

بررسی الگوی متیلاسیون ژن TRADD در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین ویروس EBV مثبت

بیبا احمدی^۱، چنگیز احمدی زاده^{۲*}

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران، ^۲گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۴

چکیده

زمینه و هدف: ویروس اپشتین بار یکی از عوامل آسیب‌رسان در لنفوم هوچکین شناخته شده است. این ویروس در سلول‌های رد اشترنبرگ که بخشی از لنفومای هوچکین کلاسیک است، حضور می‌یابد. TRADD یک مولکول آداپتور ضروری و مسئول برقراری سیگنالینگ تشکیل پیچیده و القاء آپوپتوز، نکروز، فعال سازی NF-KB و MAP Kinase است. هدف از این بررسی الگوی متیلاسیون ژن TRADD در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین ویروس EBV مثبت است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع مورد و شاهد می‌باشد. گروه مورد، شامل ۸۰ نفر از افراد مبتلا به لنفوم هوچکین و گروه شاهد، نمونه حاشیه تومور افراد گروه مورد بود. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دو روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز استفاده شد. بررسی تغییر الگوی متیلاسیون ژن TRADD با استفاده از روش اواگرین و مقایسه نقطه ی ذوب با درجه تفکیک بالا یا تکنیک (HRM) صورت گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این بررسی ۴۶/۳ درصد از زیرتایپ‌ها نودولار اسکلروزیس، ۲۵ درصد میکس سلولاریتی، ۱۱/۳ درصد لنفوسیت غنی، ۱۰ درصد لنفوسیت تهی و ۷/۵ درصد نامشخص بودند. مقایسه تغییر الگوی هایپرمتیلاسیون ژن TRADD در نمونه‌های دارای ویروس با نمونه‌های فاقد ویروس به ترتیب ۶۱/۲ و ۳۲/۵ درصد بود که تغییرات معنی‌داری را نشان داد. ارزیابی اهمیت الگوی متیلاسیون ژن TRADD به تفکیک مرحله‌بندی لنفوم ارتباط معنی‌داری را بین لنفوم، گرید و مراحل مختلف با حضور ویروس EBV نشان داد ($p=0/046$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد الگوی متیلاسیون ژن TRADD همراهی نزدیکی با عفونت‌های ویروسی EBV دارد. بیماران مبتلا به EBV می‌توانند تأثیر بیشتری از تغییر رفتار ژن TRADD بگیرند که به بدرقتاری سلول‌های ایمنی و در نهایت لنفوم منجر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ویروس اپشتین بار، بیماری هوچکین، متیلاسیون، TRADD

نویسنده مسئول: چنگیز احمدی زاده، اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه میکروبیولوژی

Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

مقدمه

لنفوم هوچکین حدود ۱ درصد از همه سرطان‌ها و ۳۰ درصد از بدخیمی‌های لنفوئیدی را در جهان تشکیل می‌دهد(۱). که از نظر پاتولوژی طبق تقسیم‌بندی سازمان جهانی بهداشت، به دو فرم متفاوت لنفوم هوچکین کلاسیک و لنفوم هوچکین غیر کلاسیک تقسیم‌بندی می‌شود(۲). لنفوسیت‌های میکس سلولاریته، نودولار اسکروزیس، لنفوسیت تھی و لنفوسیت غنی نشان دهنده لنفوم هوچکین کلاسیک می‌باشند(۳). این بیماری به وسیله اختلال در ساختمان نرمال بافت‌های لنفاوی و حضور تعداد اندک در حدود ۱-۲ درصد سلول‌های بدخیم رد اشترنبرگ HRS (Hodgkin's Reed-Sternberg) که در میان سلول‌های غیرسرطانی متشکل از لنفوسیت‌های B و T و انواع دیگر سلول‌ها است مشخص می‌شود(۴). در سال ۱۹۶۶ مک ماهون پیشنهاد داد، ممکن است یک عامل عفونی در ایجاد لنفوم هوچکین دخالت داشته باشد(۵). EBV(Epstein-Barr virus) حدود ۹۰ درصد از جمعیت را عفونی می‌کند و عفونت اولیه در خردسالان می‌باشد و ممکن است سبب عفونت مونوکلئوزیس شود. در بیشتر افراد، ویروس در مخزن سلول‌های B خاطره دایمی می‌شود و علائم بیماری تشخیص داده نمی‌شود. با این حال این ویروس با لیستی از بیماری‌های بدخیم با منشا لنفوئیدی و یا پوششی همانند لنفومای بورکیت، بیماری تکثیری لنفاوی پس

