

بررسی الگوی متیلاسیون ناحیه پرموتری ژن گاماگلوبین در ناقلین و بیماران مبتلا به تالاسمی بتا با هموگلوبین جنینی بالا در مقایسه با افراد طبیعی

محمد حمید*^۱، زهره شجاعی^۲

مقاله پژوهشی

مقدمه: از عواملی که احتمالاً با بیان مجدد ژن گاماگلوبین در بزرگسالی مرتبط است تغییر الگوی متیلاسیون ناحیه پرموتری آن است. هدف از این مطالعه تعیین میزان همراهی الگوی متیلاسیون پرموتر ژن گاماگلوبین با میزان بیان این ژن در بیماران و ناقلین بتا تالاسمی است.

روش بررسی: در این مطالعه که به صورت موردی - شاهدی انجام گرفته است. بعد از گرفتن نمونه خون از ۳۰ بیمار و ناقل تالاسمی بتاگلوبین با هموگلوبین جنینی بالا و ۳۰ فرد نرمال استخراج DNA انجام گردید. سپس نمونه‌های DNA با سدیم بیسولفیت تیمار شده، ۶ جایگاه CpG در محدوده پرموتر و اگزون ۱ ژن گاماگلوبین به روش Bisulfite sequencing analysis مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون آماری t-test استفاده گردید. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به معنای اختلاف معنی‌دار بین دو گروه انتخاب شد. داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS version 16 تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: در این بررسی هایپومتیله بودن ناحیه پرموتری ژن گاماگلوبین نمونه‌های بیماران و ناقلین در مقایسه با نمونه‌های نرمال تفاوت معنی‌داری در سه جایگاه +۶، +۳ و -۱۶۲ مشاهده شد ($p < 0/05$). به علاوه در سه نمونه، موقعیت -۱۶۲ - دارای وضعیت نیمه متیله بود که این وضعیت به طور واضحی متفاوت از دیگر نمونه‌های بیمار و نرمال بود.

نتیجه‌گیری: هایپومتیلاسیون پرموتر ژن گاماگلوبین احتمالاً عامل کمکی در افزایش هموگلوبین جنینی است.

واژه‌های کلیدی: بتا تالاسمی، هموگلوبین جنینی، متیلاسیون

ارجاع: حمید محمد، شجاعی زهره. بررسی الگوی متیلاسیون ناحیه پرموتری ژن گاما گلوبین در ناقلین و بیماران مبتلا به تالاسمی بتا با هموگلوبین جنینی بالا در مقایسه با افراد طبیعی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۲): ۳۳-۳۵۲۴.

۱- بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۲- گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۲۸۵۸۰۵۸، پست الکترونیکی: hamid143@yahoo.com، صندوق پستی: ۱۹۶۳۷۳۷۶۱۱

بازدارنده‌های DNA متیل ترانسفرازها ایفا می‌کند (۵) در طی بیان ژن‌های خوشه ژنی بتاگلوبین جایگاه‌های CpG در پروموتور ژن‌ها غیرمتیله می‌باشند درحالی‌که با خاموش شدن ژن‌ها این جایگاه‌ها تمایل به متیله شدن دارند (۳). متیلاسیون CpG ممکن است مانعی برای تشکیل کمپلکس آغازگر نسخه‌برداری بوده و به‌طور غیرمستقیم از تغییر وضعیت کروماتین پیشگیری کند. شواهد نشان می‌دهد که متیلاسیون اثری روی تشکیل نوکلئوزوم ندارد اما DNA متیله شده پروتئین‌های متصل شونده به متیل را فراخوانده که با هیستون دی استیلاز برهمکنش کرده و در تغییرات کروماتین نقش دارد (۶). ناحیه CpG متیله ممکن است برای مهار رونویسی، از طریق دخالت مستقیم در اتصال فاکتور رونویسی و یا از طریق اتصال با پروتئین‌های اس Stage Selector Protein (SSP) عمل کند و یا به‌واسطه تغییر در ساختار کروماتین و فشرده شدن آن مانع رونویسی گردد (۷). این حقیقت که فعال شدن ژن گاماگلوبین در سلول‌های طبیعی تولیدکننده سلول‌های خونی در ارتباط تنگاتنگ با هیپومتیلاسیون سایت CpG در ده جفت باز بالادست نقطه شروع رونویسی است، مشخص شده است این سایت محل اتصال وابسته به متیلاسیون فاکتورهای رونویسی خاصی از جمله کمپلکس پروتئینی SSP است (۸). در مطالعات روی پروموتور ژن‌های گاما و بتا گلوبین نیز مشخص شده است که میزان بیان آن‌ها با متیلاسیون پروموتورشان رابطه معکوس دارد به این معنا که در سلول‌های خونی جنین پروموتور گاماگلوبین هیپومتیله است و در طی رشد جنین بیشتر و بیشتر متیله می‌شود تا جایی که در سلول‌های خونی بالغین هایپرمتیله می‌شود (۹). در این مطالعه میزان همراهی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن گاماگلوبین در ناقلین و بیماران مبتلا به تالاسمی بتا با هموگلوبین جنینی بالا در مقایسه با افراد طبیعی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

نمونه‌ها: در مطالعه حاضر، که به‌صورت مورد - شاهدی انجام گرفته است. شرکت کنندگان در این مطالعه (زن و مرد) با حداقل ۲ سال و حداکثر ۵۰ سال از مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه ژنتیک نرگس اهواز و انستیتو پاستور ایران انتخاب

