

بررسی وضعیت متیلاسیون در پروموتور ژن‌های *vHL*، *Runx3* و *Ecad* و بیان این ژن‌ها در سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف

دکتر مهدی آزاد^۱، دکتر سعید کاویانی^۲، دکتر یوسف مرتضوی^۳، دکتر مهرداد نوروزی نیا^۴

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی kavianis@modares.ac.ir

دریافت: ۹۱/۸/۲ پذیرش: ۹۲/۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: فرایندهای تمایزی ویژه به رده‌های گوناگون سلولی، با فاکتورهای نظیر فاکتورهای نسخه برداری، عناصر سرکوبگر تومور و عناصر سیگنالینگ داخل سلول دارای ارتباط تنگاتنگ است که گروهی از این فاکتورها شامل *vHL*، *Ecad* و *Runx3* می‌باشند. مکانیسم‌های کنترلی تأثیرگذار توسط این فاکتورها نیز اپی ژنتیک است که دارای مکانیسم‌های متعددی از جمله متیلاسیون و استیلاسیون می‌باشد. در واقع هدف اصلی مطالعه‌ی ذیل، بررسی وضعیت بیان ژن‌های *vHL*، *Ecad* و *Runx3* در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ خون بند ناف و آشکار ساختن الگوی متیلاسیون ژن‌های موردنظر در این مرحله بود.

روش بررسی: پس از جداسازی سلول‌های بنیادی از خون بند ناف و کشت سلول‌های موردنظر در محیط مخصوص و نیز تخلیص ژنوم از سلول‌ها، در مرحله‌ی اول از *RNA* مورد نظر، *cdNA* ساخته شد و واکنش *PCR* نیز برای ژن‌های مورد مطالعه انجام گرفت. در مراحل بعدی نیز از *DNA* پردازش شده مراحل قبل، برای انجام واکنش‌های *MSP* استفاده شد.

یافته‌ها: پس از انجام واکنش *PCR* با پرایمرهای طراحی شده برای استفاده در *Real Time PCR* و *cdNA* مربوط به *RNA* سلول‌های بنیادی، این نتایج به دست آمد که همه‌ی ژن‌های مورد مطالعه، در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ بیان می‌شوند. با انجام *MSP* در مرحله‌ی دیگری از مطالعه نیز مشخص شد که ژن‌های *Ecad* و *Runx3* دارای متیلاسیون و بیان نسبی و ژن *vHL* نیز فاقد متیلاسیون و بیان کامل تحت این شرایط بودند.

نتیجه‌گیری: همخوانی قابل توجهی بین بیان یک ژن و تغییرات اپی ژنتیک وجود دارد و بیان هر سه ژن مورد مطالعه، نشان دهنده‌ی نقش موثر آن‌ها در بیولوژی و عملکرد سلول‌های بنیادی خونساز دارد.

واژگان کلیدی: متیلاسیون - سلول‌های بنیادی خونساز - خون بند ناف - *vHL* - *Runx3* - *Ecad*

مقدمه

بسیار مهمی در ارتباط با مکانیسم‌های عمومی تنظیم بیان ژن و نحوه شکل‌گیری بافت‌های مختلف پی برده‌ایم (1-8). همانطور که می‌دانیم، تمایز یک سلول بنیادی اولیه به انواع

بر اساس تحقیقات فراوان در زمینه‌ی کنترل اصول بنیادین سلول به ویژه‌ی نسخه برداری و نیز مطالعات انجام شده روی پروسه‌های تکوینی و تکاملی بدن انسان، امروزه به مفاهیم

- ۱- دکترای تخصصی هماتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
- ۲- دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
- ۳- دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
- ۴- دکترای تخصصی ژنتیک، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

