

بررسی متیلاسیون راه‌انداز $p27^{kip1}$ در بیماران مبتلا به کولیت اولسرو

سهیل مشایخی^۱، سهیلا طالش ساسانی*^۲، کیوان امینیان^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۰۱/۲۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۴/۰۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: $p27^{kip1}$ (p27) یک پروتئین مهارکننده CDK(CDKI) و تنظیم‌کننده منفی کمپلکس سیکلین CDK4-D در فاز G1 است. تغییرات بیان $p27^{kip1}$ موجب اختلال در رشد سلول و ایجاد بیماری‌های مختلف می‌شود. الگوی متیلاسیون نادرست این ژن در تعداد زیادی از بیماری‌ها گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی وضعیت متیلاسیون ناحیه راه‌انداز ژن $p27^{kip1}$ در بیماران مبتلا به کولیت اولسرو (UC) و افراد سالم می‌باشد.

مواد و روش کار: PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) در ۲۳۰ فرد سالم (کنترل) و ۱۲۵ نمونه بیمار مبتلا به UC انجام شد. بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار MedCalc صورت گرفت.

یافته‌ها: راه‌انداز $p27^{kip1}$ در ۱۶/۸ درصد (۲۱ از ۱۲۵) از بیماران UC و در ۴/۸ درصد (۱۱ از ۲۳۰) از افراد کنترل متیله بود. از لحاظ آماری اختلاف متیلاسیون $p27^{kip1}$ بین گروه‌های UC و سالم، معنی‌دار بود ($P < 0/05$). افراد دارای متیلاسیون راه‌انداز $p27^{kip1}$ با افزایش خطر بیماری UC همراه می‌باشند ($OR = 4/02$; $95\% CI = 1/86-8/64$).

بحث و نتیجه‌گیری: احتمالاً متیلاسیون $p27^{kip1}$ در ایجاد بیماری UC دخیل می‌باشد. اگرچه مطالعات تکمیلی با تعداد جمعیت بیشتر جهت تأیید این نتیجه موردنیاز است.

کلیدواژه‌ها: خاموشی ژن، متیلاسیون، $p27^{kip1}$ ، UC

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره پنجم، ص ۳۸۰-۳۷۲، مرداد ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: رشت خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه - گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۰۱۳-۳۳۳۳۳۶۴۷

Email: sasani@guilan.ac.ir

مقدمه

استروئیدها، عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و آنتاگونیست‌های فاکتور نکروز توموری-آلفا ($TNF\alpha$) از داروهای مورد استفاده در درمان این بیماری می‌باشند (۳). علیرغم نقش مهم عوامل ژنتیکی و زمینه خانوادگی، اطلاعات اندکی در خصوص پاتوژنز بیماری وجود دارد. اگرچه مطالعات، بیش از ۲۰۰ جایگاه ژنی مرتبط با این بیماری را نشان داده‌اند اما میزان همراهی در دوقلوهای همسان ۱۶ درصد و در دوقلوهای غیرهمسان ۲ درصد می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد واکنش متقابل عوامل محیطی و ژنتیکی در ایجاد بیماری مذکور مهم باشند (۴). برخی از سیتوکین‌های پیش‌التهابی از قبیل IL-4، IL-5، IL-6، IL-10 و $TNF-\alpha$ در پاسخ سیستم ایمنی به این بیماری نقش مهمی ایفا می‌کنند. یافته‌های جدید نشان‌دهنده نقش فاکتورهای اپی ژنتیک در پاتوژنز این بیماری می‌باشند. تغییر در میزان

کولیت اولسرو (UC; MIM 191390)، بیماری مزمن روده بزرگ است که با دوره‌های عود و فروکش کردن علائم، همراه می‌باشد. از لحاظ آسیب‌شناسی، التهاب مزمن در لایه‌های مخاطی و زیر مخاطی روده بزرگ رخ می‌دهد. از علائم بیماری می‌توان به اسهال خونی یا بدون موکوس، درد شکمی، تب و کاهش وزن اشاره نمود (۱). بیشتر بیماران به فرم متوسط تا شدید بیماری مبتلا می‌باشند. بیماری کرون و کولیت اولسرو در مجموعه بیماری التهابی روده (IBD) قرار دارند. خطر سرطان روده بزرگ در این بیماران ۲/۴ برابر بیشتر از سایر افراد است. از فاکتورهای خطر در سرطان روده بزرگ ناشی از UC می‌توان به جنس مذکر، تشخیص بیماری در جوانی و وجود کولیت پیشرفته اشاره نمود (۲). آمینوسالیسیلات‌ها،

^۱ دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

^۲ استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار داخلی گوارش، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، بیمارستان رازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

میزان بیان $P27^{kip1}$ در روند شناخت و درمان برخی از بیماری‌ها می‌تواند کمک‌کننده باشد.