از پیوند، لنفومای ب، لیومیوسارکوما در ایدز و زیر مجموعه‌های سرطان معده در ارتباط است(۶). مطالعه‌های اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که سه نوع CHL (Classical Hodgkin's Lymphoma) وجود دارد؛ لنفوم هوچکین کودکان(با EBV مثبت و نوع سلولاریتی مخلوط)، لنفوم هوچکین بزرگسالان جوان(با EBV منفی و نوع اسکروز نودولار) و لنفوم هوچکین بزرگسالان مسن(با EBV مثبت و نوع با سلولاریته مخلوط)(۷). سلول‌های HRS اغلب متحمل جهش ژنی مخرب در ناحیه ایمونوگلوبولین می‌شود، در این صورت بیان گیرنده سلول‌های B عملکرد خود را از دست می‌دهند(۸). بنابراین بقای سلول‌های پیش‌ساز HRS بدون BCR بیشتر بستگی به کشف عملکرد جدید آنتی‌آپوپتوتیک دارد(۹). TRADD (TNF receptor associated death domain) یک مولکول آداپتور که سیگنال را در پایین TNFR1 (گیرنده فاکتور نکروز تومور) قرار می‌دهد. TNFR1 متعلق به خانواده Death receptor (DR) که بسته به زمینه می‌تواند آپوپتوز یا تکثیر را منجر شود و همچنین فعال شدن NF-KB و MAP kinase را ایجاد کند. گیرنده‌های این گروه شامل دامنه مرگ(DD) است که برای القای آپوپتوز ضروری است(۱۰). رسپتورهای مرگ، پیام را از طریق لیگاندهای مخصوص انتقال می‌دهند و آبشار کاسپازی را فعال می‌کنند. مهم‌ترین رسپتورهای مرگ خانواده رسپتوری TNF شامل؛ TNFR1، CD95(Fas)، TRAIL-2 و TRAMP هستند(۱۱ و ۱۲) در انتهای

کربوکسیل این رسپتورها ناحیه درون سلولی به نام DD (Death Domain) وجود دارد. وقتی این رسپتورها به لیگاند خود $TNF \alpha$ متصل می‌شوند، مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. اتصال $TNF \alpha$ به رسپتور موجب می‌شود مولکول TRADD از طریق واکنش DD به رسپتور TNF متصل شود و خود TRADD هم با DD دوم به خود DD مولکول FADD (Fas-associated death domain) اتصال یابد (۱۴ و ۱۳). هدف از این پژوهش بررسی الگوی متیلاسیون ژن TRADD در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین EBV مثبت است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مورد و شاهد می‌باشد که گروه مورد، شامل ۸۰ نفر از افراد مبتلا به لنفوم هوچکین و گروه شاهد، نمونه حاشیه تومور افراد گروه مورد بود. به منظور بررسی الگوی متیلاسیون ژن TRADD و مقایسه آن با ناحیه حاشیه تومور، از افرادی که در فاصله زمانی سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۶ کاندید شیمی‌درمانی بودند، پس از اخذ مجوز پژوهشی و رضایت نامه کتبی و پرسشنامه، قسمتی از بافت تومور و حاشیه از پزشک جراح تهیه گردید. اطلاعات بیماران نظیر: سن، جنس، سابقه خانوادگی سرطان و سابقه خانوادگی آن‌ها در پرسشنامه مخصوص ثبت شد.

