به نام خداوند بخشنده مهربان

ژنتیکا

روشها و پروتکلهای ژنتیکی

www.genetica.ir

آشنایی جامع با مکانیسم متیلاسیون dna ،جایگاه و عملکرد methylation در فعالیت ها و فرایندهای زیستی و ژنتیکی

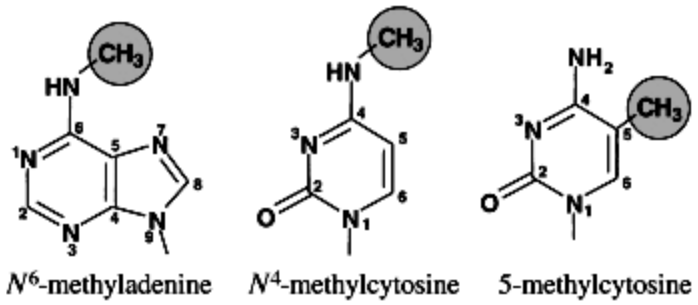
آشنایی با تعریف متیلاسیون DNA و مقدماتی در مورد متیلاسیون ژن‌ها

آشنای با مفهوم اپی ژنتیک Epigenetic Concept

حوزه علم ژنتیک ۵۰ سال پس از توصیف ساختار DNA توسط واتسون - کریک، بخشی تفکیک ناپذیر از علم پزشکی نوین شد. در دنیای امروز، پیشرفت‌های مهمی در زمینه شناسایی جهش‌های ویژه منجر به برخی از بیماری‌های انسانی نظیر هانتینگتون و سیستیک فیبروزیس ایجاد شده است. پیشرفت‌های بیشتر، مانند انتشار توالی ژنوم انسان، فرصت‌های جدیدی را برای رشد ابزارهای تشخیصی بهتر و ژن‌درمانی هدف‌دار فراهم نموده است. اپی ژنتیک (Epi در لغت به معنای فراتر و خارج)، حوزه جدیدی است که تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر علم پزشکی دارد. برای نخستین بار در سال ۱۹۲ میلادی ادینگتون اصطلاح اپی ژنتیک را بدین‌صورت تعریف نمود: "مطالعه فرآیندهایی که به‌واسطه آن‌ها ژنوتیب یک موجود سبب ایجاد فنوتیب آن می‌گردد " ولیکن این تعریف به‌مرور تغییر نمود. تعریف کنونی اپی ژنتیک که توسط موریس و همکارش ارائه شده عبارت است از: "مطالعه تغییرات برگشت‌پذیر در بیان ژن‌ها که از طریق تقسیمات میتوز، میوز و یا هر دو، قابلی وراثت بوده و این شامل تغییر در توالی DNA نمی‌شود". تغییرات اپی ژنتیک را می‌توان در سه پدیده عمده طبقه‌بندی نمود: ۱- تغییرات کووالان هیستون‌ها، ۲- RNAهای غیرکد شونده و ۳- متیلاسیون DNA

تعریف متیلاسیون DNA (DNA Methylation) : متیلاسیون یعنی چه ؟

از دهه قبل مشخصی شده که DNA متعلق به موجودات گوناگون، علاوه بر ۴ باز استاندارد، حاوی بازهای متیله N- متیل آدنین، C- متیل سیتوزین و N- متیل سیتوزین است (شکل ۱). باید به این نکته اشاره نمود که این بازهای متیله شده، اجزاء تشکیل دهنده طبیعی DNA بوده و با تغییرات شیمیائی بازها نظیر آلکیلاسیون و آسیب‌های اکسیداتیو DNA متفاوت هستند. متیلاسیون DNA در ویژگی‌های واتسون - کریک بازهای آدنین و سیتوزین اختلالی ایجاد نمی‌کند، به‌طوری‌که گروه متیل در شیار بزرگ DNA قرارگرفته و به‌راحتی به‌وسیله پروتئین‌های برهمکنشی کننده با DNA قابل شناسایی است.