با توجه به نقش کلیدی $P27^{kip1}$ در تنظیم چرخه سلولی و اهمیت تغییرات اپی ژنتیک در میزان بیان ژن‌ها، هدف از این تحقیق، بررسی متیلاسیون ناحیه راه‌انداز ژن $P27^{kip1}$ در گروهی از بیماران مبتلا به UC و مقایسه آن‌ها با گروه کنترل می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۲۵ بیمار مبتلا به UC و ۲۳۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل وارد شدند. بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان قائم (رشت)، از تاریخ ۹۵/۲/۱ تا ۹۶/۹/۳۰، بر اساس یافته‌های بالینی، کولونوسکوپی و آسیب‌شناسی انتخاب شدند. گروه-بندی بیماری از نظر شدت بر اساس تقسیم‌بندی مونترال انجام شد. بدین ترتیب بیماران در سه گروه E1: پروکتیت، E2: درگیری کولون چپ و E3: بیماری پیشرفته، تقسیم‌بندی شدند. افراد سالم در محدوده سنی یکسان با بیماران، غیر خویشاوند، فاقد بیماری‌های التهابی، بیماری‌های مزمن، خودایمنی و سرطان بودند. از تمامی شرکت‌کنندگان در این پژوهش رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. با توجه به استفاده از نمونه‌های انسانی، این پژوهش مطابق با بیابنه هلسینکی انجام شد.

استخراج DNA ژنومی از بافت کولون سالم و بیماران مبتلا به UC، با استفاده از High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Systems, Germany) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، صورت گرفت. بررسی غلظت و خلوص DNA ژنومی توسط دستگاه نانودرآپ (Thermo Scientific, USA) انجام شد. محدوده نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر DNA استفاده شده در این مطالعه، ۱/۷۵ تا ۱/۸۵ بود. DNA استخراجی تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت انجام PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP=methylation specific PCR)، DNA (۱ میکروگرم) با استفاده از کیت Epi Tect Bisulfite Kit (Qiagen, Germany) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده با بی‌سولفیت تیمار شد تا سیتوزین‌های غیر متیله طی واکنش دامیناسیون به یوراسیل تبدیل شوند. کیفیت و کمیت DNA پس از تیمار بی‌سولفیت توسط دستگاه نانودرآپ ارزیابی شد. با کمک نرم‌افزار تحت وب Methprimer به بررسی جزایر CG موجود در ناحیه راه‌انداز ژن $P27^{kip1}$ پرداخته شد (شکل A1). در این مطالعه وضعیت متیلاسیون پنج‌مین جزیره CpG ژن موردنظر بررسی شد. توالی این جزیره و نواحی CG موجود در آن در شکل B1 آورده شده است. با جستجو

متیلاسیون ژن‌های مرتبط با UC، از طریق تغییر در سطح بیان این ژن‌ها، می‌تواند در ایجاد و گسترش بیماری دخیل باشد (۵). در دهه گذشته، متیلاسیون DNA مطالعات زیادی را در مقوله تغییرات اپی ژنتیک به خود اختصاص داده است.

متیلاسیون DNA از طریق اتصال کوالانت یک گروه متیل به کربن ۵' حلقه سیتوزین در محل دی‌نوکلئوتیدهای CpG رخ می‌دهد (۶). متیلاسیون سیتوزین در سایر توالی‌ها در انسان و سایر پستانداران نادر بوده و فقط در سلول‌های بنیادی رویانی دیده می‌شود. دی‌نوکلئوتیدهای CpG اغلب در مناطق خاصی از ژنوم تحت عنوان جزایر CpG واقع در ناحیه راه‌انداز و یا در نخستین آگزون بیشتر ژن‌ها، قرار دارند. در ژنوم، بیشتر CpG ها متیله هستند درحالی‌که جزایر CpG اساساً غیرمتیله باقی می‌مانند (۷). در اکثر موارد، متیلاسیون DNA، با خاموشی ژن همراه می‌باشد. DNA متیل ترانسفرازها (DNMTs) اضافه شدن گروه متیل به سیتوزین را کاتالیز می‌کنند (۸). DNMT1 در حفظ الگوهای متیلاسیون DNA مشارکت دارد، درحالی‌که DNMT3A و DNMT3B سوبستراهای غیرمتیله را متیله کرده و در ایجاد متیلاسیون از نو مشارکت دارند. متیلاسیون DNA در تنظیم رشد و نمو و بیان اختصاصی بافت دارای اهمیت خاصی است.

کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) و پروتئین‌های مهارکننده آن‌ها از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی می‌باشند. پروتئین $p27^{kip1}$ (p27) تنظیم‌کننده منفی کمپلکس D-CDK4 در مرحله G1 تقسیم سلولی است (۹). جایگاه کروموزومی ژن $CDKN1B$ ، کد کننده پروتئین $p27^{kip1}$ ، 12q13 می‌باشد. حذف هموزیگوتی این ژن با تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی خون همراه است (۱۰). این پروتئین در اعمالی نظیر تنظیم چرخه سلولی، دینامیک اسکلت سلولی، مهاجرت سلولی، تکثیر سلول‌های بنیادی و تمایز سلولی نقش دارد (۱۱). تغییر بیان سایکلین‌ها و بازدارنده‌های cdk در تومورهای سر و گردن و در سرطان پستان، گزارش شده است (۱۲،۱۳).

تغییرات متیلاسیون ناحیه‌ی پروموتور در برخی از ژن‌ها به علت القای کروماتین غیرفعال، می‌تواند به خاموشی رونویسی منجر شود که در شماری از سرطان‌های انسان دیده شده است (۱۴). افزایش متیلاسیون پروموتور به‌عنوان یک مکانیسم رایج غیرفعال سازی $P27^{kip1}$ گزارش شده است که می‌تواند مانع رونویسی این ژن شود. کاهش یا عدم تولید mRNA و پروتئین $P27^{kip1}$ در سرطان کبد گزارش شده است (۱۵). کیان و همکاران، خاموشی ژن $P27^{kip1}$ ناشی از متیلاسیون ناحیه راه‌انداز این ژن، را در سلول‌های توموری غده هیپوفیز نشان دادند (۱۶). بر اساس مطالعات انجام‌شده، پیشنهاد می‌شود که ارزیابی وضعیت متیلاسیون ناحیه راه‌انداز و

۲درصد الکتروفورز شد. برای تأیید نتایج، ۲۰درصد از نمونه‌ها مورد بررسی مجدد قرار گرفتند.

جهت محاسبه قدرت آماری مطالعه، از نرم‌افزار OpenEpi (www.OpenEpi.com) استفاده شد. قدرت مطالعه ما ۸۰درصد برآورد گردید. جهت بیان سن افراد از میانگین \pm انحراف معیار استفاده و مقایسه میانگین سن دو گروه مورد مطالعه توسط Student's *t*-test انجام شد. به‌منظور بررسی معنی‌دار بودن تفاوت در وضعیت متیلاسیون ژن $p27^{kip1}$ در بیماران و افراد کنترل از آزمون کای‌دو استفاده شد. ارتباط بین متیلاسیون ناحیه راهانداز ژن $p27^{kip1}$ و خطر بیماری UC با استفاده از OR و Confidence interval (CI) ۹۵٪ ارزیابی گردید. $P < 0.05$ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف نتایج بین دو گروه مورد بررسی می‌باشد. جهت واکاوی آماری از نرم‌افزار MedCalc نسخه ۹.۳.۲۰ (MedCalc software, Ostend, Belgium) استفاده شد.

یافته‌ها

در این پژوهش، ۱۲۵ بیمار مبتلا به UC و ۲۳۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. خصوصیات دموگرافیک و بالینی بیماران در جدول ۱ آورده شده است. میانگین سنی بیماران 42 ± 18 و در افراد کنترل 40 ± 13 بود و اختلاف معنی‌داری در خصوص سن و همچنین جنس در دو گروه مورد بررسی وجود نداشت ($P > 0.05$). در ۷۷ بیمار (۶۱٪ درصد)، مدت‌زمان بیماری ۱ تا ۸ سال در نظر گرفته شد. از نظر شدت بیماری، فراوان‌ترین فرم بیماری، پروکتیت یا E1 بود.