مطالعه در پاییز سال ۱۳۹۶ در بیمارستان ولیعصر تبریز در دو گروه مورد و شاهد طراحی

شده بود. در گروه مورد، ۸۰ نفر از افراد مبتلا به لنفوم هوچکین که نتیجه پاتولوژی آن‌ها تأیید کننده ابتلا به انواع لنفوم هوچکین بود، قرار گرفتند. آزمایش پاتولوژی تمامی بیماران در بخش پاتولوژی بیمارستان کودکان تبریز و بیمارستان امام تهران انجام شد. به منظور هم‌سان سازی بیماران، بیمارانی که نتیجه پاتولوژی آن‌ها، لنفوم هوچکین از نوع تأیید شده بودند در مطالعه وارد شدند و مبتلایان به سایر بیماری‌های مرتبط مانند لنفوم‌های غیر هوچکینی از مطالعه خارج شدند. در گروه شاهد، نمونه حاشیه تومور (بافت مجاور سالم) همان افراد گروه مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از معیارهای خروج افراد از مطالعه، انجام روش درمانی مثل شیمی‌درمانی و یا رادیوتراپی برای افرادی که سابقه ابتلا به سرطان را داشتند، بود. فاکتورهای ورود بیماران به پروژه شامل: تشخیص قطعی لنفوم هوچکین با دارا بودن نتایج پاتولوژیک مثبت، میانگین سنی بین ۲۸ الی ۶۰ و حاضر بودن بیمار در یکی از مراحل چهارگانه لنفوم هوچکین، و درجه بندی دقیق پاتولوژیست بود.

برای استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل با روش نمک اشباع طی مراحل زیر انجام گرفت؛ مقدار ۲ سی‌سی خون کامل، داخل لوله‌های آزمایش ریخته شد. ۶ سی‌سی، بافر لیزکننده به آن اضافه شده و با پارافیلیم بسته شد. لوله چند بار سر و ته شده و به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در یخچال قرار داده شد. به مدت ۱۵

دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. مایع رویی جدا گردیده و رسوب حاصله نگه داشته شد. سپس مقدار ۲ سی سی SE بافر و ۲۰۰ میکرولیتر ۱۰ درصد SDS (مرک، آلمان) و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (فرمانتانز، فرانسه) به رسوب حاصله اضافه شده، ورتکس گردید و در طول شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده می‌شد. پس از حل شدن کامل پروتئین‌ها، ۹۰۰ میکرولیتر محلول NaCl (مرک، آلمان) اشباع (۶ مولار) و ۱/۵ میلی‌لیتر کلروفرم به محلول اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۳۸۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. محلول رویی برداشته شد و به لوله‌ی آزمایش دیگر انتقال داده شد. ۶ سی سی اتانول مطلق سرد اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد تا رشته‌های DNA ظاهر گردند. کلاف DNA با سمپلر برداشته شد و به یک میکروتیوب استریل انتقال داده می‌شد. سپس به مدت ۱۵ ثانیه در میکروپیوژ ۱۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا DNA رسوب کند. مایع رویی برداشته شد تا رسوب باقی ماند. مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. میکروتیوب حاوی رسوب DNA به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود قرار داده شد تا رسوب DNA کاملاً خشک گردد. در نهایت رسوب DNA در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE حل شد. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز استفاده شد.

به منظور بررسی کمیت DNAهای استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ استفاده شد. به طوری که حجم معینی از DNA استخراج شده را با آب مقطر یا بافر TE (همان حلالی که DNA داخل آن حل شده است) رقیق کرده و به حجم خاصی رسانده شد. برای کالیبره نمودن دستگاه حجم خاصی از آب مقطر یا TE درون کوت کوارتز ریخته و طیف جذبی آن را در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ نانومتر روی صفر تنظیم شد. پس از کالیبره شدن، حجم خاصی از نمونه DNA رقیق شده داخل کوت ریخته شد، OD=۲۶۰ و OD=۲۸۰ و همین طور نسبت بین این دو از دستگاه خوانده شد. نسبت ۲۸۰ چگالی نوری بر ۲۶۰ چگالی نوری برآوردی از خلوص DNA است. این نسبت در DNA بین ۱/۸ تا ۲ است. مقادیر کمتر از ۱/۸ نشانگر وجود آلودگی‌های پروتئینی، فنی و یا دیگر جذب کننده‌های اشعه‌ی ماوراءبنفش است. مقادیر بیشتر از ۲ نیز نشانگر وجود RNA در نمونه استخراج شده است. پس از انتخاب محلول‌هایی که نسبت جذبی آنها در محدوده مورد نظر باشد، از اعداد مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر جهت محاسبه میزان غلظت DNA استفاده گردید. نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. در بیشتر موارد کیفیت نمونه‌ها مطلوب بود یعنی نسبت ۲۸۰/۲۶۰ انگستروم بر ۲۶۰ انگستروم، مناسب و بین ۱/۹ تا ۲ بود.

به منظور بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده نمونه‌های DNA با غلظت‌های متفاوت همراه با

ابتدا اطمینان حاصل شد که بلوک خنک کننده از قبل به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسیده است. لوله‌های PCR به بلوک خنک کننده انتقال داده شد. اطمینان حاصل شد که لوله برای استانداردها و حداقل یک کنترل منفی (آب، درجه PCR) در هر اجرا PCR را شامل شد. جهت ایجاد منحنی استاندارد، از هر استاندارد ارایه شده (EBV S 1-5) برای هر PCR استفاده شد. قبل از هر استفاده، تمام واکنش دهنده‌ها باید به طور کامل مخلوط شدند. بر تعداد نمونه‌ها بسته به تعداد نمونه‌ها می‌توان ترکیب را به صورت زیر تهیه کرد. ۱۵/۴ میکرولیتر مخلوط Master (فرمانتان، فرانسه) به داخل لوله PCR انتقال داده شد. سپس ۱۰ میکروگرم از DNA از قبل استخراج شده را به هر لوله نمونه را اضافه و به خوبی با پیپتینگ بالا و پایین مخلوط شد. به ترتیب، ۱۰ میکرولیتر از استاندارد (EBV S1-5) به عنوان یک کنترل مثبت و ۱۰ میکرولیتر آب (آب، درجه PCR) به عنوان یک کنترل منفی استفاده شد. لوله‌های PCR را بسته و لوله‌های EBV به روتور انتقال داده شد.

پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی با به کار بردن قانون هاردی وینبرگ میزان فراوانی مورد انتظار و مشاهده شده محاسبه، و وارد محیط SPSS شد. از این نرم افزار برای پی بردن به میزان فراوانی هر یک از الگوهای متیلاسیون مورد مطالعه استفاده شد و میزان فراوانی مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تعداد الگوهای تغییر یافته در جامعه

یک DNA معین و استاندارد (مانند DNA مربوط به فاژ لامبدا با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که با آنزیم Hind III هضم گردیده است) بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شدند. برای این منظور ابتدا ژل ۰/۸ درصد ساخته شد. نمونه‌ها پس از بسته شدن ژل روی آن لود شدند و با ولتاژ ۹۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند. مقدار DNA هر نمونه از طریق مقایسه شدت فلورسنت نمونه با باندهای DNA استاندارد محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری میزان متیلاسیون ژنی از دستگاه مربوطه Eco Biosystems شرکت استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار 3 Primer طراحی و به وسیله شرکت بایونر، آلمان سنتز شد و با غلظت نهایی ۱۰۰ نانومتر استفاده گردید.

واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Eva green I انجام شد. رنگ Eva green (فرمانتان، فرانسه) طی واکنش Real-time PCR، (Polymerase chain reaction) به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرومول و بر اساس مقادیر نشان داده شد.

استخراج DNA ویروسی از نمونه‌های مورد مطالعه با به کارگیری کیت استخراج DNA ویروسی ساخت شرکت استراتک تحت لیسانس برند کیاژن به شماره کاتالوگ ۹۱۱۱۰۰۴ انجام شد. محاسبه تیترا ویروسی با به کارگیری کیت کمی MN آلمان به شماره کاتالوگ ۹۳۳۳۰۰۲ انجام شد.

۱۰ درصد لنفوسیت تهی و ۷/۵ درصد به صورت نامشخص بودند. جهت سنجش کمی DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و با اندازه‌گیری جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد. جهت سنجش صحت کیفیت DNA استخراجی، الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد انجام شد، که وجود باند مشخص یک دست نشان از کیفیت DNA استخراجی دارد.

بررسی تغییر الگوی متیلاسیون ژن TRADD بدون در نظر گرفتن نوع واریانت‌های درگیر با استفاده از روش اواگرین و مقایسه نقطه ذوب با درجه تفکیک بالا صورت گرفت. نمودار ۱ نقطه ذوب واکنش‌گرهای PCR را با دقت بسیار مناسب نشان می‌دهد. این دما مربوط به واکنش‌های PCR در مراحل مختلف پاتولوژیک لنفوم هوچکین است.

نمودار استاندارد نمونه‌های انجام شده در مراحل مختلف پاتولوژیک لنفوم هوچکین که با به‌کارگیری DNAهای مختلف با غلظت‌های متفاوت در ژن هدف TRADD برای تعیین صحت واکنش Real Time PCR. منحنی استاندارد آن ترسیم شده و نتایج حاصل نشان می‌دهد، صحت واکنش به دست آمده ۰/۹۶ است.

