

تعیین وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن های SFRP1 و SFRP2 در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن در بدو تشخیصی با روش MSP

البه درخشانفر^۱، دکتر شعبان علیزاده^۲، دکتر حسن رفیعی مهر^۳، دکتر فاطمه نادعلی^۴،

علی قاسمی^۵، مسعود کریمی^۵، نوشین شهاب^۵

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی میلوئیدی مزمن، یک بیماری میلوپرولیفراتیو مزمن است که با افزایش رده میلوئیدی، پلاکت و اریتروئیدی در خون محیطی و مغز استخوان همراه است. (SFRP یا Secreted Frizzled-Related Protein)، مهار کننده ی مهم مسیر پیام رسانی Wnt است که باعث مهار این مسیر در افراد سالم می شود. تنظیم نابجای مسیر پیام رسانی Wnt، یکی از دلایل شایع در بیولوژی سرطان و متیلاسیون در پروموتور ژن SFRP دلیل تکثیر کنترل نشده ی سلولی در سرطان است. لوسمی میلوئیدی مزمن اولین بیماری بود که نقش مسیر پیام رسانی Wnt در آن شرح داده شد. در مطالعه ی حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن های SFRP1 و SFRP2 در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن تازه تشخیص داده شده و افراد سالم تعیین گردید.

روش بررسی: نمونه خون محیطی ۳۳ بیمار CML در زمان تشخیص و ۲۵ فرد سالم به عنوان شاهد، جهت بررسی وضعیت متیلاسیون دو ژن SFRP1 و SFRP2 بررسی گردید. برای بررسی وضعیت متیلاسیون ژن های SFRP1 و SFRP2 از تکنیک (Methylation Specific- Polymerase Chain Reaction, Methylation Specific- PCR) استفاده شد. از آزمون من ویتنی برای بررسی ارتباط بین هیپرمتیلاسیون ژن های SFRP1 و SFRP2 با شاخص های بالینی بیماران استفاده شد. یافته ها: در مطالعه ی حاضر نتایج نشان داد که هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن های SFRP1 و SFRP2 به ترتیب ۱۶/۱ درصد و ۲۷/۲ درصد بود. هیچ یک از نمونه های کنترل متیلاسیون را نشان ندادند.

نتیجه گیری: متیلاسیون ژن های SFRP1 و SFRP2، همانند لوسمی ها و نئوپلازی های بافت های توپر در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن نیز دیده می شود. از این رو احتمال دارد که متیلاسیون این ژن ها در شروع این بیماری نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: لوسمی میلوئیدی مزمن، متیلاسیون دزوکسی نوکلئوتیک اسید، ژن SFRP

دریافت مقاله : مرداد ۱۳۹۵

پذیرش مقاله : آذر ۱۳۹۵

*نویسنده مسئول :

دکتر شعبان علیزاده:

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :
alizadehs@tums.ac.ir

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۲ دانشیار گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۴ دانشجوی دکتری هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون، موسسه عالی آموزشی پژوهشی طب انتقال خون، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

^۵ کارشناس آزمایشگاه تحقیقات، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic myeloid leukemia یا CML) شایع ترین اختلال میلوپرولیفراتیو است، که حدود ۱۵-۲۰٪ لوسمی ها را تشکیل می دهد (۱). CML یک بیماری کلونال در سلول های بنیادی چند توانی با شاخص کروموزومی فیلادلفیاست که در آن توده تام میلوئیدی افزایش می یابد. در این بیماری نقص در هماتوپوئیز و فیروز مغز استخوان در CML وجود دارد. کروموزوم فیلادلفیا در ۹۵٪ درصد موارد یافت می شود. ورود رده های نارس و نابالغ نیز به خون افزایش یافته و در نتیجه لکوسیتوز و شیفت به چپ بسیار شدیدی در خون محیطی ایجاد می شود که گاهی شمارش WBC به 50×10^9 نیز افزایش می یابد. پیشرفت ها در تحقیقات مولکولی برخی از علل لکوموزن CML را روشن ساخته است. عوامل خطر ساز مثل شمارش گلبول سفید و سن و سیتوزنتیک و تغییرات ژنتیکی مولکولی مانند هیپر دیپلوئید $t(9;22)$ ، $del(13)$ ، $t(3;21)(q26,q22)$ ، $t(3;3)(q21,q26)$ از جمله عوامل پیش آگهی دهنده ی مهم در بیماران مبتلا به CML می باشند (۲). در سال های اخیر نقش ناهنجاری های اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون پروموتور ژن های سرکوب کننده ی تومور از جمله خانواده ی SFRP (Secreted frizzled-related protein family) یا SFRP) در بیماری زایی سرطان ها نشان داده شده است، به طوری که این ناهنجاری ها می تواند در افزایش تکثیر و خودنوسازی، توقف بلوغ، تمایز و اپوپتوز بلاست های لوسمیک نقش داشته باشد (۲). مسیر پیام رسانی Wnt (Wnt Signaling System) یکی از مهمترین مسیرهای پیام رسانی سلولی است که نقش مهمی در تکامل جنین دارد و به عنوان یک مسیر ارتباطی بین سلول های یک بافت عمل می کند؛ که این فرایند باعث فعال شدن فاکتورهای رونویسی و در نتیجه تنظیم فرایندهایی مانند تقسیم و تمایز سلولی می شود. در سرطان ها این مسیر پیام رسانی از عملکرد طبیعی خارج شده و باعث می شود سلول های سرطانی به مقدار زیادی تکثیر یابند (۳). بتاکانتین یک تنظیم کننده ی رونویسی درون سلولی است که نقش مهمی در سرطان ها دارد. کنترل مقدار بتاکانتین و پایداری آن یکی از مهمترین وظایف مسیر پیام رسانی Wnt می باشد (۴).

در شرایط فقدان لیگاند Wnt مقدار بتاکانتین درون سیتوپلاسم کاهش می یابد که به دلیل تخریب بتاکانتین توسط کمپلکس کازین کیناز و گلیکوژن سنتاز کیناز B3 می باشد که آن را مستعد تخریب توسط سیستم پروتئازوم می کند، اما در شرایطی که لیگاند Wnt به گیرنده ی خود یعنی Frizzled اتصال می یابد، باعث

فعال شدن پروتئین هایی به نام DV1 یا Disheveled می شود (۵). پروتئین DV1 با مهار فسفریلاسیون و در نتیجه جلوگیری از تخریب بتاکانتین باعث افزایش مقدار آن در سیتوپلاسم می شود. هنگامی که مقدار سیتوپلاسمی بتاکانتین افزایش می یابد به درون هسته انتقال یافته و باعث افزایش بیان ژن های می شود که در تقسیم و تمایز سلولی نقش دارند (۶).

SFRP به عنوان آنتاگونیست مسیر پیام رسانی Wnt، مستقیماً به لیگاند Wnt متصل شده و با مهار اتصال Wnt به رسپتور Fz به عنوان مهار کننده ی مهم مسیر Wnt عمل می کند و در افراد سالم مانع از فعال شدن مسیر پیام رسانی می شود؛ اما در افراد مبتلا به سرطان که ژن SFRP متیله شده و بیان نمی شود، نقش مهارتی SFRP از روی مسیر Wnt برداشته شده و با فعال شدن این مسیر، کمپلکس APC (Anaphase-Promoting Complex) تخریب و در پی آن مقدار بتاکانتین در سیتوپلاسم افزایش می یابد و با انتقال به درون هسته به عنوان یک فاکتور رونویسی باعث افزایش بیان ژن های مانند MYC و سیلین D می شود که در چرخه ی سلولی نقش دارند (۷-۱۰). افزایش بیان ژن ها نیز در پی آن باعث افزایش تکثیر سلول ها می شود (۱۱). در نتیجه تنظیم بیان ژن SFRP به عنوان مکانیسم پایداری و فعالیت بتاکانتین در مسیر پیام رسانی Wnt عمل می کند. خانواده ی پروتئین SFRP شامل ۵، ۴، ۳، ۲، ۱ SFRP است. هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن SFRP مانع از بیان آن شده و در نتیجه باعث فعال شدن مسیر Wnt در سرطان های کولورکتال، سر و گردن، معده و سایر سرطان ها می شود. نتایج این مطالعات نشان می دهد که کاهش در بیان خانواده ژنی SFRP باعث افزایش یا شروع بدخیمی در سلول ها می شود (۱۱-۱۳).

اولین بدخیمی هماتولوژیک که نقش مسیر پیام رسانی Wnt در آن شرح داده شده CML بود (۱۴). نقص مسیر پیام رسانی Wnt در بعضی از بیماری های هماتولوژیک از جمله AML و CLL مشخص شده است (۱۶ و ۱۵).

با توجه به نقش اپی ژنتیک در ایجاد سرطان، هدف مطالعه ی حاضر تعیین وضعیت متیلاسیون ژن های SFRP1 و SFRP2 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) در بدو تشخیص است.