در پایگاه NCBI، توالی ژن رفرنس $p27^{kip1}$ استخراج و سپس با استفاده از نرم‌افزار تحت وب Methprimer، دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی شد. جهت بررسی DNA غیرمتیله از جفت پرایمرهای 5'-ATGGAAGAGGTGAGTTAGT-3' و 5'-AAAACCCCAATTA AAAACA-3' و جهت بررسی DNA متیله از جفت پرایمرهای 5'-AAGAGGCGAGTTAGCGT-3' و 3'-AAAACGCCGCCGAACGA-5' استفاده شد. برای هر نمونه موردبررسی، دو بار PCR انجام گرفت، یک‌بار با جفت پرایمرهای متیله که قطعه‌ای به طول ۱۹۵ جفت باز تکثیر شد و بار دوم با پرایمرهای مخصوص توالی غیرمتیله که طول قطعه تکثیرشده در این حالت معادل ۲۱۲ جفت باز بود. حجم کلی هر واکنش PCR مقدار ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم DNA، ۱۰ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میلی مولار dNTP ها، ۰/۵ میکرومولار از پرایمرها و ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase بود. شرایط تکثیر به‌صورت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته سازی اولیه و سپس ۳۵ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای وضعیت متیله و ۶۶ درجه سانتی‌گراد برای وضعیت غیر متیله، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و درنهایت بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) تنظیم گردید. در این مطالعه، از کیت EpiTect PCR (Qiagen, Germany) که حاوی DNA Control و غیر متیله است به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. در ضمن از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی آلودگی (NTC) استفاده شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز

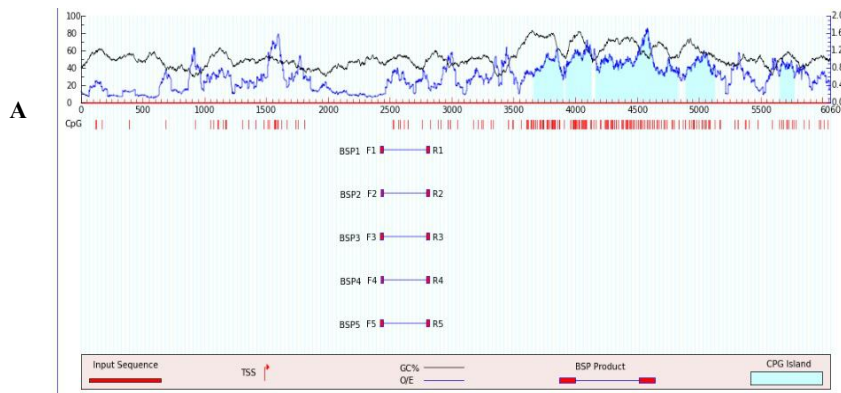
جدول (۱): خصوصیات بیماران مبتلا به کولیت اولسرو

تعداد (میانگین)	خصوصیات
42 ± 18	سن (میانگین \pm انحراف معیار)
۶۰ (۴۸٪)	جنس
۶۵ (۵۲٪)	مرد
	زن
۲۸ (۲۲/۴)	مدت‌زمان بیماری
۷۷ (۶۱/۶)	کم‌تر از ۱ سال
۲۰ (۱۶٪)	بین ۱ تا ۸ سال
	بیشتر از ۹ سال
	محل ضایعه
۵۰ (۴۰٪)	پروکتیت (E1)
۴۹ (۳۹/۲٪)	کولیت چپ (E2)
۲۶ (۲۰/۸٪)	پان کولیت (E3)
۷۸ (۶۲/۴٪)	پاسخ به کورتیکواستروئید وابسته

تعداد (میانگین)	خصوصیات
۴۷ (۳۷/۶)	غیروابسته
۴ (۳/۲)	عمل جراحی
۲۱ (۹۶/۸)	بله
	خیر

مورد مطالعه قرار گرفت که توالی راه‌انداز آن در شکل 1-B مشاهده می‌شود.