هموگلوبین جنینی، نوعی هموگلوبین غالب در دوره جنینی است که تنها مدت کوتاهی بعد از تولد باقی می‌ماند و زمانی تولید آن کاهش می‌یابد، که هموگلوبین بالغین رو به افزایش رود. مقادیر بالای هموگلوبین جنینی فواید سازمان یافته بالینی و گسترده‌ای را در بیماران بتا تالاسمی و بیماری کم خونی سلول‌های داسی شکل ایجاد می‌کند. افزایش هموگلوبین جنینی باعث افزایش هموگلوبین کل و کاهش علائم مربوط به تالاسمی می‌گردد. بیمارانی که هموگلوبین جنین بالاتری دارند عوارض بالینی خفیف‌تری را نشان می‌دهند. دلیل عمده آن این است که تشکیل هموگلوبین جنینی می‌تواند تا حدی تأثیرات مخرب تولید ناقص بتاگلوبین را جبران نماید (۱). شناسایی ژن‌های دخیل در ایجاد تنوع در تولید هموگلوبین جنینی و مکانیسم‌های مولکولی که به وسیله آن‌ها اهداف درمانی جدید شناسایی شود می‌تواند به توسعه داروهای جدید در این زمینه کمک کند. تغییرات اپی ژنتیکی که تا به امروز به‌طور گسترده در انسان مورد مطالعه بوده، متیلاسیون سیتوزین DNA است. این شامل افزودن کووالانسی یک گروه متیل از دهنده متیل-S آدنوزیل متیونین به کربن موقعیت 1 سیتوزین در CpG توسط یک خانواده از آنزیم‌ها به نام DNA methyltransferases (DNMTs) می‌شود (۲). در حدود ۳۰ میلیون جایگاه CpG در سراسر ژنوم وجود دارد که در آن‌ها متیلاسیون صورت می‌گیرد. متیلاسیون DNA به‌طور کلی با سرکوب رونویسی همراه است علاوه بر این با فرایندهای بسیار تخصصی مانند حک‌گذاری ژنومی و غیرفعال‌سازی کروموزوم X نیز در ارتباط است (۳). چندین روش برای چگونگی عمل متیلاسیون DNA در خاموشی و مهار بیان ژن پیشنهاد شده است، دخالت مستقیم، اولین روش است که طی آن متیلاسیون به‌طور مستقیم مانع نشستن فعال‌کننده‌های رونویسی و فاکتورهای اتصال می‌شود. دومین روش پیشنهادی، وجود فاکتورهای سرکوبگر اختصاصی است. روش دیگر غیرفعال شدن ژن به دلیل تغییر وضعیت کروماتین از حالت باز و فعال به بسته و غیر فعال به‌واسطه متیلاسیون DNA است (۴). مطالعات نشان می‌دهد که متیلاسیون مناطق CpG در پروموتور نقش مهمی در سوئیچ ژن گاما به بتاگلوبین و در فعال شدن مجدد بیان گاماگلوبین توسط

شدند که CpGهای حدود ۳۰۰ نوکلئوتید در ناحیه بالادست و آگزون اول ژن گاما گلوبین را پوشش دهند. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ آمده است.

تیمار سدیم بی سولفیت DNA، واکنش PCR و تعیین توالی

سدیم بی سولفیت می تواند سیتوزین را دآمیننه یا کانورت نماید و به یوراسیل تبدیل کند، اما سیتوزین متیله را تحت تاثیر قرار نمی دهد. که به منظور انجام این روش از کیت EZ DNA Methylation-Lightning™ استفاده شد. سپس واکنش PCR جهت تکثیر نواحی انتخابی براساس برنامه جدول ۲ انجام گردید. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز و اطمینان از عدم وجود باند غیر اختصاصی نمونه ها در حجم ۲۵ μl جهت انجام تعیین توالی ارسال شد. آغازگری که برای تعیین توالی استفاده شد همان آغازگر معکوسی بود که در تکثیر قطعات مورد مطالعه به کار رفته بود.

تفسیر نمودار تعیین توالی

نمونه های تعیین توالی شده را با استفاده از نرم افزارهای Chromas و ABI Sequence Scanner مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق ابتدا از برنامه Chromas برای بررسی اجمالی توالی ها استفاده شد، برای به دست آوردن ارتفاع پیکها جهت محاسبه درصد متیلاسیون از نرم افزار ABI Sequence Scanner استفاده شد. نسبت سایز پیکها متناسب با درصد کلی بازهای سیتوزینی است که متیله هستند بنابراین سطح متیلاسیون هر جایگاه CpG درون قطعه تکثیری از طریق فرمول $(C/(C+T))*100$ اندازه گیری شد (۱۱، ۱۰). درصد متیلاسیون کل قطعه تکثیری نیز با کمک میانگین درصد متیلاسیون همه جایگاهها به دست آمد. لازم به ذکر است که فرمول فوق در زمان استفاده از پرایمر پیشرو کاربرد دارد و در صورتی که نمونه ها با پرایمر معکوس تعیین توالی شده باشند باید از فرمول $(G/(G+A))*100$ استفاده کرد (شکل ۱).