روش بررسی

این مطالعه به صورت موردی-شاهدی (Case-Control Study) انجام شد. در این تحقیق جامعه آماری شامل ۳۳ بیمار مبتلا به

DNA توسط کیت (Epitect Bisulfite Kit, Qiagene) و بر اساس دستور شرکت سازنده تیمار شد. از آنجایی که آنزیم Taq پلیمرز PCR معمولی بین سیتوزین متیله و غیرمتیله فرقی نمی‌گذارد، برای ایجاد این تمایز از بی‌سولفیت سدیم استفاده شد. این ترکیب باعث می‌شود سیتوزین‌های غیر متیله به یوراسیل تبدیل شوند، درحالی که سیتوزین‌های متیله بدون تغییر باقی می‌مانند. این تبدیل عامل اصلی تفکیک DNA متیله از غیر متیله در MSP یا Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction است. بعد از تیمار توسط بی‌سولفیت سدیم سیتوزین‌های غیرمتیله به یوراسیل تبدیل شدند، درحالی که سیتوزین‌های متیله بدون تغییر باقی ماندند. در مرحله‌ی بعد برای بررسی الگوی متیلاسیون DNA در پروموتور ژن SFRP1 و SFRP2 از روش MSP استفاده شد. در این روش دو جفت پرایمر که مختص وضعیت متیله و غیرمتیله است، به کار رفت. توالی پرایمرها در مطالعات قبلی طرحی شده بود.

لوسمی مزمن میلوئیدی (CML) با محدوده سنی ۲۰ تا ۷۲ سال و میانگین سنی ۶۳/۵ سال بود. از این تعداد ۲۳ نفر را مردان و ۱۰ نفر را زنان تشکیل می‌دادند.

نمونه‌گیری از ۳۳ بیمار با تشخیص اولیه CML از بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی انجام شد. بیمارانی که تحت درمان رادیوتراپی، شیمی درمانی یا ایمونوتراپی بودند و همچنین افرادی که مبتلا به سرطان‌های دیگری بودند از جامعه‌ی آماری حذف شدند. قبل از انجام نمونه‌گیری فرم رضایت‌نامه از بیماران گرفته شد.

از هر بیمار ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی حاوی EDTA گرفته شد. حدود ۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر ضد انعقاد EDTA ۰/۵ مولار جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله برای جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای و استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل و برای آزمایش آماده شدند.

DNA با استفاده از کیت VIOGENE استخراج شد. سپس

جدول ۱: توالی پرایمر

PRIMER	توالی	دمای بازسرشت (annealing)	اندازه‌ی محصول (bp)
SFRP1 MF	TGT AGT TTT CGG AGT TAG TGT CGC GC	۶۲	۱۲
SFRP1 MR	CCT ACG ATC GAA AAC GAC GCG AACG		
SFRP1UF	GTT TTG TAG TTT TTG GAG TTA GTG TTG TGT	۵۴	۱۳۵
SFRP1 UR	CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA		
SFRP2 MF	GGG TCGGAG TTT TTC GGA GTT GCG C	۶۲	۱۳۸
SFRP2 MR	CCG CTC TCT TCG CTA AAT ACG ACT CG		
SFRP2 UF	TTT TGG GTT GGA GTT TTT TGG AGT TGT GT	۶۴	۱۴۵
SRP2 UR	AAC CCA CTC TCT TCA CTA AAT ACA ACT CA		

M: Methylated; U: Unmethylated; F: Forward; R: Reverse

برای ۲۰ ثانیه، ۵۴°C برای ۳۰ ثانیه (SFRP1-UM Primer)، ۶۴°C برای ۳۰ ثانیه primer (SFRP2-UM)، و ۶۲°C برای ۳۰ ثانیه (SFRP1, SFRP2-M Primer)، و ۷۲°C برای ۷ دقیقه عمل‌طویل شدن، ادامه داده شد. جهت تایید محصول MSP، الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد انجام شد. برای بررسی ارتباط بین پارامترهای بالینی و ژن‌های SFRP1 و SFRP2، از آزمون‌های Mann-whitney U استفاده شد. کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تحلیل شد. P < ۰/۰۵۰ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

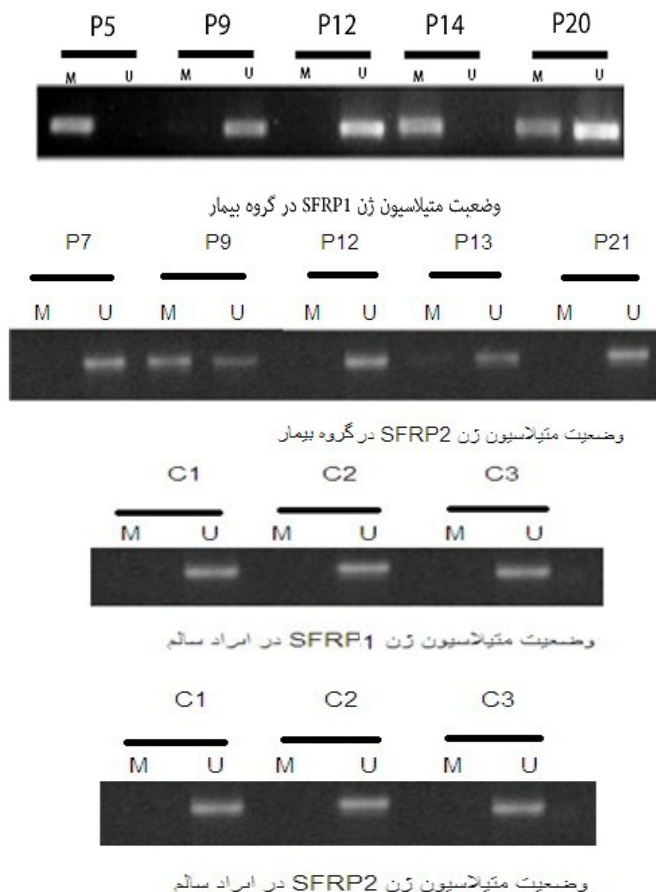
یافته‌ها

جامعه‌ی آماری مورد مطالعه شامل ۳۳ بیمار که ۲۳ نفر

در واکنش MSP برای هر بیمار ۴ واکنش با پرایمرهای متیله و غیرمتیله مربوط به ژن‌های SFRP1 و SFRP2 گذاشته شد. برای بررسی وضعیت متیله از ۲ میکرولیتر DNA از قبل تیمار شده به وسیله بی‌سولفیت ۴/۵ میکرولیتر d H₂O، ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر مستقیم، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس، و برای بررسی وضعیت غیرمتیله از ۲ میکرولیتر DNA و ۸/۵ میکرولیتر d H₂O، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر مستقیم، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس به همراه ۱ میکرولیتر Mgcl₂ استفاده شد. ابتدا اجزای واکنش MSP در شرایط پیش‌دمایی که شامل ۹۸°C به مدت ۱ دقیقه و ۹۶°C به مدت ۳ دقیقه بود قرار گرفت و سپس این واکنش توسط ۴۰ سیکل دمایی شامل ۹۹°C برای ۱۰ ثانیه، ۹۷°C

مورد (۲۴/۲٪) به صورت همی متیله، ۶ مورد (۱۶/۱٪) کاملاً متیله و ۱۹ مورد (۶۰/۶٪) به صورت کاملاً غیر متیله بود. همچنین تمام نمونه های کنترل برای ژن SFRP1 به صورت غیر متیله بود. برای ژن SFRP2 از ۳۳ نمونه ۸ نمونه (۲۴/۴٪) به صورت همی متیله، ۹ نمونه (۲۷/۲٪) به صورت کاملاً متیله، و ۱۶ مورد (۴۸/۴٪) به صورت کاملاً غیر متیله بود. تمام نمونه های کنترل برای ژن SFRP2 در وضعیت غیر متیله قرار داشتند.

(۶۹/۶٪) مرد و ۱۰ نفر (۳۰/۳٪) زن بودند. محدوده سنی بیماران بین ۲۰ تا ۷۲ سال و میانگین سنی آنها ۵۸/۵ سال بود. شمارش گلبول های سفید و پلاکت ها به ترتیب در دامنه ۷۵۷۶۸/۷۸-۲۲۶۰۰۰ و ۳۴۶۰۰۰-۲۰۰۰ و میانگین آنها به ترتیب ۷۵۷۶۸/۷۸ و ۶۷۵-۱۲ گرم در صد و میانگین آن ۱۰/۹ گرم در صد بود. وضعیت متیلاسیون در بیماران به سه شکل غیر متیله، همی متیله و کاملاً متیله بود. برای ژن SFRP1 در افراد بیمار از ۳۳ بیمار ۸



شکل ۱: وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن های SFRP1 و SFRP2 در بیماران CML و نمونه های کنترل. تصاویر بالا نشان دهنده ی وضعیت متیلاسیون SFRP1 و SFRP2 در چند نمونه از بیماران مبتلا به CML و تصاویر پایین نشان دهنده ی نمونه های کنترل در افراد سالم. بیمار=P، متیله=M، غیر متیله=U

جدول ۲: ارتباط بین پروفایل متیلاسیون SFRP1 و SFRP2 با ویژگی های بالینی و آزمایشگاهی بیماران

ویژگی ها	SFRP2			SFRP1				
	مقدار-P	غیر متیله	متیله	همی متیله	مقدار-P	غیر متیله	متیله	همی متیله
تعداد بیماران (درصد)		۱۶	۹	۹		۱۹	۶	۸
میانگین سن (سال)	۰/۵۹۶	۵۴	۵۳	۴/۴۳	۰/۸۴۶	۴۳	۵۰	۵۸
جنس								
زن	۰/۶۸۸	۱	۳	۶	۰/۵۹۷	۶	۱	۳
مرد		۴	۵	۱۴		۳	۱۵	۵
متوسط تعداد گلبول سفید $10^9/L$	۱	۷۱	۱۱۹	۸۵	۰/۰۹۳	۱۱۳	۶۰	۷۳

متوسط میزان هموگلوبین g/dL	۸	۶	۸/۲	۰/۳۶۱	۷	۹	۹/۱	۰/۹۵۷
متوسط تعداد پلاکت $L10^9$	۱۰۱	۷۵	۷۳	۰/۳۶۵	۸۵	۹۴	۱۱۵	۰/۹۵۸

در بدخیمی‌های هماتولوژی رخ داده و این رویداد می‌تواند مرحله ی آغازین در پاتوژنز این نئوپلاسم‌ها به شمار آید (۲۴). از جمله ژن‌هایی که هیپرمتیلاسیون آنها مانع از بیان این ژن‌ها می‌شود شامل خانواده‌ی ژن‌های SFRP می‌باشد (۲۷-۲۵).

مسیر سیگنال دهی Wnt/ β -catenin در فرایندهایی چون: تکثیر، مورفولوژی، حرکت، تعیین سرنوشت سلول و رشد اندام‌ها نقش دارد. اختلال در مسیر سیگنال دهی Wnt/ β -catenin سبب رشد و تکثیر سلول‌های توموری و همچنین کاهش آپوپتوز می‌شود (۲۸). نقش سیگنال‌دهی Wnt در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سبب به وجود آمدن این فرضیه شده است که نقص در این مسیر سیگنال‌دهی، ممکن است در پاتوژنز لوسمی‌ها نقش داشته باشد (۲۹). SFRP یک پروتئین سرکوب‌کننده‌ی تومور است که به وسیله اتصال به پروتئین Wnt مانع از اتصال آن به گیرنده‌اش یعنی Wnt-frizzled receptor می‌شود و در نتیجه مانع فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt می‌شود. از این‌رو میان متیلاسیون ژن‌های آنتاگونیست Wnt و فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt در تومورهای توپور و لوسمی‌ها ارتباط وجود دارد. اولین بدخیمی هماتولوژیک، که نقص مسیر پیام دهی Wnt در آن شرح داده شد، CML بود (۱۴).

مطالعه ی حاضر روی ۳۳ بیمار مبتلا به CML و ۲۵ فرد سالم به عنوان شاهد انجام شد. نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد که فراوانی هیپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP2 و SFRP1 در این بیماران در هنگام تشخیص به ترتیب ۱۶/۱ درصد (۶ نفر از ۳۳ بیمار) و ۲۷/۲ درصد (۹ نفر از ۳۳ بیمار) بود. در حالی که در گروه شاهد هیچ‌گونه متیلاسیون در پروموتور این ژن‌ها مشاهده نشد.

در سال ۲۰۰۹ مطالعه ای توسط Pehlivan و همکاران روی ۴۸ بیمار مبتلا به CML در فاز مزمن انجام شد، و نتایج مطالعه به این صورت بود: ۴۱ بیمار به صورت غیرمتیله، ۶ بیمار به صورت همی متیله و ۱ بیمار کاملاً متیله بود. این مطالعه ثابت کرد که فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt از طریق متیلاسیون پروموتور ژن SFRP1، سبب مقاومت بیماران مبتلا به CML به درمان با ایماتینیب از طریق مهار ایماتینیب بر روی مسیر سیگنال‌دهی BCR-ABL می‌شود (۳۰).

در سال ۲۰۱۳، Perry و همکاران متیلاسیون SFRP2 را روی ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات بررسی کردند که از ۲۰ بیمار ۲ نفر برای ژن SFRP2 متیله بودند. در این مطالعه هیپرمتیلاسیون

با توجه به نتایج اعلام شده در جدول ۲، فراوانی هیپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP2 و SFRP2 در بیماران مبتلا به CML در هنگام تشخیص به ترتیب ۶ نفر از ۳۳ بیمار (۱۶/۱٪) و ۹ نفر از ۳۳ بیمار (۲۷/۲٪) بود. هیچ‌گونه ارتباطی بین هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP1 و SFRP2 با پارامتر بالینی بیمار شامل جنس، سن، هموگلوبین، شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید مشاهده نشد.

بحث

با توجه به اینکه تومورها در نتیجه ی انباشته شدن یکسری تغییرات مولکولی ژنتیکی (تغییرات ژنومیک) ایجاد می‌گردند شکل‌گیری تومورها محدود به تغییرات ژنتیکی نبوده و تغییرات اپی‌ژنتیکی نیز در این امر دخیل هستند. تغییرات اپی‌ژنتیک توالی اصلی DNA را متاثر نمی‌سازد اما در سراسر چرخه های تقسیم سلول پایدار مانده و به ارث می‌رسند (۱۷). مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک با تغییر اجزای تشکیل دهنده ی کروماتین منجر به تغییر ساختار کروماتین می‌شوند که این امر به نوبه ی خود الگوی بیان ژن را تغییر می‌دهد (۱۸). مهمترین مکانیسم اپی‌ژنتیک شامل عوامل تغییر دهنده ی ساختار کروماتین، عوامل تغییر دهنده ی هیستون‌ها، متیلاسیون DNA و RNA‌های کوچک تنظیمی هستند (۱۹). متیلاسیون DNA شناخته شده‌ترین نشانگر اپی‌ژنتیک به شمار می‌رود که DNA شامل افزوده شدن گروه متیل روی باز سیتوزین موجود در نواحی غنی از دی نوکلئوتیدی CPG در سطح ژنوم است که به جزایر CPG معروفند (۲۰). مطالعات، ثابت کرده است که هیپرمتیلاسیون در جزایر CpG در مناطق پروموتور ژن‌های سرکوب کننده ی تومور مانع از بیان آنها و در نتیجه باعث سرطان می‌شود (۲۱). جزایر CPG ژن‌های سرکوب کننده ی تومور در بافت‌های طبیعی غیرمتیله هستند، اما این جزایر غالباً طی فرایند شکل‌گیری تومور هیپرمتیله می‌شوند که این امر موجب القای خاموشی در ژن‌های سرکوب کننده ی تومور شده و می‌تواند یک مرحله ی اساسی در شکل‌گیری و توسعه ی تومور باشد (۲۲). در تومورهای انسانی، ژن‌هایی که متحمل متیلاسیون غیر طبیعی جزایر CPG یا Cytosine-phosphate-guanine در ناحیه ۵ ژن می‌شوند، طیف گسترده‌ای از مسیرهای مولکولی درگیر در تومورزایی شامل چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز، تعمیر DNA را شامل می‌شوند (۲۳). خاموش شدن ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور به واسطه‌ی هیپرمتیلاسیون DNA، به طور اختصاصی



SFRP2 را به عنوان یک فاکتور خطر در سرطان پروستات در نظر گرفتند (۳۱).

Te-Hui Liu روی ۱۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوئیدی مزمن (CLL)، متیلاسیون ژن SFRP4 را بررسی کرد که از ۱۰ بیمار ۲ مورد متیله بود؛ او در این مطالعه به این نتیجه رسید که تغییرات اپی ژنتیک مانند متیلاسیون DNA همراه تغییرات ژنتیکی دیگر در خاموش شدن ژن‌ها نقش مهمی دارد (۱۵). قاسمی و همکاران در سال ۲۰۱۵ روی ۴۳ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (۳۱) نفر مرد و ۱۲ نفر زن با میانگین سنی ۴۵/۴ سال) نتایج زیر را به دست آوردند:

برای ژن SFRP1 از ۴۳ بیمار، ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) به صورت همی متیله، ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) به صورت کامل متیله و ۱۷ مورد (۳۹/۵ درصد) به صورت کامل غیرمتیله بودند. همچنین برای ژن SFRP2 از ۴۳ بیمار، ۱۶ نمونه (۳۷/۲ درصد) به صورت همی متیله، ۹ نمونه (۲۰/۹ درصد) به صورت کاملاً متیله و ۱۸ مورد (۴۱/۸ درصد) به صورت کامل غیر متیله بودند (۳۲).

همان گونه که گفته شد متیلاسیون ژن‌های SFRP در بدخیمی‌های هماتولوژیکی مثل AML (۳۰)، CML (۳۱)، CLL (۱۰) نیز گزارش شده است. با توجه به درصد متیلاسیون SFRP1 و SFRP2 در مطالعه حاضر همانند مطالعات مشابه، می توان نتیجه گرفت، متیلاسیون این ژن‌ها ممکن است در شروع بیماری CML نقش داشته باشد.