نتایج بررسی جزائر CG موجود در ناحیه راه‌انداز ژن $p27^{kip1}$ در شکل ۱ آورده شده است. در این تحقیق پنجمین جزیره CG



CpG Island Prediction

No.	Island size	Island start	Island end	GC% percent	O/E ratio
Island 1	240	3662	3901	50.0	0.6
Island 2	207	3925	4131	50.0	0.6
Island 3	557	4165	4721	50.0	0.6
Island 4	107	4725	4831	50.0	0.6
Island 5	234	4898	5131	50.0	0.6
Island 6	117	5657	5773	50.0	0.6

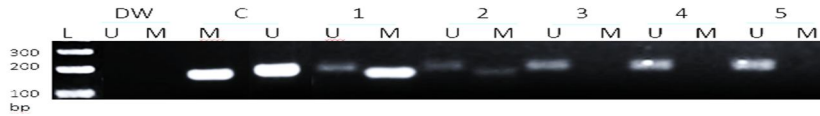
B

ATGGAAGAGGCGAGCCAGCGCAAGTGGAAATTCGATTTTCAGAATCACAACCCTAG
 AGGGCAAGTACGAGTGGCAAGAGGTGGAGAAGGGCAGCTTGCCCGAGTTCTACTACAG
 ACCCCCGCCGCCCCCAAGGTGCCTGCAAGGTGCCGCGCAGGAGAGCCAGGATGTC
 AGCGGGAGCCCGCGCGCGCCTTTAATTGGGGCTCC

شکل (۱): بررسی بیوانفورماتیکی جزائر CpG موجود در ناحیه راه‌انداز ژن $p27^{kip1}$ با استفاده از نرم افزار Methprimer. A: ویژگی‌های ۶ جزیره CpG پیش‌بینی شده. B: توالی قطعه تکثیر شده توسط PCR و نواحی CpG موجود.

غیرمتیله بودند. مقایسه دو گروه مورد بررسی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در خصوص متیلاسیون پنجمین جزیره CpG واقع در ناحیه راه‌انداز ژن مورد نظر در نمونه‌های کولون مبتلا به UC و نمونه‌های سالم وجود داشت ($\chi^2=14/26$; $P=0/001$). به عبارت دیگر، متیلاسیون راه‌انداز ژن $p27^{kip1}$ با استعداد ابتلا به بیماری UC همراه است (OR=۴/۰۲۹۵%CI_۱=۱/۸۶-۸/۶۴).

تصویر ژل آگارز محصولات MSP در شکل ۲ نمایش داده شده است. جهت صحت کار از آب مقطر و کنترل‌های مثبت و منفی برای DNA متیله و غیر متیله استفاده شد. ژن $p27^{kip1}$ در ۴ نمونه از بافت کولون افراد مبتلا به UC به صورت متیله کامل، ۱۷ نمونه به صورت همی متیله و ۱۰۴ نمونه غیرمتیله بودند. در بافت‌های سالم از ۲۳۰ نمونه، ۱۱ نمونه همی متیله و ۲۱۹ نمونه، حاوی DNA



شکل (۲): الکتروفورز محصولات MS-PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ DW=آب مقطر به عنوان کنترل منفی، C=کنترل مثبت برای DNA متیله و غیر متیله، ۱ تا ۵=نمونه‌های مورد بررسی، U=غیرمتیله،

DNA \leftarrow U M

ارتباط نداشت. در فرم شدید بیماری یا E3، میزان متیلاسیون بیشتر از E1 و E2 بود (۸ درصد در مقابل ۳/۲ درصد و ۵/۶ درصد، به ترتیب). لذا متیلاسیون DNA موردنظر با شدت بیماری در ارتباط بود ($P=0/02$).

در جدول ۲، ارتباط خصوصیات بالینی-آسیب‌شناسی بیماران مبتلا به UC با متیلاسیون راهانداز ژن $p27^{kip1}$ آورده شده است. با توجه به ارزش P، متیلاسیون ژن $p27^{kip1}$ با سن، جنس، مدت‌زمان بیماری، پاسخ به کورتیکواستروئید و سابقه جراحی در ناحیه کولون

جدول (۲): ارتباط خصوصیات بالینی - آسیب‌شناسی بیماران مبتلا به کولیت اولسرو با متیلاسیون $p27^{kip1}$.