شکل ۱- نمایشی ساختار شیمیایی بازهای متیله شونده در DNA

بدین وسیله متیلاسیون، اطلاعات اضافی به DNA القاء می‌نماید، به‌گونه‌ای که کدگذاری نشده و می‌توان بازهای متیله را به‌عنوان متیلاسیون DNA ارتباط نزدیکی باهمانندسازی DNA دارد و به

استثنای رشته جدید، این دو فرآیند به‌صورت هم‌زمان انجام می‌پذیرند. در پروکاریوت ها، متیلاسیون DNA در هر دواحد سیتوزین و آدنین رخ می‌دهد، همچنین در فرآیندهایی نظیر تنظیم بیان ژن، ترمیم DNA، کنترل تکثیر سلول و دفاع علیه DNA خارجی نقشی دارد و این در حالی است که در یوکاریوت ها، متیلاسیون به‌صورت هماهنگ با سایر تغییرات اپی ژنتیک، در تنظیم بیان ژن و ساختار کروماتین نقش ایفاء می‌نماید. در پستانداران، متیلاسیون DNA بر روی کربن ۵ سیتوزین قرارگرفته در دی نوکلئوتید CpG و بندرت در توالی‌های نامتقارن (CpNpG،CpT، CpA، CC(a/t)GG) انجام می‌شود، حال متیلاسیون سیتوزین در همه یوکاریوت ها انجام نمی‌شود، به‌گونه‌ای که در ساکارومیسی سروزیه و بسیاری از بی‌مهرگان نظیر نماتدها متیلاسیون DNA مشاهده نمی‌گردد. در حشرات مانند مگس زنبور عسلی، سطح پائینی از متیلاسیون DNA وجود دارد.

در ژنوم هاپلوئید انسان تقریباً ۲۸۲۳۳۹ دی نوکلئوتید CpG وجود دارد که ۷۰ درصد (بسته به گزارشی‌های مختلف، بین ۱۰ تا ۹۰ درصد) آن‌ها در سلول‌های نرمال متیله می‌شوند. فقط ۷ درصد از کل CpGها، در جزایر CpG قرارگرفته‌اند که اغلب آن‌ها در سلول‌های نرمال غیرمتیله هستند. از استثنائات در این مورد می‌توان به متیلاسیون نرمال دی نوکلئوتیدهای متعلق به تعداد کمی از جزایر CpG موجود در کروموزوم X غیرفعال (خاموش شدن تصادفی یکی از کروموزوم های X در هر یک از سلول‌های سوماتیک نرمال در پستانداران ماده)، ژن‌های حک گذاری شده (بیان یا عدم بیان ژن‌های معین منطبق با منشأ والدینی) و اختصاصی بافت و علاوه براین، DNA پری سانتریک توالی‌های ماهوارهای سانترومر کروموزوم های ۱ و ۱۱، نواحی بین ژنی و توالی‌های تکراری اشاره نمود. در واقع ۵ درصد از CpGهای موجود در ژنوم، در نواحی تکراری DNA قرار دارند و این نسبت بزرگی از کل ۵- متیل سیتوزین ژنوم را به خود اختصاص می‌دهد. باز تغییریافته ۵-