شدند. از نظر سن و جنس مورد و شاهد همسان انتخاب گردید. پس از اخذ رضایت نامه از افراد نرمال و بیماران تالاسمی، ۳۰ بیمار تالاسمی ماژور و تالاسمی مینور همراه با هموگلوبین جنینی بالا (۳/۲) الی ۹۸ درصد) و ۳۰ فرد سالم به عنوان افراد کنترل انتخاب شدند. در میان ۳۰ نفر بررسی شده ۱۵ نفر بتا تالاسمی مینور و ۱۵ نفر بتا تالاسمی ماژور بودند. نمونه گیری بر اساس داده های خون شناسی و الکتروفورز هموگلوبین از بین بیماران انجام شد. حجم نمونه با استفاده از روش مورگان تعداد ۶۰ نمونه (۳۰ نمونه افراد با هموگلوبین جنینی بالا (۳/۲) الی ۹۸ درصد) و ۳۰ نمونه شاهد) تعیین گردید. معیارهای ورود به مطالعه نمونه ها افرادی بودند که هموگلوبین جنین آن ها بالاتر ۳/۲ درصد و مبتلا یا ناقل تالاسمی بتا گلوبین بودند. معیارهای ورود به مطالعه در گروه شاهد شامل نمونه هایی بودند که افراد فاقد هر گونه موتاسیون در ژن بتا گلوبین بوده و هموگلوبین جنینی آن ها از ۱ درصد پایین تر است. این مطالعه به صورت کاملاً محرمانه و با رعایت کامل موازین، به طوری که مشخصات فردی نمونه های مورد مطالعه ناشناخته و با کد اختصاری علامت گذاری شده بودند.

استخراج DNA

نمونه خون در حدود دو میلی لیتر در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع آوری گردید و استخراج DNA به روش Salting Out انجام گرفت. از دستگاه نانودراپ برای خواندن غلظت DNA بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر استفاده گردید.

طراحی آغازگرها

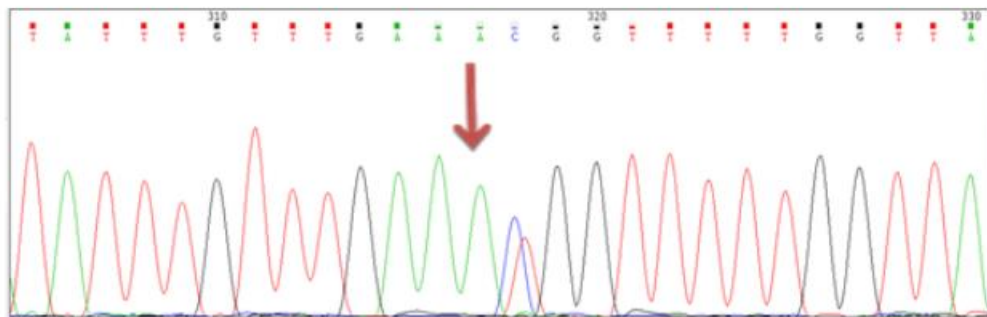
برای تکثیر نواحی پروموتری ژن های گاما گلوبین γ و گاما گلوبین $A\gamma$ در نمونه های جمعیت مورد مطالعه آغازگرهای پیشرو و معکوس با استفاده از نرم افزار Gene Runner version 4.0.9.2 beta و Methprimer و براساس توالی Acc. No: U01317.1 طراحی شد. در ابتدا بعد از به دست آوردن توالی اصلی، به کمک Methprimer توالی کانورت شد. دی نوکلئوتیدهای CpG مشخص شد. آغازگرها طوری طراحی

جدول ۱: توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر نواحی تنظیمی ژن گاماگلوبین، سایز و محل قطعه تکثیری

اندازه محصول	شماره نوکلئوتید	نقطه ذوب (°C)	توالی (5'-3')
۴۴۷ جفت باز	از ۳۴۱۴۴ الی ۳۴۱۶۷	۵۸/۶	γ MET-F : TTTTGGTATTTTTTATGGTGGGA
	از ۳۴۵۶۵ الی ۳۴۵۹۰	۵۸/۹	γ MET-R: ATTCACCTTACCCACAAACTTATA

جدول ۲: برنامه Touch down PCR واکنش PCR برای تکثیر نواحی تنظیمی ژن گاماگلوبین

تعداد سیکل ها	زمان	دما
1	5'	95°C دمای فعالیت آنزیم
10 سیکل به ازای هر سیکل	30"	95°C دما واسرشتگی
5. درجه کاهش دما	30"	54°C دمای اتصال
	1'	72°C دمای گسترش
25	30"	95°C دما واسرشتگی
	30"	49°C دمای اتصال
	1'	72°C دمای گسترش
1	5'	72°C دمای گسترش نهایی



شکل ۱: چگونگی انجام تجزیه و تحلیل داده‌های تعیین توالی از یک جایگاه CpG با استفاده از آغازگر پیشرو پیک کروماتوگرام برای تیمین (نماینده سیتوزین غیرمتیله که در طول تیمار بیسولفیت به یوراسیل تبدیل شد) و سیتوزین (نماینده ی سیتوزین متیله که در طول تیمار بیسولفیت بدون تغییر باقی مانده است)

نتایج

در این مطالعه (زن و مرد) با حداقل ۲ سال و حداکثر ۵۰ سال انتخاب شدند که از نظر سن و جنس مورد و شاهد همسان انتخاب شدند. از ۶۰ بیمار و فرد سالم انتخاب شده در مطالعه ۲۹ نفر خانم (۴۸/۳۳٪) و ۳۱ نفر آقا (۵۱/۶۷٪) بودند ($P=0/2$). میانگین سنی بیماران و افراد شاهد به ترتیب 22 ± 6 و 24 ± 4 سال بود ($P=0/5$). پس از کانونرت ژنوم افراد مورد بررسی، ناحیه پرموتری ژن بتاگلوبین تکثیر شده و بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز قطعات ۴۴۷ جفت بازی مشاهده شدند. سپس نمونه‌ها برای بررسی شش جایگاه CpG برای هر نمونه شامل ۱۶۲، -۵۳، -۵۰، +۶، +۱۷، +۵۰ تعیین توالی