خصوصیات	تعداد (%)	متیله (تعداد %)	غیرمتیله	xP
سن				0/97
≤۵۰	۸۳ (۶۶/۴)	۱۴ (۱۱/۲)	۶۹ (۵۵/۲)	
>۵۰	۴۲ (۳۳/۶)	۷ (۵/۶)	۳۵ (۲۸)	
جنس				0/35
مرد	۶۰ (۴/۸)	۱۲ (۹/۶)	۴۸ (۳۸/۴)	
زن	۶۵ (۵۲)	۹ (۷/۲)	۵۶ (۴۴/۸)	
مدت‌زمان بیماری				0/75
کمتر از یکسال	۲۸ (۲۲/۴)	۶ (۴/۸)	۲۲ (۱۷/۶)	
بین ۱ تا ۸ سال	۷۷ (۶۱/۶)	۱۲ (۹/۶)	۶۵ (۵۲)	
بیشتر از ۹ سال	۲۰ (۱۶)	۳ (۲/۴)	۱۷ (۱۳/۶)	
محل ضایعه				0/02
E1	۵۰ (۴۰)	۴ (۳/۲)	۴۶ (۳۶/۸)	
E2	۴۹ (۳۹/۲)	۷ (۵/۶)	۴۲ (۳۳/۶)	
E3	۲۶ (۲۰/۸)	۱۰ (۸)	۱۶ (۱۲/۸)	
پاسخ به کورتیکواستروئید				0/15
وابسته	۷۸ (۶۲/۴)	۱۶ (۱۲/۸)	۶۲ (۴۹/۶)	
غیر وابسته	۴۷ (۳۷/۶)	۵ (۴)	۴۲ (۳۳/۶)	
عمل جراحی	۴ (۳/۲)			0/65
بله		۱ (۰/۸)	۲ (۲/۴)	
خیر	۱۲۱ (۹۶/۸)	۲۰ (۱۶)	۱۰۱ (۸۰/۸)	

خبر اساس مربع کای محاسبه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به بررسی وضعیت متیلاسیون ناحیه راهانداز ژن $p27^{kip1}$ در نمونه‌های بافت کولون بیماران مبتلا به UC و مقایسه آن‌ها با بافت سالم کولون در جمعیتی از استان گیلان

از آنجاکه نتایج این تحقیق، ارتباط متیلاسیون ژن $p27^{kip1}$ با بروز و شدت بیماری UC را نشان می‌دهند بنابراین می‌توانند در طراحی و دستیابی به داروها و عوامل مؤثر بر درمان و مدیریت بیماری مورد توجه قرار گیرند زیرا افزایش بیان این ژن در کاهش بیماری و پیشرفت آن مؤثر می‌باشد

پرداخته شد. با استفاده از روش MSP فراوانی متیلاسیون ناحیه مورد بررسی در نمونه‌های بیمار ۱۶/۸ درصد و در نمونه‌های سالم، ۴/۸ درصد به دست آمد. افراد حاوی متیلاسیون DNA در راهانداز ژن مورد نظر چهار برابر بیشتر از سایر افراد در معرض خطر بیماری UC قرار دارند. لذا متیلاسیون راهانداز ژن $p27^{kip1}$ با استعداد ابتلا به بیماری UC همراه می‌باشد. در ضمن، متیلاسیون ناحیه مورد بررسی با شدت بیماری نیز مرتبط بود. این اولین گزارش مورد-شاهدی در خصوص بررسی وضعیت متیلاسیون ژن $p27^{kip1}$ در UC می‌باشد.

پروتئین $p27^{kip1}$ ، از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های منفی چرخه سلولی است. با توجه به این نقش کلیدی، مطالعات متعددی در رابطه با اهمیت این پروتئین و تغییرات بیان آن در شرایط مختلف صورت گرفته است. به‌عنوان نمونه، مطالعه کیم و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که هلیکوباکتر پیلوری با تخریب پروتئین $p27^{kip1}$ موجب کاهش این پروتئین در مخاط معده می‌شود (۱۷). برخی از کورتیکواستروئیدها نظیر دکزامتازون سبب افزایش بیان $p27^{kip1}$ می‌شوند (۱۸). از جمله داروهای مورد استفاده در درمان بیماران مبتلا به UC می‌توان به کورتیکواستروئیدها اشاره نمود. در ضمن، برخی از داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) سبب آپوپتوزیس در سلول‌ها شده و بدین ترتیب از تکثیر سلولی ممانعت می‌نمایند. در سال ۲۰۰۲ مطالعه هوانگ و همکاران نشان داد که این داروها از طریق مهار سیستم پروتئازوم و افزایش پایداری $p27^{kip1}$ می‌توانند در کنترل التهاب مؤثر باشند (۱۹). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که پروتئین $p27^{kip1}$ در التهاب بافتی نقش مؤثری ایفا می‌نماید. لذا تنظیم بیان ژن کد کننده این پروتئین کلیدی جهت اعمال طبیعی سلول از اهمیت خاصی برخوردار است. از عوامل مهم تغییر بیان ژن می‌توان به تغییرات اپی‌ژنتیکی اشاره نمود.