نتیجه گیری

مطالعه ی حاضر نیز مانند سایر مطالعات نشان داد که متیلاسیون این دو ژن می‌تواند در شروع بیماری CML نقش داشته

باشد. همچنین در این مطالعه ارتباط معنی داری بین متیلاسیون این ژن‌ها با یافته‌های بالینی بیماران مانند: سن، جنس، شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها مشاهده نشد. لذا متیلاسیون این ژن‌ها تنها فاکتور مرتبط با بیماری نیست بلکه حوادث مولکولی دیگری نیز در شروع و ایجاد بیماری می‌تواند دخیل باشد.

با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان علت تناقض نسبی نتایج مربوط به ژن SFRP1 و SFRP2 با سایر مطالعات را بدین شرح خلاصه کرد: بعضی از مطالعات مشابه روش کار متفاوتی داشتند. ماهیت و تنظیم اپی ژنتیکی این نکته را متذکر می‌شود که تفاوت‌های قومیتی در جوامع گوناگون و نیز نقش عوامل محیطی در این مورد ممکن است در تناقض مورد نظر دخالت داشته باشد. تفاوت در مطالعات گوناگون ممکن است ناشی از عدم همسانی نمونه‌گیری از نظر مرحله ی بیماری، تعداد نمونه‌ها و نوع نمونه باشد.

با توجه به اینکه در اکثر سرطان‌های انسانی، فعال شدن نابجا و غیرطبیعی مسیر پیام رسانی Wnt به علت متیلاسیون ژن‌های SFRP و سایر مهارکننده‌های این مسیر اتفاق می‌افتد، برای به دست آوردن نتایج قطعی از متیلاسیون ژن SFRP1 پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری با افزایش تعداد نمونه‌ها و انجام مطالعه در سایر بدخیمی‌های خونی و همچنین انجام مطالعه با روش‌های دقیق تر مثل BSP انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه ی طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۸۲۳۱ مورخ ۱۳۹۱/۳/۳۱ می باشد.

منابع

1. Azad M, Bakhshi Biniiaz R, Goudarzi M, Mobarra N, Alizadeh SH, Nasiri H, et al. Short view of Leukemia diagnosis and treatment in Iran. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 2015; 9(2): 88-94.
2. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 1(243): 290-3.
3. Azad M, Kaviani S, Noruzinia M, Mortazavi Y, Mobarra N, Alizadeh S, et al. Gene expression status and methylation pattern in promoter of P15INK4b and P16INK4a in cord blood CD34+ stem cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2013; 16(1): 822-8.
4. Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, et al. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Research* 2006; 66(17): 8462-9468.
5. Lee W & Zhu B. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* 2006; 27(2): 269-77.

6. Marsit C, McClean M, Furniss C & Kelsey K. Epigenetic inactivation of the SFRP genes is associated with drinking, smoking and HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 2006; 119(8): 1761-6.
7. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz J, Cisneros E & Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: New functions of secreted frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science* 2008; 121(6): 737-46.
8. Marsit C, Karagas M, Andrew A, Liu M, Danaee H, Schned A, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. *Cancer Research* 2005; 65(16): 7081-5.
9. Suzuki H, Watkins D, Jair KW, Schuebel K, Markowitz S, Chen W, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genetics* 2004; 36(4): 417-22.
10. Logan C & Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Development Biology* 2004; 20(1): 781-810.
11. Anand MS, Varma N, Varma S, Rana KS & Malhotra P. Cytogenetic & molecular analyses in adult chronic myelogenous Leukaemia patients in north. *Indian Journal of Medical Research* 2012; 135(1): 42-8.
12. Wang H, Fan R, Wang XQ, Lin GW, Wu DP, Xu Y, et al. Methylation of Wnt antagonist genes: A useful prognostic marker for myelodysplastic syndrome. *Annals of Hematology* 2013; 92(2): 199-209.
13. Hehlmann R, Hochhaus A & Baccarani M. Chronic myeloid Leukaemia. *The Lancet* 2007; 370(9584): 342-50.
14. Jamieson C, Ailles L, Dylla S, Muijtjens M, Jones C, Zehnder J, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *New England Journal of Medicine* 2004; 351(7): 657-67.
15. Te-Hui Liu AR. CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic Leukemia. *Cancer Research* 2006; 66(2): 653-8.
16. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2009; 373(31): 211-65.
17. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447(7143): 396-8.
18. Ghaedi K, Miri M & Tavassoli M. Process of epigenetic in cancer. *Genetic in 3rd Millennium* 2007; 5(4): 1191-5[Article in Persian].
19. Totonchi M, Momeni-Moghadam M & Baharvand H. Epigenetic of stem cells. *Yakhteh* 2007; 9(1): 51-66[Article in Persian].
20. Esteller M. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine* 2008; 358(11): 1148-59.
21. Lande-Diner L & Cedar H. Silence of the genes--mechanisms of long-term repression. *Nature Reviews Genetics* 2005; 6(8): 648-54.
22. Ullah F, Khan T, Ali N, Malik FA, Kayani MA, Shah ST, et al. Promoter methylation status modulate the expression of tumor suppressor (RbL2/p130) gene in breast cancer. *PLoS One* 2015; 10(8): 134687.
23. Esteller M, Fraga M, Guo M, Trojan J, Bignon YJ, Ramus S, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimics sporadic tumorigenesis. *Human Molecular Genetics* 2001; 10(26): 3001-7.
24. Esteller M, Silva J, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(7): 564-9.
25. Baylin S, Höppener J, de Bustros A, Steenbergh P, Lips C & Nelkin B. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Research* 1986; 46(6): 2917-22.
26. Kim Y. Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review. *Molecular Nutrition & Food Research* 2007; 51(3): 267-92.
27. Zeschnigk M, Lohmann D & Horsthemke B. A PCR test for detection of hypermethylated alleles at the retinoblastoma locus. *Journal of Medical Genetics* 1999; 36(10): 793-4.
28. Kawano Y & Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science* 2003; 116(13): 2627-34.

29. Blount B, Mack M, Wehr C, MacGregor J, Hiatt R, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94(7): 3290-5.
30. Pehlivan M, Sercan Z & Sercan HO. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid Leukemia. *Leukemia Research* 2009; 33(8): 1062-7.
31. Perry AS, Kay E, Wong S, Barrett C, Loftus B, Hurley E, et al. Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. *International Journal of Cancer* 2013; 132(8): 1771-80.
32. Ghasemi S, Chahardouli B, Alizad Ghandforosh N, Ghotaslou A & Nadali F. Study of SFRP1 and SFRP2 methylation status in patients with de novo acute myeloblastic Leukemia. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 2015; 9(1): 15-21.

Determination of SFRP1 and SFRP2 Genes Promoter Methylation Status in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia

Derakhshanfar Elahe¹ (B.S.) – Alizadeh Shaban² (Ph.D.) – Rafiemehr Hassan³ (Ph.D.) – Nadali Fateme² (Ph.D.) – Qasemi Ali⁴ (M.S.) – Karimi Masuod⁵ (B.S.) – Shabab Nushin⁵ (B.S.)

1 Master of Sciences Student in Hematology & Blood Bank, Hematology & Blood Bank Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Associate Professor, Hematology & Blood Bank Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Assistant Professor, Medical Laboratory Sciences Department, School of Paramedicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

4 Ph.D. Candidate in Laboratory Hematology & Blood Transfusion Sciences, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran

5 Expert of Research Laboratory, School of Paramedicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Abstract

Received: Jul 2016

Accepted: Nov 2016

Background and Aim: Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm that is characterized by an expansion of myeloid, erythroid cells and platelets in peripheral blood and myeloid hyperplasia in bone marrow. Secreted frizzled-related protein family is a negative regulator of the Wnt signaling pathway that suppresses this signaling pathway in healthy individuals. Aberrant regulation of the Wnt signaling pathway is a prevalent theme in cancer biology, and methylation in promoter of SFRP family has been shown to cause uncontrolled cell proliferation in cancer. Chronic myeloid leukemia was the first malignancy in which the important role of Wnt signaling pathway has been described.

In the present study, we examined the methylation status of SFRP1 and SFRP2 genes in patients with CML.

Materials and Methods: Blood samples were obtained from 25 healthy individuals and 33 patients with chronic myeloid leukemia (23 male, 10 female). Then isolated DNA was treated with sodium bisulfite and analyzed by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with primers specific for methylated and unmethylated promoter sequences of the SFRP1 & -2 genes. We used Mann-Whitney u-tests to investigate the correlation between SFRP-1 and SFRP-2 genes hypermethylation and clinical parameters.

Results: In CML patient hypermethylation frequency of SFRP-1 and SFRP-2 genes were 16.1% and 27.2% respectively. In control group SFRP-1 and SFRP-2 genes were unmethylated.

Conclusion: The present study showed that, methylation of SFRP genes also occurs in CML like other solid tumors. Therefore, the methylation of these genes may play a role in the initiation of malignant disease.

Keywords: Chronic Myelogenous Leukemia, DNA Methylation, SFRP Gene

* Corresponding Author:

Alizadeh SH;

Email:

alizadehs@tums.ac.ir