مقاوم هستند که این امر گواه بر این مدعاست که Runx3 در دسته‌ی عوامل سرکوب‌گر تومور نیز طبقه‌بندی می‌شود (24). Calcium Dependent Adhesion Molecule-E (E-cadherin) این عنصر در فرایند چسبندگی‌های داخل سلولی نقش مهمی دارد. این اتصالات سلولی در تمایز و تکوین بافت‌ها کاملاً تاثیرگذار بوده، وابسته به حضور کلسیم می‌باشند (25). با این وجود، موضوع مهمی که در عصر حاضر به عنوان یکی از مسیرهای کنترل بیان ژن مطرح شده است، مساله اپی‌ژنتیک است (26). اپی‌ژنتیک به تغییر در بیان ژن، وضعیت میتوز و حتی میوز، بدون تغییرپایه در سکانس نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر گفته می‌شود (28 و 27). امروزه اپی‌ژنتیک به‌عنوان یک اصل غیرقابل انکار در تنظیم تمایز بافتی مطرح شده است که یکی از مکانیسم‌های مهم در رابطه با آن، متیلاسیون پروموتور ژن‌ها و فاکتورهای نسخه‌برداری می‌باشد که در نهایت منجر به خاموش شدن ژن‌های مورد نظر می‌گردد (29). در واقع واژه اپی‌ژنتیک و مکانیسم‌های متفاوت آن می‌تواند تمام مراحل تمایز، رشد، آپوپتوز و تکثیر را در سلول‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهند (30). هدف اصلی از این مطالعه نیز این است که مشخص شود اپی‌ژنتیک به‌عنوان یک اصل تنظیم بیان ژن، تا چه حد و چگونه در تنظیم بیان ژن‌های سرکوب‌گر تومور مربوطه ایفای نقش می‌کند. ژن‌های مورد مطالعه، پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در خانواده فاکتورهای سرکوب‌گر تومور بوده و نقش بسیار مهمی را در تنظیم پروفایل ژنی سلول‌های تمایز یافته نهایی به‌عهده دارند و از مکانیسم‌های تنظیم‌کننده‌ی عملکرد آن‌ها نیز می‌توان متیلاسیون را نام برد که در حالت بیان نرمال و طبیعی باعث مهار بدخیمی شده، اما در حالت هاپیر متیلاسیون منجر به پیشروی تومورهای مختلف می‌شوند. با توجه به اینکه وضعیت بیان ژنی و متیلاسیون در پروموتور ژن‌های مورد بحث به‌عنوان فاکتورهای دخیل در تکوین بافتی در سلول‌های بنیادی $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف، تاکنون مشخص

رده‌های سلولی، وابسته به تنظیم کنترل شده و دقیق در سطح بیان ژن و فاکتورهای کنترلی خاص نظیر سیتوکین‌ها، فاکتورهای نسخه‌برداری ویژه، عناصر کنترل‌کننده‌ی چرخه سلولی، تکثیر، آپوپتوز و عناصر سیگنالینگ داخل سلول می‌باشد (9-12)، که سه مورد از این فاکتورهای حیاتی به اختصار در ادامه معرفی شده است: von Hippel Lindau (vHL) کدکننده پروتئین فون هپل لینداو می‌باشد و ژن آن نیز روی کروموزوم 3 قرار گرفته است (13). این فاکتور از سه زیر واحد به نام‌های الانگین B، الانگین C و کولین 2 تشکیل شده که فاکتوری به اسم Hypoxia-Inducible Factor (HIF) را با یوبیکوئیتیناسیون، آماده تجزیه می‌نماید (14). HIF، یک فاکتور نسخه‌برداری ژن مربوط به EPO (Erythropoietin) در شرایط هایپوکسی در سلول‌های بدن به ویژه سلول‌های کلیوی می‌باشد (15). پروتئین vHL، یک عامل سرکوب‌گر تومور و از عناصر نظارت بر نقاط حساس چرخه سلولی نیز می‌باشد (16). حال با توجه به اینکه در اکثریت تومورها، مقادیر بالای HIF گزارش شده، نقش vHL در سرکوب تومور، بیش از پیش مورد توجه واقع شده است. (17) این فاکتور با افزایش بیان ژن VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)، محرک آنژیوژنز بوده (18) و با مهار ژن mTOR از عوامل نظارت بر تقسیم سلولی نیز می‌باشد. (19) Runx-3 (Runx-3) از عوامل نسخه‌برداری دخیل در تمایز (20) و کنترل‌کننده‌ی چرخه سلولی می‌باشد که این کار را می‌تواند با اتصال به توالی‌های خاص در نواحی پروموتور ژن‌های مسوول تنظیم سیکل سلولی، انجام دهد (21). از طرفی یک پروتئین سرکوب‌گر تومور نیز هست (22) و ضمناً عملکرد آن به طور قابل توجهی در اکثریت بدخیمی‌ها، دچار اختلال می‌شود (23). براساس یکی از مطالعات در سال 2004 مشخص شد که موش‌های ژنتیکی فاقد این عنصر، دارای تکثیر بالای سلول‌های اپیتلیال بوده، نسبت به اثرات مهاری TGF نیز

نشده است. در این مطالعه وضعیت بیان ژن‌های ذکر شده در گروهی از سلول‌های بنیادی خون بند ناف بررسی شد که در ادامه آن نیز وضعیت متیلاسیون پروموتور همین ژن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی

تخلیص سلول‌های بنیادی CD34⁺: ابتدا کیسه‌های خون بند ناف از سازمان انتقال خون تهران جمع‌آوری گردید (تعداد نمونه‌ها حدود ۱۰ مورد بوده که در دفعات مجزا از سازمان انتقال خون تهران جمع‌آوری شده است). سپس سلول‌های بنیادی CD34⁺ هر نمونه به‌طور جداگانه با استفاده از روش بنیادی MACS (Monoclonal Antibody Cell Sorting) تخلیص و جداسازی شد (نمونه‌ها با یکدیگر مخلوط نشده و مراحل آزمایش و بررسی بر روی هر نمونه به‌طور مجزا صورت گرفته است). در این مرحله از کیت‌های Indirect CD34⁺ MicroBead Kit شرکت Miltenyi Biotec استفاده شد. پروتکل استفاده شده جهت تخلیص سلول‌های بنیادی، بر اساس دستورالعمل کیت می‌باشد.