تحقیقات جدید، نقش تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند RNA های غیرکدکننده و متیلاسیون DNA را به‌عنوان اساس مولکولی بیماری‌های التهابی روده از جمله UC، مورد توجه قرار داده است (۲۰ و ۲۱). در تومورهای روده بزرگ، کاهش بیان ژن‌های *MGMT*، *p16^{INK4}* و *hMLH1* با متیلاسیون ژن‌های مذکور همراه می‌باشد. اگرچه در ضایعات توموری ناشی از UC، کاهش سطح متیلاسیون این ژن‌ها در مقایسه با تومورهای تک‌گیر روده بزرگ وجود دارد (۲۲). تاهازا و همکاران، در ۶۱/۴ درصد از نمونه‌های رکتوم مبتلا به UC، تغییر سطح متیلاسیون ژن *MDR1* را گزارش نمودند (۲۳). لین و همکاران با بررسی ۱۷ نمونه مبتلا به UC، تغییرات متیلاسیون در ۵۰ جزیره CpG را با استفاده از روش Golden

پروتنین $p27^{kip1}$ ، از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های منفی چرخه سلولی است. با توجه به این نقش کلیدی، مطالعات متعددی در رابطه با اهمیت این پروتئین و تغییرات بیان آن در شرایط مختلف صورت گرفته است. به‌عنوان نمونه، مطالعه کیم و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که هلیکوباکتر پیلوری با تخریب پروتئین $p27^{kip1}$ موجب کاهش این پروتئین در مخاط معده می‌شود (۱۷). برخی از کورتیکواستروئیدها نظیر دکزامتازون سبب افزایش بیان $p27^{kip1}$ می‌شوند (۱۸). از جمله داروهای مورد استفاده در درمان بیماران مبتلا به UC می‌توان به کورتیکواستروئیدها اشاره نمود. در ضمن، برخی از داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) سبب آپوپتوزیس در سلول‌ها شده و بدین ترتیب از تکثیر سلولی ممانعت می‌نمایند. در سال ۲۰۰۲ مطالعه هوانگ و همکاران نشان داد که این داروها از طریق مهار سیستم پروتئازوم و افزایش پایداری $p27^{kip1}$ می‌توانند در کنترل التهاب مؤثر باشند (۱۹). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که پروتئین $p27^{kip1}$ در التهاب بافتی نقش مؤثری ایفا می‌نماید. لذا تنظیم بیان ژن کد کننده این پروتئین کلیدی جهت اعمال طبیعی سلول از اهمیت خاصی برخوردار است. از عوامل مهم تغییر بیان ژن می‌توان به تغییرات اپی‌ژنتیکی اشاره نمود.

تشکر و قدردانی

از کلیه افرادی که با مشارکت خود انجام این پژوهش را امکان‌پذیر نمودند، کمال تشکر را داریم. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

References:

- Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 501–23.
- Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 639–45.
- Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012; 380: 1606–19.
- Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm. Bowel Dis* 2008; 14: 968–76.
- Lin Z, Hegarty JP, Cappel JA, Yu W, Chen X, Faber P, et al. Identification of disease-associated DNA methylation in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. *Clin Genet* 2011; 80: 59–67.
- Tost J. DNA methylation: An introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Molecular Biotechnology* 2010; 44: 71–81.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1): 6–21.
- Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* 2010; 11: 204–20.
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008; 14: 159–69.
- Pietenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, et al. Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res* 1995; 55: 1206–10.
- Sharma SS, Pledger WJ. The non-canonical functions of p27(Kip1) in normal and tumor biology. *Cell Cycle* 2016; 15: 1189–201.
- Auerkari EI, Joewono V, Handjari DR, Sarwono AT, Suhartono AW, Eto K, et al. Expression of p27Kip1 and E-cadherin in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma of Indonesian Patients. *Open Dentistry J* 2014; 8: 136–43.
- Patel H, Abduljabbar R, Lai CF, Periyasamy M, Harrod A, Gemma C, et al. Expression of CDK7, Cyclin H, and MAT1 Is Elevated in Breast Cancer and Is Prognostic in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22(23): 5929–38.
- Heyn H and Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 679–92.
- Lei PP, Zhang ZJ, Shen LJ, Li JY, Zou Q, Zhang HX. Expression and hypermethylation of p27 kip1 in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005;11: 4587–91.
- Qian X, Jin L, Kulig E, Lloyd RV. DNA methylation regulates p27kip1 expression in rodent pituitary cell lines. *Am J Pathol* 1998; 153: 1475–82.
- Kim SS, Meitner P, Konkin TA, Cho YS, Resnick MB, Moss SF. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after *H. pylori* eradication in chronic gastritis. *Mod Pathol* 2006;19: 49–58.
- Eto I. Upstream molecular signaling pathways of p27(Kip1) expression: effects of 4-hydroxytamoxifen, dexamethasone, and retinoic acids. *Cancer Cell Int* 2010; 19: 10–3.