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی آماری نتایج به دست آمده از آزمون آماری T-test با درجه اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید و در آن درصدهای متیلاسیون هر جایگاه در گروه بیمار و نرمال با یکدیگر مقایسه گردید. بر این اساس مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ به معنای اختلاف معنی‌دار بین دو گروه انتخاب شد. داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS version 16 تجزیه و تحلیل شد.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق با گونت و کد شماره 1033 و کد اخلاقی IR.PIL.REC.1397.56 به تایید انستیتو پاستور ایران رسیده است.

ترتیب دارای درصد هموگلوبین جنینی $98.95/2$ و $98.3/3$ بودند، حالت نیمه متیله دیده شد که تفاوت واضحی با نمونه‌های نرمال داشت (شکل ۲) و یک نمونه نیز دارای وضعیت متیلاسیون نسبی با درصد متیلاسیون 75 بود. در CpG جایگاه $53-$ نیز وضعیت متیلاسیون نسبی با حدود متیلاسیون بین 62 تا 78 درصد در سه نمونه دیده شد که این نمونه‌ها نیز دارای درصد هموگلوبین جنینی $18/8$ ، 68 و $98.3/3$ بودند. جایگاه $+6$ نیز در شش نمونه وضعیت متیلاسیون نسبی با رنجی بین 61 الی 78 درصد نشان داد. جایگاه‌های $+17$ و $+50$ نیز هر کدام در یک نمونه وضعیت متیلاسیون نسبی نشان دادند. نتایج درصد متیلاسیون نمونه‌های نرمال در محدوده میانگین متیلاسیون بین $89/5$ الی 97 درصد بود و می‌توان گفت تمام نمونه‌ها تمام متیله بودند. اگرچه در یک نمونه نرمال CpG موقعیت $+17$ دارای متیلاسیون 72% بود. مقدار p-value در جایگاه‌های $162-$ ، $53-$ و $+6$ کمتر از 5 درصد بود و می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که اختلاف متیلاسیون در این جایگاه‌ها بین دو گروه نرمال و بیمار معنی‌دار می‌باشد. این در حالی است که سه جایگاه دیگر شامل $50-$ ، $+17$ و $+50$ با توجه به مقدار p-value بیشتر از 5 درصد فاقد اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مورد بررسی است. میانگین متیلاسیون کل در دو گروه بیمار و نرمال نیز دارای اختلاف قابل معنی‌داری بود ($P < 0.05$).

شدند. در صورتی که در نتیجه تعیین توالی در موقعیت‌های ذکر شده فقط یک پیک سی‌توزین در جایگاه CG وجود داشته به این معناست که جایگاه CpG اولیه تماماً متیله (100% متیله) بوده است. در صورتی که در این موقعیت‌ها فقط پیک T باشد، به این معناست که جایگاه تماماً غیرمتیله (0% متیله) بوده و در نهایت در صورتی که هر دو پیک C/T بالا آمده باشد وضعیت متیلاسیون نسبی گزارش می‌شود. برای توضیح بیشتر متیلاسیون نسبی می‌توان گفت با حضور دو نسخه از هر کروموزوم در یک سلول، می‌تواند نسبت‌های 0% ، 50% و یا 100% متیله در یک CpG وجود داشته باشد. هنگام استخراج DNA، یک ترکیبی از DNA هزاران سلول تخلیص می‌شود بسته به اینکه چه مقدار از سلول‌ها غیرمتیله، نیمه متیله یا تمام متیله باشند می‌توانید یک سطح از متیلاسیون از 0 تا 100% را به دست آورد از آنجا که تعیین توالی نمونه‌های تیمار شده با بی‌سولفیت دارای یک میزان خطا است در این تحقیق 80 تا 100% را به‌عنوان تمام متیله 20 تا 80% به عنوان متیلاسیون نسبی انتخاب گردید و 40 تا 60% حالت نیمه متیله در نظر گرفته شد (12). نتایج به‌دست آمده از بررسی توالی‌های و تعیین درصد متیلاسیون افراد بیمار در جدول ۳ آمده است که نتایج این جدول را می‌توان به‌صورت زیر خلاصه کرد: CpG ناحیه $162-$ در چهار نمونه 27 تا 30 تفاوت قابل توجهی در درصد متیلاسیون نشان داد به‌طوری‌که در سه نمونه که به

جدول ۳: درصد متیلاسیون، هموگلوبین جنینی و نوع موتاسیون ژن بتا گلوبین در نمونه‌های بیماران و ناقلین تالاسمی بتا