تعیین خلوص سلول‌های CD34⁺ جداشده از کیسه‌های خون بند ناف با فلوسایتومتری: بررسی خلوص سلول‌های CD34⁺ جدا شده از خون بند ناف با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام گرفت. در این مرحله از آنتی‌بادی منوکلونال CD34⁺ و دستگاه فلوسایتومتر BD، استفاده شد. رنگ فلورسانت مورد استفاده برای نشاندار کردن آنتی‌بادی برای CD34، فیکو اریتترین و نرم‌افزار مورد استفاده برای تفسیر داده‌ها، WinMDI می‌باشد. نوع آنتی‌بادی مورد استفاده برای ایزوتایپ نیز، مربوط به آنتی‌بادی از منشا موشی با کلاس IgG1 می‌باشد که با PE (فیکواریترین) نشاندار شده است.

کشت سلول‌های جداشده از خون بند ناف: محیط مورد استفاده جهت این منظور، محیط Stem-Span می‌باشد که به

آن فاکتورهای رشد Flt3، TPO (Thrombopoietin)، SCF (Stem Cell Factor)، با غلظت نهایی 50 نانو گرم در میلی‌لیتر اضافه شده است. با این محیط مخصوص، سلول‌های جداشده از خون بند ناف را یک تا دو روز در انکوباتور با ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده و در نهایت پس از شست و شو با بافر PBS، جهت ادامه آزمون‌ها از محیط موردنظر جداسازی کردیم.

تخلیص DNA و RNA: در مرحله‌ی بعد ژنوم سلول‌های مورد نظر با استفاده از کیت‌های تخلیص DNA و RNA شرکت کیاژن، جداسازی و جهت استفاده در مراحل بعد به صورت موقت در یخچال ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد. **بررسی بیان ژن‌های موردنظر با استفاده از RT-PCR:** در این مرحله، RNA جداشده از سلول‌های بنیادی با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت کیاژن تبدیل به cDNA شده و با استفاده از پرایمرهای سفارش داده شده برای بررسی بیان ژن و دستگاه ترموسایکلر، واکنش PCR برای همه‌ی ژن‌ها به‌طور جداگانه انجام گرفت. دمای Annealing مناسب این پرایمرها، ۵۵ تا ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده است. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای Real-Time PCR، با استفاده از نرم‌افزار primer3 طراحی شده و صحت آن‌ها مجدداً با استفاده از Blast مورد ارزیابی قرار گرفت. برای دیگر مواد موردنیاز هم از PCR Master mix شرکت کیاژن استفاده شد.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک

RT-PCR	
Oligo Name	Sequence (5'-3')
Runx3-F	GACAGCCCCAACTTCCTCT
Runx3-R	CACAGTCACCACCGTACCAT
Ecad-F	GTCATCCAACGGGAATGCA
Ecad-R	TGATCGGTTACCGTGATCAAAA
vHL-F	CTGCCCCGTATGGCTCAACTT

منظور از DNA پردازش شده مرحله قبل برای واکنش MSP استفاده شد. پرایمرهای موردنظر با استفاده از نرم افزار Methprimer طراحی و با استفاده از نرم افزار Methblast، مورد تایید قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت این منظور و جزییات آنها در جدول شماره دو فهرست شده است.

vHL-R GTGTGTCCCTGCATCTCTGAAG

پردازش DNA به منظور آماده سازی آن جهت MSP؛ در این مرحله، DNA جداشده از سلولهای بنیادی با استفاده از EpiTect® Bisulfite Kit شرکت کیاژن تحت پردازش قرار گرفت تا جهت استفاده در واکنش MSP (Methylation-Specific PCR) آماده شود. بررسی وضعیت متیلاسیون ژنهای مورد نظر؛ جهت این

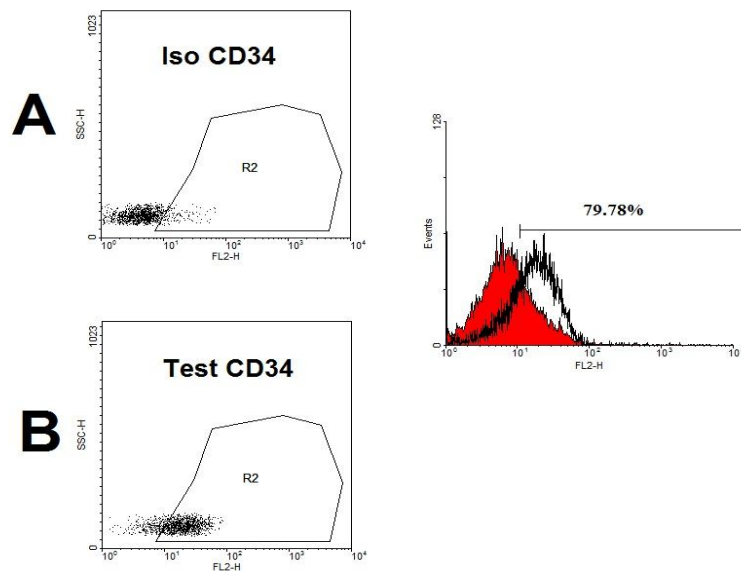
جدول ۲؛ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک MSP