19. Huang YC, Chuang LY, Hung WC. Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced p27(Kip1) expression. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1515-21.
20. Scarpa M, Stylianou E. Epigenetics: Concepts and relevance to IBD pathogenesis. *Inflamm. Bowel Dis* 2012; 18: 1982-96.
21. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology* 2013; 145: 293-308.
22. Mikami T, Yoshida T, Numata Y, Shiraishi H, Araki K, Guiot MC, et al. Low frequency of promoter methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and hMLH1 in ulcerative colitis-associated tumors: comparison with sporadic colonic tumors. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 366-73.
23. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, et al. Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med* 2009; 23: 521-7.
24. Häsler R, Feng Z, Bäckdahl L, Spehlmann ME, Franke A, Teschendorff A, et al. A functional methylome map of ulcerative colitis. *Genome Res* 2012; 22: 2130-7.
25. Cooke J, Zhang H, Greger L, Silva AL, Massey D, Dawson C, et al. Mucosal genome-wide methylation changes in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 2128-37.
26. Lobatón T, Azuara D, Rodríguez-Moranta F, Loayza C, Sanjuan X, de Oca J, et al. Relationship between methylation and colonic inflammation in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 10591-8.
27. Ling Y, Zhang C, Xu Y, Zhu J, Zhu C, Lu M, et al. Promoter methylation-associated silencing of p27kip1 gene with metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2014; 9: 1075-9.
28. Zheng JY, Wang WZ, Li KZ, Guan WX, Yan W. Effect of p27(KIP1) on cell cycle and apoptosis in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7072-7.
29. Dong W, Li J, Liu Q, Liu C, Li C, Song G, et al. P21Waf1/Cip1 and p27Kip1 are correlated with the development and invasion of prolactinoma. *J Neurooncol* 2017. In press.

ANALYSIS OF *P27^{KIP1}* PROMOTER METHYLATION IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

Sohail Mashayekhi¹, Soheila Talesh Sasani^{2}, Keyvan Aminian³*

Received: 15 Apr, 2018; Accepted: 28 June, 2018

Abstract

Background & Aims: The CDK inhibitor (CDKI) protein p27^{kip1} (p27) negatively regulates cyclin D–CDK4 complex in the G1 phase. Alterations in the expression of p27^{kip1} cause a degradation of cell growth and promote the development of various diseases. Aberrant methylation patterns have been reported in large number of diseases. The purpose of this study was to investigate the methylation pattern of p27^{kip1} gene promoter in patients with ulcerative colitis (UC) and normal subjects.

Materials & Methods: Methylation specific PCR (MSP) was performed on 230 normal controls and 125 samples of patients with UC. Statistical analysis was performed using MedCalc software.

Results: The p27^{kip1} promoter was methylated in 16.8% (21/125) of UC and in 4.8% (11/230) of normal samples. The difference in p27^{kip1} methylation between the UC and normal groups was statistically significant ($P < 0.05$). Significant risk of UC development was observed in individuals with methylated p27^{kip1} promoter (OR = 4.02, 95% CI = 1.86–8.64). p27^{kip1} methylation was also associated with an extensive form of UC ($P = 0.02$).

Conclusion: Methylation of p27^{kip1} may contribute to UC development. However, further studies with larger sample sizes are needed to confirm this result.

Keywords: Gene silencing, Methylation, p27^{kip1}, p27, UC

Address: Department of Biology, School of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Tel: +9813-33333647

Email: sasani@guilan.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018; 29(5): 380 ISSN: 1027-3727

¹ Medical student, Student Research Committee, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

² Assistance Professor in Molecular Genetics, Department of Biology, School of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (Corresponding Author)

³ Assistant Professor, Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Razi Hospital, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran