارش تفاوت‌های کمی متیلاسیون نیست و به مقایسه الگوهای متیلاسیون به صورت کیفی می‌پردازد. ضمناً در تنظیم میزان بیان ژن‌ها فقط یک مکانیسم ویژه ایفای نقش نمی‌کند و برآیند گروهی از مکانیسم‌های مختلف است که سطوح بیان هر ژن را در سلول، تعیین می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از خانم دکتر مهین نیکوگفتار و آقای دکتر کامران عطاردی که در جمع‌آوری خون بند ناف به این گروه، یاری و کمک رساندند نهایت تشکر را داریم.

Archive of SID
www.SID.ir

References :

1- Pajerowski JD, Dahl KN, Zhong FL, Sammak PJ, Discher DE. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(40): 15619-24.

2- Cui L, Johkura K, Takei S, Ogiwara N, Sasaki K. Structural differentiation, proliferation, and association of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes *in vitro* and in their extracardiac tissues. J Struct Biol 2007; 158(3): 307-17.

3- Migliaccio G, Migliaccio AR, Druzin ML, Giardina PJ, Zsebo KM, Adamson JW. Long-term generation of colony-forming cells in liquid culture of $CD34^+$ cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor. Blood 1992; 79(10): 2620-7.

4- Zhang WJ, Park C, Arentson E, Choi K. Modulation of hematopoietic and endothelial cell differentiation from mouse embryonic stem cells by different culture conditions. Blood 2005; 105(1): 111-4.

5- Young JC, Varma A, DiGiusto D, Backer MP. Retention of quiescent hematopoietic cells with high proliferative potential during *ex vivo* stem cell culture. Blood 1996; 87(2): 545-56.

6- Tran NT, Trinh QM, Lee GM, Han YM. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells by modulating intracellular signaling pathways in a feeder/serum-free system. Stem Cells Dev 2012; 21(7): 1165-75.

7- Cardozo AJ, Gómez DE, Argibay PF. Transcriptional characterization of Wnt and Notch signaling pathways in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. J Mol Neurosci 2011; 44(3): 186-94.

8- Draper JS, Fox V. Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. Arch Med Res 2003; 34(6): 558-64.

9- Bertrand-Vallery V, Boilan E, Ninane N, Demazy C, Friguet B, Toussaint O, *et al*. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16(INK-4A). Biogerontology 2010; 11(2): 167-81.

10- Minami R, Muta K, Umemura T, Motomura S, Abe Y, Nishimura J, *et al*. p16(INK4a) induces differentiation and apoptosis in erythroid lineage cells. Exp Hematol 2003; 31(5): 355-62.

11- Hutter G, Scheubner M, Zimmermann Y, Kalla J, Katzenberger T, Hübler K, *et al*. Differential effect of epigenetic alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b), p14(ARF)] in mantle cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer 2006; 45(2): 203-10.

12- Siebert R, Willers CP, Opalka B. Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. Leuk Lymphoma 1996; 23(5-6): 505-20.

13- Miller CW, Aslo A, Campbell MJ, Kawamata N, Lampkin BC, Koeffler HP. Alterations of the p15, p16,and p18 genes in osteosarcoma. Cancer Genet Cytogenet 1996; 86(2): 136-42.

14- Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, *et al*. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. Oncogene 2011; 30(16): 1956-62.

15- Liu J, Liu H, Zhang X, Gao P, Wang J, Hu Z. Identification and characterization of P15RS, a novel P15(INK4b) related gene on G1/S progression. Biochem Biophys Res Commun 2002; 299(5): 880-5.

16- Knowling S, Morris KV. Epigenetic regulation of gene expression in human cells by noncoding RNAs. Prog Mol Biol Transl Sci 2011; 102: 1-10.

17- Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM, *et al*. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. Cell Res 2011; 21(3): 518-29.

18- Bottardi S, Aumont A, Grosveld F, Milot E. Developmental stage-specific epigenetic control of human beta-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. Blood 2003; 102(12): 3989-97.

19- Holliday R. DNA methylation and epigenetic mechanisms. Cell Biophys 1989; 15(1-2): 15-20.

20- Dansranjavin T, Krehl S, Mueller T, Mueller LP, Schmoll HJ, Dammann RH. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation. Cell Cycle 2009; 8(6): 916-24.

21- Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. Carcinogenesis 1997; 18(5): 869-82.

22- Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, *et al*. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. Genes Cells 2002; 7(9): 961-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013;10 (1): 31-39

Original Article

Evaluation of methylation pattern in the promoter regions of P15 and P16 genes and the expression status of these factors in cord blood CD34$^+$ stem cells

Azad M.[1], Kaviani S.[1], Mortazavi Y.[2], Norouzinia M. [1], Soleimani M.[1], Abroun S.[1], Zonoubi Z.[3], Atashi A.[1]

[1]*Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
[2]*Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*
[3]*Faculty of Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

Cell signaling elements such as P15 and P16 play an important role in differentiation of primitive cells into various cell types. These factors are involved in controlling gene expression by different mechanisms, of which epigenetics especially methylation is noteworthy. The main objectives of this study were discovering the expression status of target genes in CD34$^+$ cord blood stem cells and determining the methylation changes in the respective genes is this same stage.

Materials and Methods

After collection of cord blood bags and purification and proliferation of stem cells, cellular DNA was isolated. In later stages, cDNA and Bisulfite treated DNAs were synthesized from RNA and DNA of primary cells, respectively. Polymerase Chain Reaction and Methylation Specific PCR were later performed for both genes.

Results

After MSP, it was found that the P15 has partial methylation and expression in CD34$^+$ stem cells, and P16 lacks methylation in this stage and is completely expressed. The results of PCR indicated expression of both genes in CD34$^+$ stem cells.

Conclusions

Gene expression profile of each tissue or cell is in accordance with its functions; the specific expression of P15 and P16 can indicate a possible role of these genes in biology of CD34$^+$ stem cells in umbilical cord blood. There is always substantial agreement between expression of a gene and its epigenetic changes.

Key words: Methylation, Stem Cells, Cord Blood

Received: 28 Mar 2012
Accepted:18 Jul 2012

Correspondence: Kaviani S., PhD of Hematology. Associate Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883832; Fax: (+9821) 82884507
E-mail: *kavianis@modares.ac.ir*

www.SID.ir