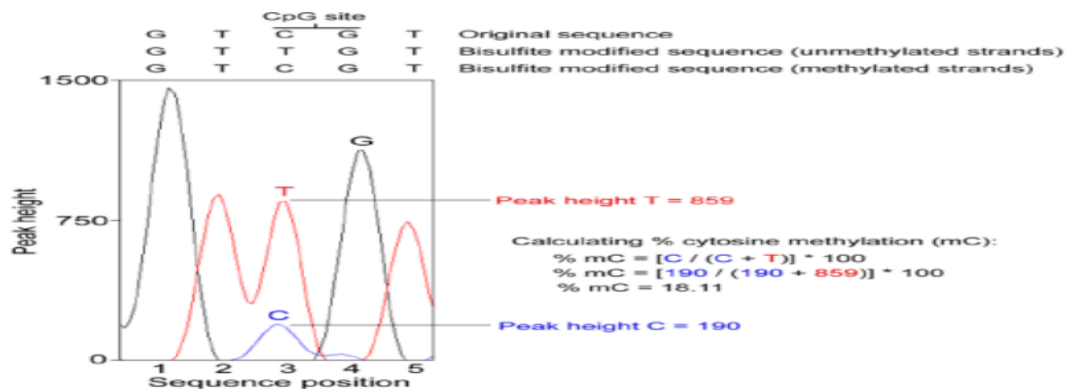
هموگلوبین جنینی (%)	جهش ژن بتا گلوبین	متیلاسیون (%)					
		$+50$	$+17$	$+6$	-50	-53	-162
۱	۳/۶	۹۵	۹۹	۹۷	۹۸	۹۵	۹۷
۲	۳/۶	۹۹	۹۵	۹۷	۹۱	۹۴	۹۵
۳	۴/۵	۹۹	۹۵	۹۴	۹۷	۹۹	۹۶/۷
۴	۴/۵	۹۷	۹۳	۹۵	۹۴	۹۱	۹۳/۸
۵	۱۰/۸	۹۳	۹۸	۹۰	۹۶	۹۷	۹۴/۷
۶	۲۱/۵	۹۵	۹۸	۹۳	۹۱	۹۴	۹۳/۵
۷	۳۱/۶	۹۹	۹۷	۹۵	۹۸	۹۷	۹۶/۵
۸	۴۶/۶	۹۵	۹۱	۹۱	۹۴	۹۰	۹۱/۵
۹	۴۸	۹۹	۹۸	۹۳	۹۵	۹۵	۹۴/۲
۱۰	۶۶/۹	۹۷	۹۷	۹۵	۹۶	۹۲	۹۳/۵

۹۲	۸۶	۹۱	۹۷	۹۰	۹۳	۹۵	IVSII-I(G>A)/Normal	۵/۷	۱۱
۹۱/۳	۸۷	۹۳	۹۴	۹۱	۹۱	۹۲	CD36-37(-T)/Normal	۱۸	۱۲
۹۳/۲	۸۸	۹۵	۹۵	۹۵	۹۳	۹۳	Hb S/CD8(-AA)	۲۹/۸	۱۳
۹۲/۵	۸۵	۹۵	۹۵	۹۰	۹۱	۹۹	IVSII-I(G>A)/Normal	۱۰/۶	۱۴
۹۱	۸۴	۹۴	۹۶	۹۰	۹۱	-	IVSII-I(G>A)/IVSII-I(G>A)	۶۸/۲	۱۵
۹۲/۵	۸۷	۹۵	۹۶	۹۰	۹۳	۹۴	CD39(C>T)/CD39(C>T)	۹۷/۶	۱۶
۹۳/۳	۸۶	۹۶	۹۷	۹۳	۹۵	۹۳	CD5(-CT)/IVSI-I(G>A)	۹۷/۶	۱۷
۹۱/۵	۸۴	۹۴	۹۵	۹۰	۹۱	۹۵	IVSII-I(G>A)/-88(C>A)	۹۸/۵	۱۸
۹۱/۷	۸۶	۹۵	۹۴	۹۰	۸۵	۱۰۰	IVSI-5(G>C)/-101(C>T)	۱۶	۱۹
۹۱/۷	۸۸	۹۳	۹۵	۸۸	۹۳	۹۳	IVSII-I(G>A)/IVSII-I(G>A)	۹۵/۶	۲۰
۸۹/۵	۸۳	۹۳	۹۴	۹۲	۸۸	۸۷	Fr8-9(+G)/Fr8-9(+G)	۶۳/۹	۲۱
۸۸/۸	۸۶	۹۰	۹۸	۷۷	۹۱	۹۱	IVSII-I(G>A)/IVSII-I(G>A)	۹۳/۵	۲۲
۸۷/۷	۸۵	۸۶	۹۹	۷۴	۹۵	۸۷	-88(C>A)/Normal	۴/۴	۲۳
۸۰/۸	۹۰	۸۰	۹۴	۶۱	۸۰	۸۰	CD8(-AA)/Normal	۵/۷	۲۴
۸۳/۵	۸۱	۷۵	۹۵	۸۰	۸۰	۹۰	-88(C>A)/IVSII-I(G>A)	۶۷	۲۵
۸۲/۳	۸۳	۸۱	۹۵	۷۰	۸۳	۸۲	IVSII-848(C>A)/IVSII-848(C>A)	۶۸/۷	۲۶
۷۹/۲	۷۵	۶۲	۸۵	-	-	۹۵	Sicilian $\delta\beta$ / Normal	۱۸/۱	۲۷
۷۵/۸	۴۰	۸۳	۹۱	۷۸	۸۴	۷۹	CD36-37(-T)/IVSII-I(G>A)	۹۵/۲	۲۸
۷۶/۸	۴۵	۸۲	۸۷	۸۱	۸۰	۸۶	IVSII-I(G>A)/IVSI-5(G>C)	۹۸	۲۹
۷۵/۷	۵۶	۷۸	۸۵	۷۶	۷۸	۸۱	25bp del/25bp del	۹۸/۳	۳۰