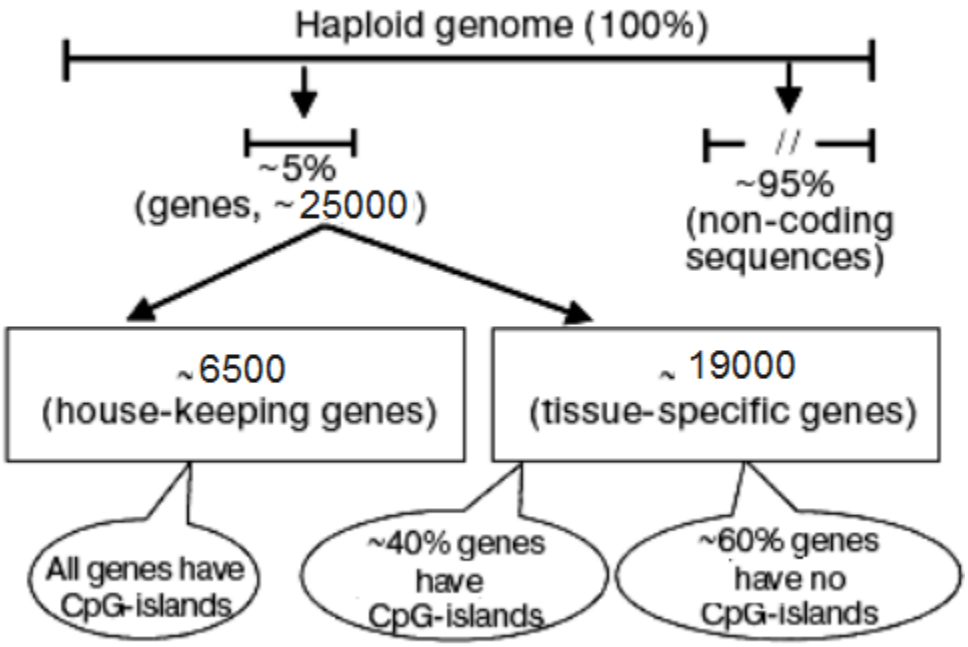
متیل سیتوزین، به دلیل ناپایداری گروه آمین موقعیت ۶، فوق‌العاده جهش پذیر بوده و می‌تواند متحمل دآمیناسیون خود به خودی و جایگزینی با تیمین شود. از آنجا که این موتاسیون توسط سیستم ترمیم DNA قابل شناسایی نیست، به تجمع موتاسیون از نوع C-T منجر می‌گردد. این مشاهده که می‌تواند علت کاهش ۵ برابری دی نوکلئوتید CpG (۱ به ۸۰) را در مقایسه با نسبت مورد انتظار (۱ به ۱۶) توجیه نماید، سرکوب CpG (CpG-SuppreSSlOn) نامیده می‌شود.

تعریف جزایر سی پی جی (CpG Islands) در ژنوم موجودات

علیرغم تنوع موجود در توالی پروموترها، ژن‌های رونویسی شونده توسط RNA پلیمراز II را مطابق با توزیع دی نوکلئوتید CG (5-CpG-3)، می‌توان به دو گروه تقسیم بندی نمود. فراوانی CpG در کلاس اول همسان با میانگین ژنوم است (۱ از هر ۱۰۰ دی نوکلئوتید). این کلاس غالباً شامل ژن‌هایی است که بیان آن‌ها به تعداد معینی از انواع سلول‌ها محدود می‌شود. در مقابل، انتهای ۵ ژن‌های متعلق به کلاس دوم توسط ناحیه‌ای تقریباً یک کیلو بازی (۵۰۰ تا ۵۰۰۰ جفت باز) احاطه‌شده که فراوانی CpG در آن‌ها بیش از ۱۰ برابر میانگین ژنوم است (۱ از هر ۱۰ دی نوکلئوتید) و علاوه بر این، محتوی CpG آن‌ها ۱۰ تا ۷۰ درصد و نسبت CpG/GpC در آن‌ها حداقل ۰/۶ است. این نواحی شدیداً اختصاصی، جزایر CpG نامیده می‌شوند. درصد C+G در جزایر CpG ژنوم انسان و موش، به ترتیب تقریباً ۶۷ و ۶۴ درصد می‌باشد. با این حال قابل ذکر است که دی نوکلئوتید CpG در جزایر CpG مذکور، علیرغم فراوانی شان غیرمتیله باقی می‌مانند. ۷۰ درصد جزایر CpG با ژن‌ها همراه هستند و بیش از نیمی از آن‌ها در انتهای '۵ ژن‌ها قرار دارند و این دخالت احتمالی آن‌ها در تنظیم رونویسی و پتانسیل کاربرد آن‌ها را در مکان‌یابی ژن‌ها در ژنوم پیشنهاد می‌نماید.

