

Original Article

## Methylation Pattern of Hepatitis B Virus X Gene in Infected Patients

Fatemeh Hosseini<sup>1</sup>, Mehrdad Ravanshad<sup>2\*</sup>, Mehrdad Noruzinia<sup>3</sup>

- 1- M.Sc. Student, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
2- Assistant Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
3- Associated Professor, Department of Medical Genetic, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 1411317116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: ravanshad@modares.ac.ir

Received: 12/Oct/2013, Accepted: 13/Jan/2014

### Abstract

**Objective:** A recent field of research in epigenetics is DNA methylation which involves the CpG island in the genome that subsequently controls transcription and translation of targeted genes. In the hepatitis B virus (HBV) genome, there are three CpG islands which tend to be methylated. The aim of the current study is to determine the methylation pattern of the HBV X gene in chronically infected HBV patients.

**Methods:** Study participants comprised 45 chronically infected HBV patients. According to the presence of the HBeAg, patients were divided into two groups, HBeAg positive (n=24) and HBeAg negative (n=21). Initially, viral DNA was treated with sodium bisulfate. Then, analysis was performed with two sets of methylated and non-methylated primers by the MSP method.

**Results:** The overall methylation rate in serum samples of hepatitis B infected patients was 35.5%; the rate in the HBeAg positive patients was 20.8%, whereas it was 52.3% in HBeAg negative patients. There was a significantly higher rate of methylation in serum samples of HBeAg negative patients compared to HBeAg positive patients (student's t-test; P=0.02).

**Conclusion:** Methylation of HBV can be used as a new mechanism to control the progression of viral infection. This methodology can be useful for determining the characteristics of clinical stages of this infection.

**Keywords:** Hepatitis B, DNA methylation, Epigenetic

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 4, Winter 2014, Pages: 39-46

## بررسی الگوی متیلاسیون ژن X ویروس هپاتیت B در افراد آلوده

فاطمه حسینی<sup>۱</sup>، مهرداد روانشاد<sup>۲\*</sup>، مهرداد نوروزی نیا<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی

Email: ravanshad@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۲۳

دریافت مقاله: ۹۲/۰۷/۲۰

### چکیده

**هدف:** یکی از حوزه‌های مهم در اپی‌ژنتیک، متیلاسیون DNA است که دی نوکلئوتیدهای CpG در ژنوم را تحت تأثیر قرار داده و رونویسی بیان ژن‌های مورد نظر را کنترل می‌کند. در ژنوم ویروس هپاتیت B، سه جزیره غنی از دی نوکلئوتید CpG وجود دارد که تمایل شدیدی به متیله شدن دارد. هدف از این مطالعه تعیین الگوی متیلاسیون ژن X ویروس هپاتیت B در بیماران مبتلا به این ویروس است.

**مواد و روش‌ها:** جمعیت هدف بررسی در این مطالعه ۴۵ بیمار مبتلا به ویروس هپاتیت B بود. ابتدا DNA ژنومی ویروس برای تعیین میزان متیلاسیون با بی‌سولفیت سدیم تیمار شد. سپس با دو گروه آغازگر متیله و غیر متیله توسط روش MSP تجزیه و تحلیل شد.

**نتایج:** میزان متیلاسیون در نمونه‌های سرمی مبتلا به ویروس به طور کلی ۳۵/۵ درصد بود و این نرخ در بیماران HBeAg مثبت ۲۰/۸ درصد و در مبتلایان HBeAg منفی ۵۲/۳ بود. به این ترتیب میزان متیلاسیون در نمونه سرمی افراد مبتلا به هپاتیت B مزمن HBeAg منفی به طور معنی‌داری بیشتر از میزان متیلاسیون DNA ویروس در افراد مبتلا HBeAg مثبت است که این فرضیه با Student T-test با  $P=0/02$  تأیید شد.

**نتیجه‌گیری:** متیلاسیون ژنوم هپاتیت B می‌تواند به عنوان یک مکانیسم جدید برای کنترل پیشرفت عفونت ویروسی و همچنین تعیین مرحله بالینی بیماری مبتلا در نظر گرفته شود، بنابراین دانستن الگوهای مختلف متیلاسیون DNA از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه میزان متیلاسیون در بیماران HBeAg منفی به طور معنی‌داری بالاتر از افراد HBeAg مثبت تعیین شد ( $P=0/02$ ).

**کلیدواژگان:** هپاتیت B، متیلاسیون DNA، اپی‌ژنتیک

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۳۹-۴۶

### مقدمه

مزمّن و سالانه حدود یک میلیون مرگ در ارتباط با این ویروس در سراسر جهان وجود دارد؛ بنابراین با وجود واکسن پیشگیری‌کننده ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus)، این ویروس یک نگرانی برای بهداشت جامعه بشری تلقی

عفونت مزمن با هپاتیت B (Hepatitis B)، یکی از مهم‌ترین عوامل خطرناک برای پیشرفت به سمت سرطان کبد است. بنابراین عفونت حاصل از این ویروس می‌تواند یکی از عمده‌ترین دلایل مرگ و میر باشد. حدود ۴۰۰ میلیون نفر حامل

### بررسی الگوی متیلاسیون ژن X ویروس هپاتیت B

کامل آشکار نشده است. این تأثیرات به عوامل متعددی مانند مرحله‌ای از تکثیر ویروس که متیلاسیون اتفاق می‌افتد، گونه میزبانی، بافت و سلول آلوده به ویروس، موقعیت نوکلئوتید متیله شده در ژنوم ویروس و اندازه ویروس بستگی دارد [۵]. اما وجه مشترک تمامی ویروس‌ها در رابطه با متیلاسیون، ارتباط معکوس این مکانیسم با بیان ژن‌های ویروسی است و به نظر می‌رسد ژن‌های مرحله تأخیری ویروس‌ها نسبت به ژن‌های مرحله اولیه تمایل بیشتری نسبت به متیلاسیون دارد. به گونه‌ای که متیلاسیون، ژن‌های ویروسی را نشاندار می‌کند و این مسئله موجب فراخوانی پروتئین‌های دیگر مانند پروتئین‌های Mecp1, 2 و عناصر سرکوب کننده رونویسی شده و موجب تشکیل یک کمپلکس پروتئینی ویژه روی پروموتورهای ویروسی حاوی CpG متیله می‌شود. به این ترتیب این مناطق از دسترس عوامل رونویسی محفوظ می‌ماند در حالی که به طور همزمان عوامل سرکوب کننده رونویسی به این کمپلکس فراخوانی می‌شود [۷-۵]. از جنبه دیگر ویروس‌ها از تغییرات اپی‌ژنتیک، به خصوص متیلاسیون DNA برای پنهان کردن خود از سیستم ایمنی استفاده می‌کنند به این ترتیب که متیلاسیون مانع از ظهور آنتی‌ژن‌های ویروسی شده و بنابراین ویروس از دسترس سیستم ایمنی دور خواهد ماند [۸]. با توجه به این که الگوی متیلاسیون ژنوم ویروس در نمونه‌های سرمی بررسی نشده است و به دست آوردن الگوی متیلاسیون ژن X ویروس هپاتیت B برای تعیین الگوی کلی متیلاسیون ویروس و تعیین مراحل مختلف بالینی مفید است، انجام این مطالعه ضروری به نظر می‌رسد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۴۵ نمونه سرمی بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن استفاده شد. نمونه‌های اشاره شده به دو گروه HBeAg مثبت و HBeAg منفی تقسیم شد. DNA ویروسی از نمونه‌های سرمی با استفاده از کیت استخراج Invisorb (STRATEC Molecular یا Invitek قدیم، آلمان) به دست آمد. سپس DNA های استخراج شده با بی‌سولفیت سدیم

می‌شود [۱]. سرطان کبدی که در پی عفونت با ویروس هپاتیت B ایجاد می‌شود به عوامل مختلفی مانند واکنش متقابل ویروس و میزبان، پیشرفت به سمت سیروز، فعالیت پروتئین X ویروس و تأثیر این پروتئین بر مسیرهای انتقال پیام، تغییرات اپی‌ژنتیک ژن‌های سلولی و ویروسی و ... بستگی دارد [۲]. یکی از حوزه‌های مهم در اپی‌ژنتیک متیلاسیون DNA است که روی دی نوکلئوتید CpG در ژنوم رخ می‌دهد و موجب کنترل رونویسی و بیان ژن مورد نظر می‌شود [۳]. ویروس‌ها در مکانیسم متیلاسیون از یوکاریوت‌ها تقلید می‌کنند به گونه‌ای که سیتوزین موجود در دی نوکلئوتید CPG تمایل بالایی برای متیلاسیون دارد. در ژنوم ویروس هپاتیت B سه جزیره غنی از دی نوکلئوتید CpG وجود دارد و شواهد نشان داده‌است که این جزایر تمایل شدیدی به متیله شدن دارد.

۱- جزیره CpG ۱ (CpG island): این منطقه در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۸۱-۵۵ قرار گرفته و با عناصر تنظیمی ویروس مانند کدون شروع آنتی‌ژن سطحی ویروس همپوشانی دارد. این منطقه دارای ۷ دی نوکلئوتید CpG است.

۲- جزیره CpG ۲: این منطقه در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۶۶۳-۱۲۲۸ قرار گرفته و با پروموتور ژن X و تشدید کننده ۱ (Enhancer 1) همپوشانی دارد. این جزیره حاوی ۸ دی نوکلئوتید CpG است.

۳- جزیره CpG ۳: این جزیره در موقعیت ۲۲۹۵-۲۴۴۶ قرار گرفته و حاوی کدون شروع ژن پلیمرز ویروس است [۳، ۴].

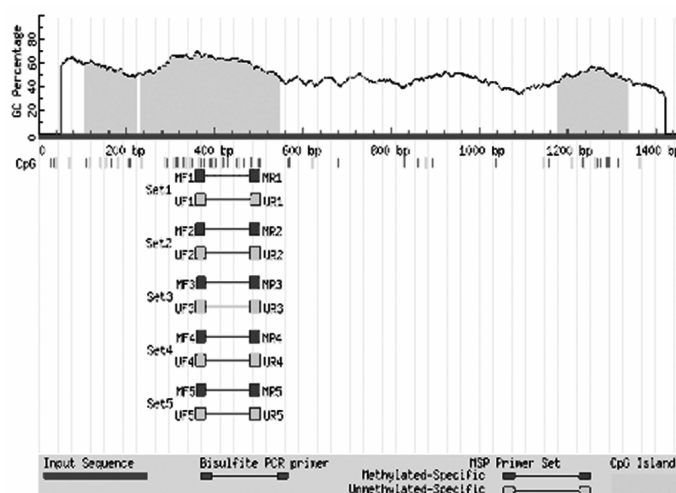
به نظر می‌رسد که متیلاسیون در هرکدام از این سه ناحیه ژنومی رخ دهد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین منظور مطالعات بی‌شماری برای بررسی الگوهای مختلف متیلاسیون در ژنوم ویروس هپاتیت B در مراحل مختلف عفونت و همچنین در بافت‌های مختلفی که هدف ویروس است انجام گرفته است. مطالعات انجام شده نشان داده‌است که متیلاسیون CpG ها در ژنوم ویروس‌ها به خصوص DNA ویروس‌ها، تأثیر عمده‌ای بر چرخه تکثیر ارگانسیم دارد اما نقش آن در روند عفونت‌زایی و سیر بالینی ویروس‌ها به طور

به روش اتانول استات آمونیوم رسوب کرده و در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد.

### MSP (Methylation specific PCR)

در این روش از دو گروه آغازگر (Primer) که مختص DNA های متیله و غیر متیله است، استفاده شد. آغازگرها با استفاده از نرم افزار آنلاین Methprimer از ناحیه ژنومی X ویروس هپاتیت B طراحی شد (شکل ۱). به طور خلاصه واکنش MSP در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. غلظت نهایی مواد برای واکنش PCR آغازگرهای مورد نظر به ترتیب زیر تعیین شد (جدول ۱).

تیمار شد. ۱۰ میکرولیتر (معادل یک میکروگرم) نمونه سرمی به ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد و ۵/۵ میکرولیتر NaOH (۲ مولار) نیز به آن افزوده شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۳۰ میکرولیتر هیدروکینون ۱۰ میلی مولار به آن اضافه شد. پس از اضافه کردن ۵۲۰ میکرولیتر سدیم بی سولفاید ۳ مولار، به کمک روغن معدنی سطح محلول پوشانده شد و پس از بسته شدن درب میکروتیوب با نوار پارافیلیم، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. مجدداً DNA با استفاده از کیت ذکر شده از محلول استخراج شد. برای تکمیل مرحله تبدیل سیتوزین های غیر متیله به اوراسیل، ۱۵/۵ میکرولیتر از NaOH (۳ مولار) اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس در مرحله نهایی DNA



شکل ۱ تصویر برگرفته از نرم افزار Methprimer است که ناحیه انتخاب ژن و آغازگرهای پیشنهاد شده در آن مشخص است.

جدول ۱ غلظت نهایی مواد واکنش PCR برای آغازگرهای متیله و غیر متیله

آب مقطر	Taq پلیمرز	DNA	آغازگر	بافر PCR	MgCL <sub>2</sub>	dNTP	
۱۴/۷۵	۰/۵	۵	۰/۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۵	آغازگرهای متیله
۱۴	۰/۵	۵	۱/۰	۲/۵	۱/۵	۰/۵	آغازگرهای غیرمتیله

استفاده شد.

در واکنش متیله از آغازگرهای:

برای راه اندازی MSP ابتدا شرایط یک PCR استاندارد به صورت جدول زیر پیشنهاد شد. دمای اتصال با توجه به

F- MHBX: TTTCGTTTGTCTTCGATC

R- MHBX: CGTTCACGATAATTTCCATACG

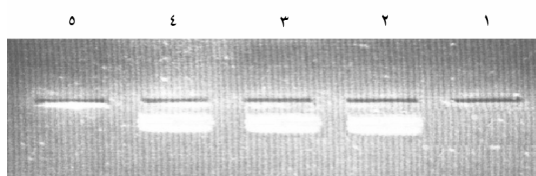
**بررسی الگوی متیلاسیون ژن x ویروس هیپاتیت B**

سانتی گراد به دست آمد و دستورالعمل زیر در نظر گرفته شد (جدول ۲).

Tm آغازگرها با طیف دمایی ۵۰-۶۰ انجام گرفت. تک باند مورد نظر با اندازه ۱۳۲ جفت باز در دمای ۵۸ درجه

جدول ۲ دماهای به کار رفته در واکنش آغازگرهای متیله

تعداد چرخه	مرحله	درجه حرارت	مدت زمان
۱ چرخه	واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه
	واسرشتگی (Denaturation)	۹۵	۳۰ ثانیه
۳۵ چرخه	اتصال (Annealing)	۵۸	۳۰ ثانیه
	بسط (Extension)	۹۵	۲۰ ثانیه
۱ چرخه	بسط نهایی (Final Extension)	۷۲	۱۰ دقیقه



شکل ۲ کیفیت DNA استخراج شده در سه نمونه بیمار؛ ستون ۱ و ۵ کنترل منفی، ستون ۲، ۳ و ۴ نمونه‌های استخراج شده DNA

آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش غیر متیله به ترتیب زیر بود:

F- UHBX: TTTTTTTGTTTGTGTTTTGATTGA  
R- UHBX: TTAATAAACATTCACAATAATTTCCATACA

واکنش PCR با آغازگرهای غیر متیله نیز بر اساس دستورالعمل زیر راه اندازی شد. تک باند مورد نظر با اندازه ۱۳۲ جفت باز در دمای ۵۸ به دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳ غلظت نهایی واکنش PCR برای آغازگرهای غیر متیله

تعداد چرخه	مرحله	درجه حرارت	مدت زمان
۱ چرخه	واسرشتگی اولیه	۹۵	۵ دقیقه
	واسرشتگی	۹۵	۳۰ ثانیه
۳۵ چرخه	اتصال	۵۸	۳۰ ثانیه
	بسط	۹۵	۲۰ ثانیه
۱ چرخه	بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

نتایج به دست آمده با استفاده از الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شد.

**نتایج**

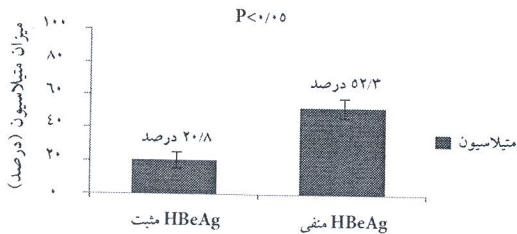
در این پژوهش ابتدا کیفیت DNA های تیمار شده با بی سولفیت سدیم با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز تعیین شد. بدین ترتیب که ۵ میکرولیتر از DNA روی ژل ۱ درصد الکتروفورز شد (شکل ۲).

کیفیت نمونه‌های الکتروفورز شده با استفاده از تعیین غلظت میزان DNA توسط دستگاه نانودراپ (Nano Drop) تأیید شد.

به منظور بررسی متیلاسیون ژن مورد نظر برای هر دو جفت آغازگر طراحی شده (اعم از متیله و غیر متیله) یک واکنش PCR به طور جداگانه راه اندازی شد. پس از راه اندازی واکنش‌های PCR، برای هر نمونه دو بار واکنش PCR با آغازگرهای متیله و غیر متیله انجام شد و در نهایت محصولات به دست آمده از واکنش PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. قطعه حاصل از آغازگرهای متیله ۱۳۲ جفت باز و غیر متیله ۱۴۳ جفت باز طول دارد. برای کنترل درستی مراحل متیلاسیون، از کنترل مثبت که قطعه‌ای از DNA تیمار شده با آنزیم Sss Methylase بود برای آغازگرهای متیله استفاده شد که در این حالت آنزیم متیلاز به طور قطعی DNA مورد نظر را متیله می کند. با توجه به متیله بودن، این قطعه می تواند به عنوان کنترل منفی برای آغازگرهای غیر متیله در



نمونه سرمی افراد مبتلا به هپاتیت B مزمن HBeAg منفی ۵۲/۳ (۱۱/۲۱) و در نمونه‌های HBeAg مثبت ۲۰/۸ (۵/۲۴) تعیین شد. به این ترتیب میزان متیلاسیون در نمونه سرمی افراد مبتلا به هپاتیت B مزمن HBeAg منفی به طور معنی‌داری بالاتر از میزان متیلاسیون DNA ویروس در افراد مبتلا HBeAg مثبت است (میزان معنی‌داری  $P=0/02$  تعیین شد) (شکل ۴).

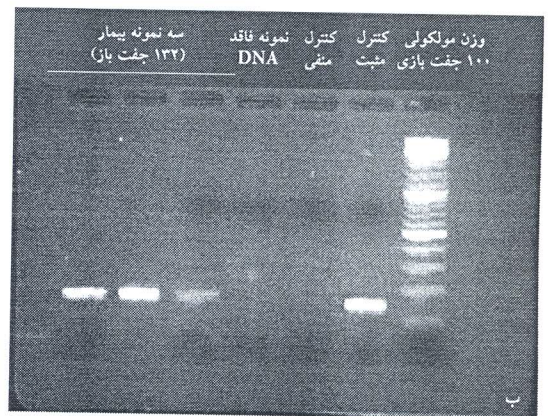
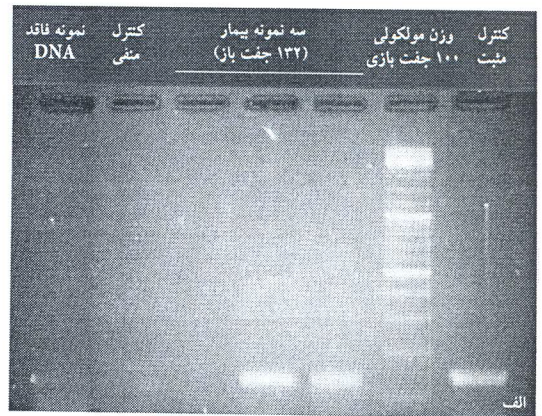


شکل ۴ میزان متیلاسیون در گروه‌های بررسی شده

## بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که متیلاسیون در ژن X هپاتیت B ارتباط معنی‌داری با بیان آنتی‌ژن e در بیماران مبتلا دارد. جزیره CpG ۲ به دلیل همپوشانی با پروموتور ژن X و همچنین قرارگیری در کنار تشدید کننده ۲ و پروموتور ژن Core اهمیت به‌سزایی در همانندسازی، نسخه‌برداری ژنوم و بیان آنتی‌ژن‌های ویروس دارد. با توجه به همپوشانی ژن X با پروموتور ژن Core متیلاسیون در این ژن می‌تواند موجب دور ماندن پروموتور ژن Core از دسترس عوامل نسخه‌برداری شده و بیان این ژن و ژن e را کاهش دهد؛ به همین منظور در این مطالعه این ناحیه ژنومی به عنوان ناحیه هدف انتخاب و آغازگرهای مورد نظر طراحی شد. بررسی‌های انجام گرفته در سال‌های اخیر روی این ناحیه ژنومی نشان داده‌است که جزیره CpG ۲ در مقایسه با دو جزیره CpG دیگر موجود در ژنوم ویروس با وجود دارا بودن بیشترین جایگاه CpG دارای کمترین میزان متیلاسیون است [۲]. در پژوهش حاضر از ۴۵ نمونه موجود ۱۶ نمونه (۳۵/۵ درصد) در ناحیه جزیره CpG ۲ متیله و سایر نمونه‌ها غیر متیله بود. در مطالعه‌ای که یانهای (Yanhai) و

نظر گرفته شود. نمونه شاهد یک نمونه فاقد DNA است که قطعاً در الکتروفورز هیچ بانندی در امتداد چاهک آن مشاهده نمی‌شود (شکل ۳).



شکل ۳ نتایج MSP برای HBX (برای دسته متیله) در نمونه‌های سرم افراد مبتلا به هپاتیت B؛ از سمت راست: کنترل مثبت (نمونه تیمار شده با آنزیم SssI Methylase)، وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ۳ نمونه سرم بیمار، کنترل منفی (نمونه تیمار نشده با بی‌سولفیت سدیم)، نمونه فاقد DNA (شاهد)، (ب) نتایج MSP برای ژن X (دسته آغازگری غیر متیله) در نمونه‌های خون افراد مبتلا به هپاتیت B؛ از سمت راست: وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، کنترل مثبت (نمونه غیر متیله)، کنترل منفی نمونه متیله شده با آنزیم SssI Methylase، نمونه فاقد DNA (شاهد)، سه نمونه بیمار

با انجام آنالیزهای آماری (با استفاده از Student's T test) روی نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نرخ متیلاسیون در ناحیه X ژنوم ویروس هپاتیت B در سرم افراد آلوده ۳۵/۵ درصد (۱۶/۴۵) تعیین شد که در این جمعیت میزان متیلاسیون در

### بررسی الگوی متیلاسیون ژن x ویروس هپاتیت B

نسخه‌برداری و بنابراین کاهش بیان آنتی‌ژن e در این بیماران می‌شود. در بررسی دیگری که درباره تأثیر متیلاسیون در کاهش بیان آنتی‌ژن e در سال ۲۰۰۹ روی دو گروه بیماران مبتلا به occult HBV و non occult HBV انجام گرفت، دو الگوی متیلاسیون متفاوت در این دو گروه بیمار به دست آمد. به این ترتیب که با بررسی دو جزیره CpG ۱ و ۲ در این دو گروه بیمار مشخص شد که در بیماران مبتلا به شکل occult بیشترین چگالی متیلاسیون در ناحیه جزیره ۲ دیده می‌شود؛ این در حالی است که در افراد مبتلا به non occult عمده متیلاسیون در ناحیه جزیره ۱ اتفاق افتاده است. با به دست آوردن این نتایج این احتمال وجود دارد که متیلاسیون حاضر در جزیره CpG ۲ یکی از دلایل به وجود آمدن شکل occult بیماری از طریق سرکوب بیان ژن e در این ویروس باشد [۱۲]. به نظر می‌رسد به دست آوردن الگوی متیلاسیون سایر جزیره‌های CpG ویروس در نمونه‌های سرمی و حتی در DNA های استخراج شده از PBMC ها (Peripheral Blood Mononucleated Cell) می‌تواند در کنار الگوهای به دست آمده از نمونه‌های بافتی در تعیین یک الگوی کلی از متیلاسیون DNA این ویروس بسیار مفید باشد؛ اما برای تأیید این مسئله تحقیقات بیشتری مورد نیاز است. به طور کلی متیلاسیون ژنوم هپاتیت B می‌تواند به عنوان یک مکانیسم جدید برای کنترل پیشرفت عفونت ویروسی و همچنین ایجاد مراحل بالینی مختلف در بیماران مبتلا در نظر گرفته شود. بنابراین به دست آوردن الگوهای مختلف متیلاسیون DNA ویروس در بافت‌های هدف ویروس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

### تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجویی مصوب گروه ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

همکارانش روی cccDNA استخراج شده از نمونه‌های بافتی کبد انجام دادند از ۵۵ نمونه بافت، ۲۴ نمونه معادل ۳۴/۶ درصد در این ناحیه متیله بود [۴] که این کاهش چگالی متیلاسیون در نمونه‌های سرمی می‌تواند مرتبط با مکانسیم‌های مولکولی دیگر یا احتمالاً دخالت سایر تغییرات اپی‌ژنتیکی باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتری در این زمینه دارد. متیلاسیون ژن‌های ویروسی را نشان‌دار می‌کند که این مسئله موجب فراخوانی پروتئین‌های دیگر از قبیل پروتئین‌های 2, Mecp1 و عناصر سرکوب کننده رونویسی و تشکیل یک کمپلکس پروتئینی ویژه روی پروموتورهای ویروسی حاوی CpG متیله می‌شود. به این ترتیب این مناطق از دسترس عوامل رونویسی مخفی مانده و به طور همزمان عوامل سرکوب کننده رونویسی به این کمپلکس فراخوانی می‌شود و بنابراین ژن‌های متیله شده بیان نخواهد شد [۵، ۶]. چن (Chen) و همکاران در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که در بیماران مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوما (Hepatocellular Carcinoma)، متیلاسیون DNA های ویروسی الحاق شده در سلول‌های میزبان موجب عدم بیان ژن‌های ویروسی می‌شود [۹]. این نتیجه با فرضیه‌هایی که از پیش پیشنهاد شده بود همخوانی داشت. یک سال بعد مطالعه‌ای روی DNA الحاق شده ویروس در بافت‌های موشی انجام شد که حاصل آن چیزی جز تأیید مطالعات قبلی نبود؛ در این مطالعه هیچ پروتئین ویروسی در بافت‌های موشی که DNA ویروسی در آن به صورت متیله بود بیان نشد در صورتی که درمان با داروی ۵-آزاسیتیدین (5-azacytidine) بیان پروتئین‌های ویروسی را مجدداً تحریک می‌کرد [۱۰]. در پی آن مطالعات بیشتری روی مدل‌های حیوانی انجام شد که همگی نقش متیلاسیون در سرکوب بیان ژن‌های ویروسی را تأیید می‌کرد. در سال ۲۰۰۹ نیز این موضوع در بافت‌های کبدی انسانی که در معرض ویروس هپاتیت B قرار گرفت، مشاهده شد؛ در این پژوهش ویوکاناندان (Vivekanandan) به این نتیجه رسید که متیلاسیون حتی با چگالی پایین موجب سرکوب بیان ژن‌های ویروسی می‌شود [۱۱]. با تعیین الگوی متیلاسیون DNA سرمی ویروس مشاهده شد که متیلاسیون DNA سرمی ویروس موجب کاهش

## منابع

- [1] Pan CQ, Zhang JX. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2(1): 36-40.
- [2] Kaur P, Paliwal A, Durantel D, Hainaut P, Scoazec JY, Zoulim F, Chemin I, Herceg Z. DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection. *J Infect Dis* 2010; 202(5): 700-4.
- [3] Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Hepatitis B viral DNA is methylated in liver tissues. *J Viral Hepat* 2008; 15(2): 103-7.
- [4] Guo Y, Li Y, Mu S, Zhang J, Yan Z. Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication. *J Med Virol* 2009; 81(7): 1177-83.
- [5] Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR. Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(9): 2825-37.
- [6] Li HP, Leu YW, Chang YS. Epigenetic changes in virus-associated human cancers. *Cell Res* 2005; 15(4): 262-71.
- [7] Sutter D, Doerfler W. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(1): 253-6.
- [8] Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, Espada J, Melo SA, Lujambio A, Fraga MF, Pino I, Javierre B, Carmona FJ, Acquadro F, Steenberg RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Pineau P, Dejean A, Lloveras B, Capella G, Quer J, Buti M, Esteban JI, Allende H, Rodriguez-Frias F, Castellsague X, Minarovits J, Ponce J, Capello D, Gaidano G, Cigudosa JC, Gomez-Lopez G, Pisano DG, Valencia A, Piris MA, Bosch FX, Cahir-McFarland E, Kieff E, Esteller M. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 2009; 19(3): 438-51.
- [9] Chen JY, Hsu HC, Lee CS, Chen DS, Zuckerman AJ, Harrison TJ. Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma: methylation of integrated viral DNA. *J Virol Methods* 1988; 19(3-4): 257-63.
- [10] Araki K, Miyazaki J, Tsurimoto T, Inomoto T, Iwanaga T, Matsubara K, Yamamura K. Demethylation by 5-azacytidine results in the expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic mice. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80(4): 295-8.
- [11] Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *J Infect Dis* 2009; 199(9): 1286-91.
- [12] Vivekanandan P, Kannangai R, Ray SC, Thomas DL, Torbenson M. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples. *Clin Infect Dis* 2008; 46(8): 1227-36.