Fully methylated (81-100%)

Hemi methylated (40-60%)

Partial methylated (20-80%)



شکل ۲: وضعیت نیمه متیله در جایگاه CpG ۱۶۲-ژن گاما گلوبین

نمونه بیماران و ناقلین بتا در تمام جایگاه‌های CpG مورد بررسی تماماً متیله (۸۱ الی ۱۰۰٪) بوده‌اند. ۹ نمونه باقی مانده در حداقل یک سایت CpG وضعیت متیلاسیون نسبی یا نیمه متیله داشته‌اند که حدود هموگلوبین جنینی این گروه از ۴/۴ تا ۹۸/۳ درصد با میانگینی در حدود ۶۱ درصد متغیر بوده است. این در حالی است که تمام ۳۰ نمونه نرمال بررسی شده تماماً

بحث

مطالعه حاضر بر روی افراد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور یا مینور با هموگلوبین جنینی بالای ۳ درصد انجام گرفت و الگوی متیلاسیون پروموتور ژن‌های گاماگلوبین این افراد با روش Bisulfite Sequencing مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد ۲۱ نمونه از ۳۰

می‌شود، احتمال داده‌اند که این اتصال بخشی از مکانیسم طبیعی سرکوب در سلول‌های اریترئوئیدی بزرگسالان است (۱۷-۱۴). ارتباط ۵۳- در بیان هموگلوبین جنینی سال‌هاست که مشخص شده است بخشی از SSE است که بین نوکلئوتید 34 تا 53- از پروموتور گاماگلوبین واقع شده است این عنصر در سوئیچ بیان ژن گاماگلوبین به بتاگلوبین در شرایط آزمایشگاهی دخالت می‌کند. SSE توسط SP1 و یا پروتئین SSP اشغال می‌گردد. کمپلکس SSP در فعال‌سازی گاماگلوبین نقش دارد در مقابل، اتصال SP1 به SSE به‌همراه متیلاسیون جایگاه ۵۳- باعث سرکوب گاماگلوبین می‌شود (۱۶، ۱۷). در خصوص جایگاه ۱۶۲- می‌توان گفت، با جستجوی حدود توالی این جایگاه در پایگاه‌های داده مشخص شد که این جایگاه پتانسیل اتصال فاکتور رونویسی MYB را دارا است. این پروتئین از جمله فاکتورهای رونویسی تاثیرگذار بر هماتوپویتیک است. در سلولهای اریترئوئید اولیه که بیان بالای گاماگلوبین دارند سطح MYB پایین است و ارتباط معکوسی بین سطح این دو پروتئین در سلول وجود دارد، با این وجود از مکانیسم عمل این پروتئین و رابطه احتمالی آن با متیلاسیون پروموتور ژن گاماگلوبین اطلاعاتی وجود ندارد (۱۸). هر چند پلی‌مورفیسم‌هایی در بالادست این ژن و در حد فاصل دو ژن MYB و HBS1L وجود دارد که در ارتباط با بقای هموگلوبین جنینی در بزرگسالی است و احتمال می‌دهند این ارتباط به‌واسطه ژن MYB وجود داشته باشد (۲۰، ۱۹). بررسی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن گاماگلوبین برای درک بهتر مکانیسم سویچینگ گلوبین سال‌هاست که مورد بررسی است اما مطالعه در مورد وضعیت این جایگاه در افراد بتا تالاسمی با هموگلوبین جنینی بالا در سطح جهان معدود بوده است و بیشتر تمرکز روی رده‌های سلولی بوده است. در تنها مطالعه مشابه انجام شده راجع به الگوی متیلاسیون پروموتور این ژن روی بیماران تالاسمی که در سال ۲۰۱۲ توسط Liu انجام شد، وضعیت متیلاسیون در چهار جایگاه CpG ۲۵۶-، ۱۶۲-، ۵۳- و ۵۰- در ناحیه بالادست ژن گاماگلوبین در افراد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور با هموگلوبین جنینی بالا در یکی از استان‌های چین مورد بررسی قرار گرفتند. بر