بندرت جزایر CpG غیرمعمول نیز در بدنه و حتی در نواحی ۳ پریم ژن‌ها مشاهده می‌شوند که مستعد به متیلاسیون هستند. هم اکنون پس از ۲۰ سال از شناسایی، هنوز این نواحی اختصاصی، قابل‌اعتمادترین شاخصی برای ردیابی و شناسایی نواحی پروموتر در ژنوم پستانداران محسوب می‌شوند. تجزیه کروماتین در مقیاس کل ژنوم نشان می‌دهد که این نواحی، ویژگی‌های معمول کروماتین فعال را دارند. این خصوصیات شامل متیلاسیون هیستون‌های H3 و H4، فقدان هیستون H1 و ناحیه خالی از نوکلئوزوم است. نتایج به دست آمده از برخی مطالعات، از برآورد تقریبی تعداد ۵۰۰۰ و ۳۷۰۰۰ جزیره CpG به ترتیب در ژنوم انسان و موش حکایت دارد اگر چه تجزیه‌های رایانه‌ای، این مقادیر را به ۲۹۰۰۰ و ۱۵۰۰۰ کاهش داده است. در حدود ۵۰ تا ۱۰ درصد ژن‌های انسان، در نواحی تنظیمی خود واجد جزایر CpG هستند که این میزان، ژن‌های خانه‌دار (House

Keeping genes) و در حدود نیمی از ژن‌های اختصاصی بافت Tissue-specific genes) را شامل می‌گردد (شکل ۲).



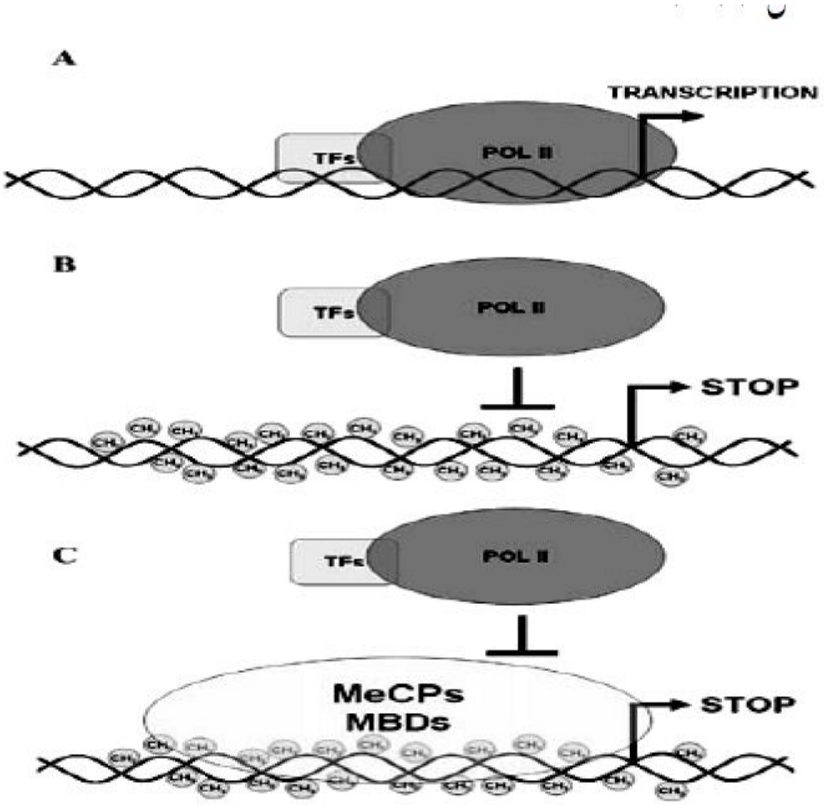
شکل ۲- نمایشی انتشار جزایر CpG در ژنوم انسان: ژنوم هاپلوئید انسان متشکل از ۱۰ ×۲/۳ باز و تقریباً حاوی ۲۵۰۰۰ ژن است. قسمتی از آن‌ها (تقریباً ۶۵۰۰ ژن)، ژن‌های خانه‌دار را تشکیل می‌دهند و مابقی عملکرد اختصاصی دارند. اکثر ژن‌های متعلق به دسته اول و ۴۰ درصد ژن‌های دسته دوم، دارای جزایر CpG در نزدیکی توالی تنظیمی‌شان هستند. از این رو، ۱۳۰۰۰ جزیره CpG به‌صورت متعادل در بین ژن‌های پایه‌ای و اختصاصی پخش شده‌اند.

دو نوع متیلاسیون وجود دارد: هیپومتیلاسیون و هیپرمتیلاسیون. هیپرمتیلاسیون DNA در عناصر پروموتور سبب جلوگیری از بیان ژن گردیده و برای دامنه گسترده‌ای از فعالیت‌های سلولی مانند پایداری و حفاظت ژنوم، ایمپرینتینگ، غیرفعال‌سازی کروموزومX، تنظیم بیان ژن‌های اختصاصی بافت‌ها، سرطان و پیری ضروری است. هیپومتیلاسیون DNA نقش مهمی در ایجاد سرطان بازی می‌کند. الگوی متیلاسیون ژنوم در طی تکامل به علت فرآیندهای دینامیک شامل متیلاسیون de novo و دمتیلاسیون تغییر می‌کند .سلول‌های تمایز یافته دارای الگوی ثابت و یکنواختی از متیلاسیون DNA است که نسخه برداری ژن‌های ویژه بافت‌ها را تنظیم می‌کنند. در این مبحث مهم‌ترین تغییر اپی ژنتیک که به‌صورت مستقیم سبب تغییر شیمیایی DNA می‌شود، یعنی متیلاسیون DNA موردبررسی قرار می‌گیرد.

نقش متیلاسیون DNA در سرکوب رونویسی ژن‌ها

در ارتباط با دخالت متیلاسیون DNA در سرکوب رونویسی ژن‌ها، دو مکانیسم پیشنهاد شده است: نخست اینکه، متیلاسیون DNA به طور مستقیم از اتصال فاکتورهای رونویسی (Transcription Factors) حساس به متیلاسیون مانند c- AP2 E2F cMyb SP1 ATF/CREB ETS NFkB Myc/Myn به نواحی اتصالی‌شان در پروموتر ژن‌ها ممانعت به عمل می‌آورد. در این مکانیسم باید دی نوکلئوتیدهای CpG، درون جایگاه‌های اتصال این فاکتورهای رونویسی حساسی به متیلاسیون قرار داشته باشند.

مکانیسم دیگر این است که اتصال فاکتورهای دارای دمین MBD به DNA متیله شده، سبب مهار رونویسی ژن‌ها می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳– سرکوب رونویسی به‌واسطه متیلاسیون دی نوکلئوتیدهایCpG . A) : RNA پلیمراز II و فاکتورهای رونویسی به‌منظور آغاز رونویسی، به توالی پروموتر متصل می‌شوند. (B) متیلاسیون CpGs درون جایگاه‌های اتصال قرارگرفته در پروموتر، سبب مهار مستقیم جذب فاکتورهای رونویسی می‌شوند. (C) اتصال فاکتورهای واجد دمین اتصال به m5- (MBD CpG و MeCPS)، از اتصال فاکتورهای رونویسی به توالی پروموتر ژن‌ها ممانعت به عمل می‌آورند.

آموزش نقش متیلاسیون DNA در فرآیند سرطان‌زایی

سرطان یک بیماری چند مسیری با ضایعات ژنتیکی است و تمام این ضایعات برای ایجاد یک تومور کاملاً تثبیت‌شده موردنیاز است. به‌علاوه وضعیت یکسانی نیز برای ضایعات اپی ژنتیک وجود دارد. باوجود گذشت ۲۵ سال از درک نقش متیلاسیون DNA در فرآیند خاموشی ژن، کماکان تحقیقات پیرامون این موضوع، موردتوجه بسیاری از محققین است. در مقایسه با سلول‌های طبیعی، سلول‌های توموری دو نوع اصلی از ضایعه را در الگوی متیلاسیون نشان می‌دهند: هیپومتیلاسیون DNA معمولاً توالی‌های تکراری و هیپرمتیلاسیون DNA جزایر CpG را هدف قرار می‌دهند (۳۵ و ۳).