Gene	Size	Cycle	Temp	Form	5' to 3' Sequences
vHL	165	35	60	UF	GTT GGA GGA TTT TTT TGT GTA TGT
				UR	CCC AAA CCA AAC ACC ACA AA
	158	35	60	MF	TGG AGG ATT TTT TTG CGT ACG C
				MR	GAA CCG AAC GCG GCG AA
Runx3	130	37	59	UF	GTG GGT GGT TGT TGG GTT AGT GAG
				UR	CAC CTC CTC AAC CAC CAC TAC CAC
	130	37	59	MF	GTC GTC GGG TTA GCG AGG TTT CGT
				MR	CGA CCG ACG CGA ACG CCT CCT C
Ecad	97	35	59	UF	TTA GTT AAT TAG TGG TAT GGG GGG TGG
				UR	ACC AAA CAA AAA CAA ACA CCA AAT ACA
	116	35	59	MF	TAA TTA GCG GTA CGG GGG GT
				MR	CGA AAA CAA ACG CCG AAT ACG

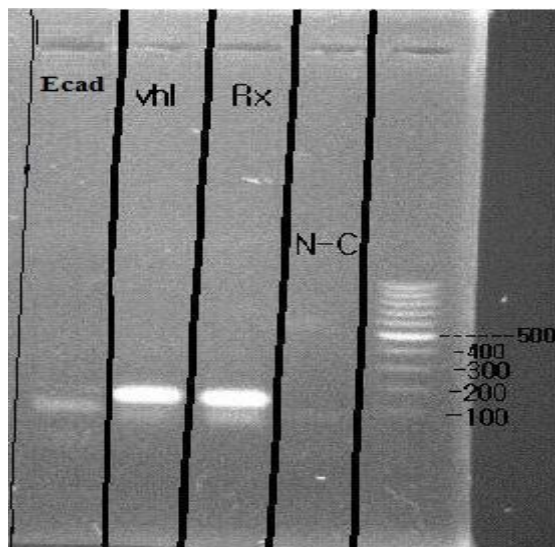
یافته‌ها

RNA جدا شده از سلولهای بنیادی، در روش RT-PCR برای بررسی تنها بیان یا عدم بیان ژنهای مورد نظر مورد آزمایش قرار گرفت. اندازه‌ی باند DNA محصولات PCR برای ژنهای vHL، Ecad، Runx3، به ترتیب ۱۲۳، ۶۰ و ۱۲۰ جفت باز می‌باشد. در این بخش از مطالعه، محصولات PCR در نهایت جهت مشاهده باند مربوط به هر ژن، روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری شد.

در مراحل ابتدایی پس از تخلیص سلولهای CD34+ از کیسه‌های خون بند ناف، قبل از ازدیاد سلول‌ها در Stem-Span، با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، درصد خلوص سلولهای مورد نظر و صحت آنتی‌بادی‌های منوکلونال با روش MACS، مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن از این قرار است: نمونه‌های cDNA تهیه شده از



تصویر ۱؛ میزان بیان شاخص *CD34* بر روی سلول‌هایی که از خون بند ناف جدا شده است. تصویر A مربوط به کنترل ایزوتایپ و تصویر B نیز مربوط به *CD34* می‌باشد. تصویر سمت راست خلوص ۸۰ درصدی سلول‌های مورد نظر را نشان می‌دهد.



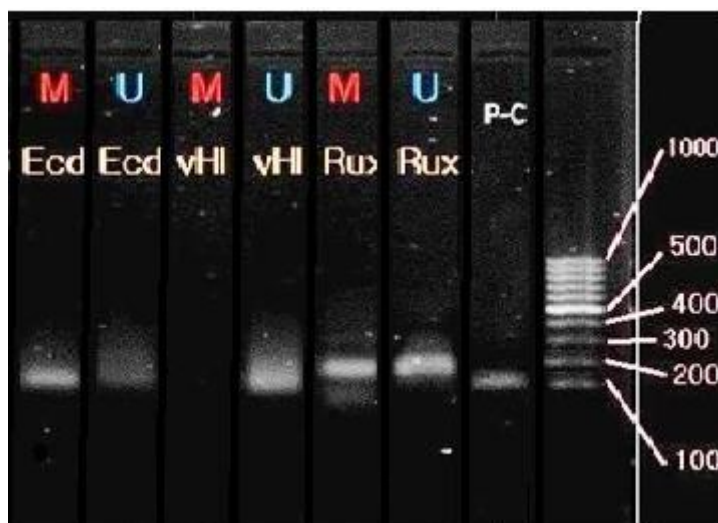
تصویر ۲؛ تصویر بالا مربوط به ژل آگاروز ۱/۵٪ می‌باشد که باندهای قابل مشاهده در آن نشان دهنده‌ی محصولات واکنش *PCR* برای ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق است. با توجه به شکل، هر سه فاکتور مورد مطالعه در این تحقیق، در سلول‌های بنیادی مورد نظر ما قبل از تمایز، کم و بیش بیان می‌شوند. *N-C* بیانگر کنترل منفی می‌باشد (کنترل منفی در اینجا نمونه‌ای *Master mix* است که همه‌ی مواد لازم برای واکنش مورد نظر به میکروتیوب اضافه شده به جز نمونه *DNA*).

پس از آن در نهایت، ژل مورد نظر برای مشاهده باندها، زیر نور UV قرار گرفت که تصویر شماره دو، عکس ثبت شده مربوط به آن را نشان می‌دهد. همان‌طور که قبل از این ذکر شد، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده که قابلیت استفاده در *Real-Time PCR* را دارند و نیز *cdna* تهیه شده از ریبو نوکلئیک اسید سلول‌های بنیادی، واکنش *PCR* انجام گرفت که با این تفاسیر، مشاهده‌ی باند در این مرحله می‌تواند در هر صورت نشان دهنده‌ی بیان ژن مربوطه در سلول مورد نظر باشد. بنابراین با توجه به اینکه در همه خانه‌های ژل در این مرحله، می‌توان باند مربوطه را درست در محدوده‌ی قابل انتظار مشاهده کرد می‌توانیم این‌گونه نتیجه‌گیری کنیم که همه ژن‌های مورد مطالعه‌ی ما در این تحقیق، در پروفایل ژنی سلول‌های بنیادی *CD34+* قبل از تمایز وجود داشتند. از طرف دیگر، *DNA* پس از پردازش جهت مطالعه وضعیت متیلاسیون، در تکنیک *MSP* مورد آزمایش قرار گرفت.

اندازه‌ی باند DNA محصولات MSP برای ژن‌های مختلف مورد مطالعه در حالت‌های مختلف از این قرار است:

- (۱) - 158 bp Methylated vHL
- (۲) - 165 bp Unmethylated vHL
- (۳) - 130 bp Methylated Runx3
- (۴) - 130 bp Unmethylated Runx3
- (۵) - 168 bp Methylated Ecad
- (۶) - 178 bp Unmethylated Ecad

بر اساس یکی از گویاترین تصاویر ثبت شده در این مرحله (تصویر شماره‌ی ۳)، می‌توان نتایج را به این شکل تفسیر کرد: در مورد فاکتورهای Ecad و Runx3 با توجه به مشاهده باند در هر دو واکنش مربوط به پرایمرهای متیله و غیرمتیله،



تصویر ۳، این تصویر مربوط به ژل آگاروز ۱٪ است که باندهای قابل مشاهده در آن نشان دهنده‌ی محصولات واکنش PCR برای حالت‌های متیله یا غیر متیله ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق بود. خانه‌هایی که با حرف M (قرمز رنگ) نشان داده شده مربوط به واکنش‌هایی است که در آن‌ها از پرایمرهای مربوط به ژن موردنظر در حالت متیله استفاده شد و خانه‌هایی که با حرف U (آبی رنگ) نشان داده شده مربوط به واکنش‌هایی است که در آن‌ها از پرایمرهای مربوط به ژن موردنظر در حالت غیرمتیله استفاده شد.

بحث

مبحث جالبی که امروزه به‌عنوان یکی از مسیرهای تنظیم بیان ژن مطرح شده، اپی ژنتیک است. این علم به تغییر در بیان ژن بدون هرگونه تغییری در سکانس نوکلئوتیدی آن گفته می‌شود. در واقع اپی ژنتیک، به ویژه متیلاسیون پروموتور ژن‌ها قادر است مراحل پیدایش سلول‌ها و بافت‌های مختلف و نیز

تمایز و مرگ سلولی را تحت تأثیر قرار دهد (26-29). براساس تحقیقات صورت گرفته بر روی مکانیسم‌های تکوینی مختلف، بشر به مفاهیم بنیادین در رابطه با مکانیسم‌های کنترل بیان ژن و فرآیندهای شکل‌گیری بافت پی برده است (5-8). نحوه‌ی تمایز به گروه‌های سلولی مختلف، عموماً وابسته

به تنظیم در سطح بیان ژن و عناصر کنترلی حد واسط نظیر فاکتورهای نسخه برداری خاص، فاکتورهای نظارت کننده بر چرخه ی تقسیم سلول‌ها، مرگ سلولی و عناصر سیگنالینگ سلول است (10-12). که گروهی از این عناصر حد واسط عبارتند از ژن‌های vHL، Ecad، Runx3. همان‌طور که در بخش نتایج عنوان شد، ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از دو جنبه مورد بررسی قرار گرفت: یکی از این ابعاد، موضوع بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های بنیادی CD34+ قبل از هرگونه تمایزی می‌باشد و موضوع دیگر روشن شدن وضعیت متیلاسیون در نواحی پروموتور همین ژن‌ها است. مساله مهمی که می‌توان در این قسمت به آن اشاره کرد این است که گروهی از ژن‌ها در توالی پروموتوری خود دارای ساختارهایی هستند که می‌تواند دچار تغییرات اپی ژنتیکی (مانند متیلاسیون) شده، بیان ژن مربوطه را بدون تغییر در توالی آن، دستکاری کند (26-28). به زبان دیگر اگر یک ژن در نواحی پروموتوری خود دارای مناطق غنی از سیتوزین و گوانین (CG Island Rich) باشد، این بدین معنی است که وضعیت متیلاسیون نواحی مذکور می‌تواند منتهی به خاموش شدن یا روشن شدن بیان ژن مورد نظر شود. بدیهی است که بیان یک ژن در پروفایل Gene Expression سلول مد نظر در مرحله ی نسخه برداری، با اصولی همچون اپی ژنتیک و متیلاسیون دارای ارتباط تنگاتنگ است (30). در سال ۱۹۶۰، خونسازی (Hematopoiesis) توسط دکتر جان پل به عنوان یک سیستم ایده آل برای بررسی الگوهای بیان ژن معرفی شد. جان توانست پروسه کنترل بیان ژن و مکانیسم‌های آن را در خونسازی تا حدودی تشریح کند (4). در مطالعات متعدد، نشان داده شده که پروفایل بیان ژنی (Gene Expression Profile) پیش سازهای متعهد به رده ی میلوئید تا حدود زیادی با پیش سازهای متعهد به رده ی اریتروئید هم پوشانی دارد؛ اما این پروفایل با پیش سازهای متعهد به رده ی لنفوئید، متفاوت است (4). همین‌طور نشان داده شده که پروفایل بیان ژن در

سلول‌های CD34+ با پیش سازها (Progenitors) متفاوت است. یعنی ژن‌هایی که در سلول‌های CD34+ بیان می‌شوند، بیشتر مربوط به انتقال سیگنال می‌باشند اما ژن‌هایی که در پیش سازها بیان می‌شوند، بیشتر مربوط به پاسخ ایمنی و یا متابولیسم هستند (4). یک نکته بسیار مهم و جالب توجه دیگر در ارتباط با تنظیم بیان ژن در سلول‌های هماتوپوئیتیک CD34+ این است که ژن‌هایی که در مرحله ی قبل از تمایز، در وضعیت غیر متیله (Un-methylated) به سر می‌برند، در مراحل پس از تمایز نیز غیرمتیله باقی می‌مانند، اما ژن‌هایی که در مرحله ی قبل از تمایز متیله هستند و از نظر بیان خاموش می‌باشند، در مراحل پس از تمایز، غیرمتیله می‌شوند و دارای بیان خواهند بود. (4). علاوه بر این امروزه فرآیند خونسازی به عنوان یک مدل ایده آل برای بررسی تغییرات اپی ژنتیک ضمن تمایز رده‌ای محسوب می‌شود (27). در سال‌های اخیر، بررسی الگوی متیلاسیون ژن‌های عامل تمایز سلول‌های CD34+ به رده‌های لنفوئید و میلوئید نشان داده که رده‌های میلوئیدی ضمن تمایز دارای کاهش و رده‌های لنفوئید، دارای افزایش متیلاسیون می‌باشند (27). در رابطه با نقش دقیق فاکتورهای مورد بررسی (vHL-Ecad-Runx3)، در سلول‌های هماتوپوئیتیک و همینطور الگوی بیان و متیلاسیون ژن‌های فوق در سلول‌های بنیادی خونساز، تاکنون مطالعات کافی انجام نشده، دانسته‌ها در این رابطه محدود و ناقص هستند. در واقع همانطور که ذکر شد، نتایج MSP برای ژن‌های E-Cad و Runx3 به صورت متیلاسیون نسبی و نتایج بررسی بیان ژن نیز برای موارد فوق مثبت است که می‌توان همخوانی داده‌های به دست آمده را نتیجه گیری کرد. از طرف دیگر برای ژن vHL، نتایج MSP بیانگر عدم متیلاسیون در این مرحله و نتایج آنالیز بیان ژن نیز نشان دهنده ی وجود محصول قابل انتظار در PCR و در نهایت بیان مثبت ژنی می‌باشد. نقش Runx3 در خونسازی در سال ۲۰۰۳ توسط Maggie مشخص شد و مورد بررسی قرار گرفت.