متیله بوده‌اند. از میان ۹ نمونه ذکر شده در بالا که حداقل دارای یک جایگاه با وضعیت متیلاسیون متفاوت از نرمال بوده‌اند، 4 نمونه به دلیل تعدد جایگاه‌های با وضعیت متیلاسیون نسبی دارای میانگین متیلاسیون زیر ۸۰ درصد (۷۵/۷ الی ۷۹/۲ درصد) نیز بوده‌اند، 3 نمونه این گروه دارای وضعیت نیمه متیله (۴۰ الی ۵۶ درصد) در CpG موقعیت ۱۶۲- بوده‌اند. بر طبق آزمون آماری t-test محاسبه شده برای درصد متیلاسیون هر جایگاه در دو گروه نرمال و بیمار مشخص گردید که اختلاف متیلاسیون در 3 جایگاه ۱۶۲-، ۵۳- و ۶+ میان این دو گروه معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). به بیان دیگر، احتمالاً اختلاف در میزان هموگلوبین جنینی در افراد بیمار و نرمال می‌تواند به دلیل تفاوت در وضعیت متیلاسیون این سه جایگاه باشد. با این حال به این دلیل ۲۱ نمونه از ۳۰ نمونه مورد بررسی تفاوت قابل توجهی در سطح متیلاسیون نسبت به گروه نرمال نداشته‌اند شاید به‌توان اینگونه نتیجه گرفت که دی متیلاسیون پروموتور ژن گاماگلوبین به خصوص سه جایگاه ۱۶۲-، ۵۳- و ۶+ عامل ضروری در بیان مجدد ژن گاما گلوبین در بزرگسالی نباشد ولی احتمالاً عامل کمی مهمی در این بیان مجدد است. جایگاه ۶+ در محدوده اتصال آنزیم RNA Polymerase است. این امر می‌تواند دلیل گویایی بر معناداری اختلاف متیلاسیون این جایگاه در دو گروه مورد بررسی باشد. شاید متیلاسیون CpG جایگاه ۶+ باعث کاهش میل آنزیم RNA Polymerase به اتصال در این محل گردد و از این طریق باعث کاهش بیان ژن گاماگلوبین و به‌دنبال آن کاهش مقدار گاماگلوبین شود (۱۳). جایگاه ۵۳- بخشی از SSE است که محل اتصال پروتئین‌های SSP و یا Sp1 در دوره‌های مختلف رشد است. جایگاه SSE یک توالی حفاظت شده در گونه‌هایی است که در مرحله جنینی بیان ژن گاماگلوبین را دارند و نقش اساسی در تنظیم بیان ژن گاماگلوبین در طول رشد دارد. زمانی که جایگاه CpG دی متیله باشد اتصال پروتئین خاص اریترئوئیدی SSP به جایگاه SSE صورت می‌گیرد و باعث فراخوانی Locus control region (LCR) به سمت پروموتور ژن گاماگلوبین می‌شود، از طرف دیگر متیلاسیون باعث القای اتصال ترجیحی پروتئین SP1 به SSE

به‌خصوص در سه جایگاه ۱۶۲-، ۵۳- و ۶+ احتمالاً نقش کمکی در بیان این ژن در دوران بزرگسالی دارد. همچنین بررسی فاکتورهای دیگر مرتبط با افزایش هموگلوبین جنینی از جمله عوامل تنظیم‌کننده سیس شامل پرموترها Promoters، تقویت‌کننده‌ها Enhancers، خاموش‌کننده‌ها Silencers، محدودکننده‌ها Insulators، نواحی تنظیمی تحت عنوان Locus-control region (LCR) و عوامل ترانس توصیه می‌گردد.

سپاس‌گزاری

از کلیه افراد شرکت‌کننده در این تحقیق و همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران تشکر و تقدیر به‌عمل می‌آید. این طرح توسط انستیتو پاستور ایران با گرنت ۱۰۳۳ حمایت مالی شده است.
حامی مالی: انستیتو پاستور ایران
تعارض منافع: وجود ندارد.

طبق این تحقیق تمام چهار جایگاه مورد بررسی چه در افراد نرمال و چه بیمار متیله بود ولی با این حال دو جایگاه ۱۶۲- و ۵۳- در افراد بیمار نسبت به نرمال هیپومتیله بود و در جایگاه‌های دیگر یعنی ۲۵۶- و ۵۰- تفاوت معنی‌داری از نظر درجه متیلاسیون بین دو گروه مورد بررسی وجود نداشت. به طور کل می‌توان گفت نتایج این تحقیق مشابه نتایج به‌دست آمده در این تحقیق است (۲۱). این مطالعه برای اولین بار روی نمونه‌های ایرانی نقش متیلاسیون DNA را مورد بررسی قرار می‌دهد.

نتیجه‌گیری

اگرچه اختلاف متیلاسیون در ۳ جایگاه ۱۶۲-، ۵۳- و ۶+ میان دو گروه بیمار و نرمال معنی‌دار می‌باشد اما به این دلیل که ۲۱ نمونه از ۳۰ نمونه مورد بررسی تفاوت قابل توجهی در سطح متیلاسیون نسبت به گروه نرمال نداشته‌اند این‌گونه می‌توان نتیجه گرفت که دی‌متیلاسیون پرموترژن گاماگلوبین

References:

- 1- Hamid M, Mahjoubi F, Akbari MT, Arab A, Zeinali S, Karimipoor M. *Molecular Analysis of Gamma-Globin Promoters, HS-111 and 3'HS1, In Beta-Thalassemia Intermedia Patients Associated with High Levels of Hb F*. Hemoglobin 2009; 33(6): 428-38.
- 2- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, et al. *DNMT1 and DNMT3b Cooperate to Silence Genes in Human Cancer Cells*. Nature 2002; 416(6880): 552-6.
- 3- Jiang YH, Bressler J, Beaudet AL. *Epigenetics and Human Disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet 2004; 5: 479-510.
- 4- Singal R, Ginder GD. *DNA Methylation*. Blood 1999; 93(12): 4059-70.
- 5- Kiefer CM, Hou C, Little JA, Dean A. *Epigenetics of Beta-Globin Gene Regulation*. Mutat Res 2008; 647(1-2): 68-76.
- 6- Hardison R. *Hemoglobins from Bacteria to Man: Evolution of Different Patterns of Gene Expression*. J Exp Biol 1998; 201: 1099-117.
- 7- Lavelle D, Vaitkus K, Hankewych M, Singh M, DeSimone J. *Developmental Changes in DNA Methylation and Covalent Histone Modifications of Chromatin Associated with the Epsilon- Gamma- And Beta-Globin Gene Promoters in Papio Anubis*. Blood Cells Mol Dis 2006; 36(2): 269-78.
- 8- Sengupta PK, Lavelle D, DeSimone J. *Increased Binding of Sp1 to the Gamma-Globin Gene Promoter Upon Site-Specific Cytosine Methylation*. Am J Hematol 1994; 46(3): 169-72.