هیپو متیلاسیون DNA (DNA Hypomethylation) چیست؟

سطح پائین متیلاسیون DNA در تومورها در مقایسه با بافت‌های طبیعی، یکی از نخستین تغییرات اپی ژنتیک شناخته‌شده در سرطان‌های انسانی است. فقدان متیلاسیون DNA عمدتاً به علت هیپومتیلاسیون توالی‌های تکراری و دمتیلاسیون نواحی کدگذار و اینترون DNA است که رونویسی نابجا از ژن‌ها را سبب می‌شود.

مطالعات متیلاسیون DNA با استفاده از روش Genomic Microarray در مقیاس کل ژنوم، در سلول‌های توموری هیپومتیلاسیون وسیعی را در نواحی ضعیف ازنظر وجود ژن‌ها نشان می‌دهد. در حین ایجاد سرطان هیپومتیلاسیون به‌صورت یک ضایعه پیش‌رونده از تکثیر خوش‌خیم تا شکل متاستازی سرطان را نشان می‌دهد.

نقش هیپر متیلاسیون DNA در بروز سرطان چیست؟

علاوه بر هیپومتیلاسیون، هیپرمتیلاسیون در جزایر CpG ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان نیز می‌تواند یکی از دلایل اصلی بروز سرطان‌ها باشد.

تجربیات نشان داده که هیپرمتیلاسیون جزایر CpG، مکانیسم غیرفعال شدن ژن مهارکننده P16 در سرطان‌های انسانی است و ازآن‌پس، تهیه فهرست ژن‌های کاندید با فرض بر متیلاسیون نابجا در جزایر CpG آن‌ها آغاز شد. در سلول‌های ترانسفورم شده و سلول‌های بدخیم، جزایر CpG معینی از ژن‌های مهارکننده تومور خاص، هیپرمتیله می‌شوند، از طرفی برخلاف ظهور ناگهانی موتاسیون های ژنتیکی، احتمالا روند متیلاسیون DNA یک فرآیند تدریجی است. دو تئوری مبهم در متیلاسیون از نو پدید نابجا قابل فرضی است: نخست اینکه متیلاسیون DNA منجر به ایجاد سرطان، از مراکز متیلاسیون نرمال در مجاورت جزایر CpG خالی از متیلاسیون (برای مثال توالی Alu) منتشر می‌شود. تئوری دیگر وجود بذر متیلاسیون است که با متیلاسیون

دی نوکلئوتیدهای CpG منفرد معینی، بروز میزان بیشتری از متیلاسیون را به آن ناحیه القاء می‌نماید. این فرآیند تا انجام هیپرمتیلاسیون متراکم اثر تعاونی مثبت دارد.

آنجائی که هر ژن مهارکننده تومور دور الل دارد، لذا بر اساس مدل دو ضربه‌ای کلاسیک ندسون (The Classic TWO-hit model of Knudson)، بایستی هر دو الل پیش از شکل گیری غیر وراثتی (Sporadic cancer) فقدان فعالیت ژن مهارکننده تومور هنگامی قسمتی از کروموزوم حاوی کپی دیگر ژن (دومین ضربه) است، لکن در اکثر موارد هر دو الل با متیلاسیون DNA غیرفعال می‌شوند.

در سرطان‌های وراثتی (Inherited Cancers)، وقتی یک الل از یک ژن مهارکننده تومور در سلول‌های زایشی دچار موتاسیون شود، فقدان دومین الل در تومور حتی با رخداد حذف کروموزمی به وقوع می‌پیوندد. مجدداً، متیلاسیون نواحی غنی از CpG موجود در پروموتر، احتمالا مهیا کننده دومین ضربه در سرطان‌های وراثتی است. در این مورد الل فاقد موتاسیون به‌طور غیر نرمال متیله شده، ولی الل موتاسیون یافته متیله نمی‌شود.

بنا بر دلایل ذکرشده در فوق بررسی وضعیت و تغییرات متیلاسیون نقاط CpG و مخصوصاً در جزایر CpG می‌تواند آشکار کننده روش‌های تغییر بیان ژن‌ها در فنوتیپ های مشاهده می‌باشد.