شدن آن در بدخیمی‌های انسانی گزارش شد. در سال ۱۹۹۹، ماکسول نیز در ردیف اولین کسانی بود که به نقش vHL در خونسازی اشاره کرد. نقش‌های احتمالی ژن vHL در سلول‌های بنیادی بر اساس مطالعات متعدد از این قرار است (13-19): کنترل دقیق پروسه‌ی چرخه سلولی، تکثیر و کنترل کیفیت ملکول‌های RNA در سلول‌های بنیادی، کنترل فرایندهای آپوپتوزیس و اندومیتوز در عملکرد سلول‌های بنیادی، کنترل مکانیسم‌های مرتبط با طول عمر و پیری سلول‌های بنیادی.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در مراحل مختلف این تحقیق نشان می‌دهد که متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن‌های مورد مطالعه (vHL, Runx3 و Ecad)، یکی از مسیرهای قطعی کنترل بیان این فاکتورهاست. در واقع بیان هیچکدام از فاکتورهای مورد بحث در سلول‌های هماتوپوئیتیک منفی نمی‌باشد و این گویای این نکته است که هر سه ژن، در متابولیسم سلول‌های بنیادی CD34+، دارای نقش تعریف شده می‌باشند. در میزان بیان فاکتورهای vHL, Runx3 و Ecad و نیز الگوی متیلاسیون در نواحی پروموتوری فاکتورهای فوق، همخوانی قابل قبولی دیده می‌شود. اگرچه وجود مغایرت و ناهمخوانی در این رابطه نیز دور از انتظار نیست، چراکه می‌توان گفت از یک طرف نتایج متیلاسیون در این مطالعه با استفاده از تکنیک MSP به دست آمده است که قادر به گزارش تفاوت‌های کمی متیلاسیون نبوده و به مقایسه الگوهای متیلاسیون به‌صورت کیفی می‌پردازد و از طرف دیگر در تنظیم میزان بیان ژن‌ها فقط یک مکانیسم ویژه نیست که ایفای نقش می‌کند و همیشه برآیند گروهی از مکانیسم‌های مختلف است که سطوح بیان هر ژنی را در سلول، دستخوش تغییر می‌نماید.

هیپرمتیلاسیون این ژن تاکنون در تعداد زیادی از بدخیمی‌های انسانی نشان داده شده است. به‌طور کلی نشان داده شده که بیان ژن Runx3 توسط سه مکانیسم اصلی تنظیم می‌شود:

- از دست دادن هتروژنیته (Loss of Heterogeneity) (LOH)
- تغییر موقعیت پروتئین (Protein Mislocalization).
- متیلاسیون پروموتور (Promoter Methylation).

با توجه به مطالعات پیشین می‌توان برای Runx3، نقش‌های احتمالی زیر را در سلول‌های بنیادی خونساز پیش‌بینی کرد: (20-24)، دخالت در مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با TGF- β ، هدایت تمایز سلول بنیادی به سمت میلوئید یا تیموسیت در شرایط خاص، تولید و تکامل بافت خونساز در خونسازی اولیه (جنینی)، کنترل میزان تکثیر در سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک با توجه به این نکته که Runx3 در ردیف فاکتورهای سرکوبگر تومور قرار دارد. برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ به نقش Ecad در خونسازی اشاره شد که همچون Runx3، هیپرمتیلاسیون آن در تعداد فراوانی از بدخیمی‌ها گزارش شده است. در مطالعات زیادی دیده شده که متیلاسیون پروموتور در ژن Ecad به تنهایی در تنظیم بیان این ژن دخیل نیست و مکانیسم‌های دیگری نظیر LOH در این پروسه نقش مهمی را ایفا می‌کنند. لازم به ذکر است که مطالعه‌ی مشابه در ارتباط با وضعیت بیان و متیلاسیون این ژن در سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک، تاکنون انجام نشده است و اکثر مطالعات به بررسی وضعیت متیلاسیون Ecad در بدخیمی‌ها پرداخته‌اند. می‌توان مواردی مثل القای چسبندگی بین سلولی در جزایر اریتروبلاستیک، پروسه شکل‌گیری سلول‌های خونساز CD34+ از مزودرم جنینی پس از لانه‌گزینی، کنترل تکثیر سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک، القای پروسه تخریب سلولی و مهم‌تر از همه، تنظیم پلاستیسیته و انعطاف‌پذیری سلول‌های CD34+ را از نقش‌های احتمالی ژن Ecad در سلول‌های هماتوپوئیتیک دانست (25). در سال ۱۹۹۴، هیپرمتیلاسیون ژن vHL (فون هیل لینداو)، و غیرفعال

References

- 1- Hong SH, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Lee JB, Bhatia M. Multiparameter comparisons of embryoid body differentiation toward human stem cell applications. *Stem Cell Res.* 2010; 5: 120-30.
- 2- 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: 15619-24.
- 3- 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: 307-17.
- 4- 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: 2620-7.
- 5- Lin JR, Guo KY, Li JQ, Yan DA. In vitro culture of human bone marrow mesenchymal stem cell clones and induced differentiation into neuron-like cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2003; 23: 251-3, 64.
- 6- Weidt C, Niggemann B, Hatzmann W, Zanker KS, Dittmar T. Differential effects of culture conditions on the migration pattern of stromal cell-derived factor-stimulated hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22: 890-6.
- 7- 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: 111-4.
- 8- Beaudette-Zlatanova BC, Knight KL, Zhang S, Stiff PJ, Zuniga-Pflucker JC, Le PT. A human thymic epithelial cell culture system for the promotion of lymphopoiesis from hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2011; 39: 570-9.
- 9- 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: 1165-75.
- 10- Park SW, Jun Koh Y, Jeon J, et al. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into functional CD34+ progenitor cells by combined modulation of the MEK/ERK and BMP4 signaling pathways. *Blood.* 2010; 116: 5762-72.
- 11- Yamamoto Y, Banas A, Murata S, et al. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J.* 2008; 275: 1260-73.
- 12- Saretzki G, Walter T, Atkinson S, et al. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008; 26: 455-64.
- 13- Maisel M, Habisch HJ, Royer L, et al. Genome-wide expression profiling and functional network analysis upon neuroectodermal