- 9- Musallam KM, Taher AT, Cappellini MD, Sankaran VG. *Clinical Experience with Fetal Hemoglobin Induction Therapy in Patients with Beta-Thalassemia*. Blood 2013; 121(12): 2199-212.
- 10- Jiang M, Zhang Y, Fei J, Chang X, Fan W, Qian X, et al. *Rapid Quantification of DNA Methylation by Measuring Relative Peak Heights in Direct Bisulfite-PCR Sequencing Traces*. Lab Invest 2010; 90(2): 282-90.
- 11- Parrish RR, Day JJ, Lubin FD. *Direct Bisulfite Sequencing for Examination of DNA Methylation with Gene and Nucleotide Resolution from Brain Tissues*. Curr Protoc Neurosci 2012; Chapter 7: Unit 7 24.
- 12- Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, Krueger F, Saadeh H, Peat J, et al. *Single-Cell Genome-Wide Bisulfite Sequencing for Assessing Epigenetic Heterogeneity*. Nat Methods 2014; 11(8): 817-20.
- 13- Makala L, Torres C, EL EC, Neunert C, Betty S. Pace. *Fetal Hemoglobin Induction to Treat β -Hemoglobinopathies from Bench to Bedside*. J Hematol Transfus 2014; 2(2): 1018.
- 14- Jane SM, Ney PA, Vanin EF, Gumucio DL, Nienhuis AW. *Identification of a Stage Selector Element in the Human Gamma-Globin Gene Promoter that Fosters Preferential Interaction with the 5' HS2 Enhancer when in Competition with the Beta-Promoter*. EMBO J 1992; 11(8): 2961-9.
- 15- Gumucio D, Heilstedt-Williamson H, Gray T, Tarle S, Shelton D, Tagle D, et al. *Phylogenetic Footprinting Reveals a Nuclear Protein which Binds to Silencer Sequences in the Human Gamma and Epsilon Globin Genes*. Mol Cell Biol 1992; 12(11): 4919-29.
- 16- Sengupta PK, Lavelle D, Desimone J. *Increased Binding of SP1 to the Γ -Globin Gene Promoter Upon Site-Specific Cytosine Methylation*. Am J Hematol 1994; 46(3): 169-72.
- 17- Jane SM, Gumucio D, Ney P, Cunningham J, Nienhuis A. *Methylation-Enhanced Binding of Sp1 to the Stage Selector Element of the Human Gamma-Globin Gene Promoter May Regulate Development Specificity of Expression*. Mol Cell Biol 1993; 13(6): 3272-81.
- 18- Jiang J, Best S, Menzel S, Silver N, Lai MI, Surdulescu GL, et al. *CMYB is Involved in the Regulation of Fetal Hemoglobin Production in Adults*. Blood 2006; 108(3): 1077-83.
- 19- Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. *Intergenic Variants of HBS1L-MYB are Responsible for a Major Quantitative Trait Locus on Chromosome 6q23 Influencing Fetal Hemoglobin Levels in Adults*. Proc Natl Acad Sci 2007; 104(27): 11346-51.
- 20- George OL, Ness SA. *Situational Awareness: Regulation of the Myb Transcription Factor in Differentiation, The Cell Cycle and Oncogenesis*. Cancers 2014; 6(4): 2049-71.
- 21- Liu Y, Cheng P, Liu Z, Liu R, Lai Y. *Methylation Status of Γ -Globin Gene Promoter in β -Thalassemia Major*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2012; 20(3): 642-5.

Analysis of Methylation Status in Promoter Region of Γ - Globin Gene in Carrier and Affected B-Thalassemia Patients with High Level of Fetal Hemoglobin in Comparison with Normal Individuals

Mohammad Hamid^{*1}, Zohreh Shojaei²

Original Article

Introduction: Among the factors that may be associated with the re-expression gamma-globin in adults is the methylation pattern of the promoter region. The study aimed to determine the association between promoter methylation pattern of the gamma-globin gene in the carriers and affected beta-thalassemia individuals and its expression levels.

Methods: This study has been done as a case control- study. After taking blood samples from 30 patients and beta-thalassemia carriers and affected patients with fetal hemoglobin elevated as well as 30 normal individuals, genomic DNA was extracted. Six CpG sites of the promoter region and exon1 of the gamma-globin gene were analyzed by the bisulfite sequencing analysis method. Statistical analysis was carried out using a t-test. The values of $p \leq 0.05$ were considered significant for comparing two studied groups. Data were analyzed using SPSS version 16 software.

Results: In this study, hypomethylation of the gamma-globin promoter region in the patients and carriers compared to showed a significant differences in three CpG sites +6, -53 and -162, respectively ($p < 0.05$). In addition, in three cases, CpG site in position -162 was semi methylated; this situation was markedly different from other samples of the patients and normal cases.

Conclusion: Hypomethylation of the gamma-globin gene promoter probably has an auxiliary role in fetal hemoglobin increase.

Keywords: Beta- thalassemia, Fetal hemoglobin, Methylation.

Citation: Hamid M, Shojaei Z. Analysis of Methylation Status in Promoter Region of Γ - Globin Gene in Carrier and Affected B-Thalassemia Patients with High Level of Fetal Hemoglobin in Comparison with Normal Individuals. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 29(2): 3524-33.

¹Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

²Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09122858058, email: hamid143@yahoo.com