- conversion of human mesenchymal stem cells suggest HIF-1 and miR-124a as important regulators. *Exp Cell Res.* 2010; 316: 2760-78.
- 14- Clifford SC, Astuti D, Hooper L, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER. The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2001; 20: 5067-74.
- 15- Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 1999; 274: 24142-6.
- 16- Sutphin PD, Chan DA, Giaccia AJ. Dead cells don't form tumors: HIF-dependent cytotoxins. *Cell Cycle.* 2004; 3: 160-3.
- 17- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 2001; 61: 6669-73.
- 18- Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor--HIF-1alpha in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 90-7.
- 19- Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med.* 2004; 10: 594-601.
- 20- Li YZ, Wang SJ, Shi Y, Dai XL, Peng SF, Su ZL, et al. Cloning and expression of human Runx3 gene obtained from human peripheral blood CD8(+) T lymphocyte. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2009; 25: 107-10.
- 21- Ozaki T, Yamada C, Nakagawara A. Novel role of RUNX3 in the regulation of p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Seikagaku.* 2011; 83: 751-4.
- 22- Han YX, Liang DY. The role of the tumor suppressor RUNX3 in giant cell tumor of the bone. *Int J Oncol.* 2012; 40: 673-8.
- 23- Lee KS, Lee YS, Lee JM, et al. Runx3 is required for the differentiation of lung epithelial cells and suppression of lung cancer. *Oncogene.* 2010; 29: 3349-61.
- 24- Fukamachi H, Ito K. Growth regulation of gastric epithelial cells by Runx3. *Oncogene.* 2004; 23: 4330-5.
- 25- Tsang SM, Brown L, Lin K, et al. Non-junctional human desmoglein 3 acts as an upstream regulator of Src in E-cadherin adhesion, a pathway possibly involved in the pathogenesis of pemphigus vulgaris. *J Pathol.* 2012; 227: 81-93.
- 26- Colyer HA, Armstrong RN, Mills KI. Microarray for epigenetic changes: gene expression arrays. *Methods Mol Biol.* 2012; 863: 319-28.
- 27- 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: 3989-97.

- 28- Pastinen T, Sladek R, Gurd S, et al. A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. *Physiol Genomics*. 2004; 16: 184-93.
- 29- Holliday R. DNA methylation and epigenetic mechanisms. *Cell Biophys*. 1989; 15: 15-20.
- 30- Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 869-82.

Evaluating the Methylation Status in Promoter of vHL, Runx3 and Ecad Genes and Expression of These Genes in Cord Blood CD34⁺ Stem Cells

Azad M¹, Kaviani S², Mortazavi Y³, Norouzinia M⁴

¹Dept. of Laboratory Medicine, School of Allied Health, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

²Dept. of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

³Dept. of Pathology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

⁴Dept. of Medical Genetics, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Kaviani S, Dept. of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: kavianis@modares.ac.ir

Received: 23 Oct 2012 **Accepted:** 17 Apr 2013

Background and Objective: Specific differentiation processes to various cell lineages are closely associated with factors such as transcription factors, tumor suppressor elements and internal signaling pathways including vHL, Ecad, and Runx3. Epigenetics is an effective control mechanism of these factors, including several mechanisms such as methylation and acetylation. The main objective of this study was discovering the expression status of vHL, Runx3 and Ecad genes and determining the methylation patterns in the respective genes in hematopoietic cord blood stem cells.

Materials and Methods: After isolating the stem cells from cord blood, expansion of the desired cells and DNA purification from the cells, in the first stage cDNA was constructed from the RNA, and PCR was performed for the genes under study. In later stages, the processed DNA from the previous stages was used for MSP reaction.

Results: After PCR using designed primers to be used in Real-Time PCR and RNA derived cDNA of stem cells, it was found that all the genes under study were expressed in CD34⁺ stem cells. MSP in another stage of the study showed that Ecad and Runx3 genes are partially methylated and partially expressed, and vHL gene is not methylated and is completely expressed in this stage.

Conclusion: There is substantial agreement between gene expression and epigenetic alterations, and study of all the three genes indicates their effective role in biology and function of these stem cells in Hematopoietic stem cells.

Keywords: Methylation – hematopoietic stem cells – Cord blood – vHL – Runx3 – Ecad