پس از به دست آمدن تغییرات متیلاسیون ژن TRADD در تمامی موارد مورد مطالعه، بیماران در دو گروه تقسیم شده و لود ویروسی EBV با به

مورد مطالعه از روش آنالیز واریانس استفاده شد. فرض صفر در آنالیز واریانس برابر بودن میانگین متغیر وابسته در تمام سطوح متغیر مستقل است. اگر سطح معنی‌داری آزمون کمتر از ۰/۰۵ باشد فرض صفر رد می‌شود. در جدول آنالیز واریانس مجموع مربع‌های تیمارها، درجات آزادی، میانگین مربع‌های، آماره F و سطح معنی‌داری آنالیز واریانس محاسبه شد.

یافته‌ها

در این مطالعه محدوده سنی افراد بین ۶۰ - ۲۸ بود که دارای میانگین سنی ۵۶/۲ بودند. بر اساس جنسیت میزان حضور ویروس اپشتین بار از ۸۰ نفر افراد مبتلا ۴۱ نفر مذکر (۵۱/۳ درصد) و ۳۹ نفر مؤنث (۴۸/۷ درصد) بودند. بر اساس مرحله‌بندی لنفوم افرادی که در مرحله ۱ قرار داشتند ۱۸/۸ درصد، در این مرحله سرطان در یک یا چند گره لنفی در یک گروه غدد لنفاوی هستند. افرادی که در مرحله ۲ بیماری قرار داشتند ۴۰ درصد، که سرطان دو یا چند گروه غدد لنفاوی در بالا یا زیر دیافراگم را در بر داشت افراد حاضر در مرحله ۳ بیماری، ۲۸/۸ درصد که سرطان یک یا چند گروه غدد لنفاوی در بالا و پایین دیافراگم را در بر داشت و افراد حاضر در مرحله ۴، ۱۲/۵ درصد بودند که سرطان تنها بالای شکم بالای ورید کلیوی را در برداشت. زیر تایپ‌های هیستولوژیکی مختلف لنفوم هوچکین شامل ۴۶/۳ درصد نودلار اسکلروزیس، ۲۵ درصد میکس سلولاریته، ۱۱/۳ درصد لنفوسیت غنی،

هیپومتیلاسیون در نمونه‌های دارای ویروس و فاقد ویروس به ترتیب ۳۸/۸ درصد و ۶۷/۵ درصد بوده و تغییر الگوی هایپومتیلاسیون در نمونه‌های دارای ویروس ۶۱/۲ درصد و فاقد ویروس ۳۲/۵ درصد بوده که با توجه به دیاگرام رسم شده که نشان دهنده تغییرات معنی‌داری در میزان افزایش الگوی هایپر متیلاسیون در گروه EBV مثبت بوده است.

برای ارزیابی اهمیت الگوی متیلاسیون ژن TRADD و مرحله‌بندی لنفوم هوچکین، جدول متقاطع پیوسته مابین مرحله‌بندی‌ها و نوع متیلاسیون ترسیم و با روش کای دو رابطه معنی‌داری آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد افزایش سهم متیلاسیون ژن TRADD در پیشرفت مرحله‌بندی بیماری دارای تأثیر مثبت است و این ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری بین متیلاسیون ژن TRADD و لنفوم هوچکین وجود دارد (p=.....). جدول ۴ و جدول ۵ نتایج حاصل را با تفکیک بیشتری نشان می‌دهد.

کارگیری کیت شرکت Genome diagnostic به شماره کاتالوگ ۹۱۱۱۰۰۴ مطالعه شد.

منحنی استاندارد مربوط به استانداردهای ۱ الی ۸ داخل کیت، طبق دستورالعمل پیشنهادی کیت، ترسیم و گزارش شد.

بعد از به دست آمدن منحنی استاندارد و محاسبه R2 و صحت واکنش، نمونه‌های استخراج شده ویروسی مورد مطالعه قرار گرفت. منحنی تکثیر PCR برای لوده‌های مختلف ویروسی مطابق نمودار ۳ می‌باشد. با به کارگیری منحنی استاندارد در نمونه‌های مورد مطالعه تعداد کپی نمونه‌ها بر اساس واحد استاندارد کپی به ازای هر سی سی به دست آمد.

با مقایسه تغییر الگوی متیلاسیون نسبی ژن TRADD در نمونه‌های توموری و دارای ویروس EBV نسبت به گروه کنترل با تغییر الگوی متیلاسیون نسبی ژن TRADD در نمونه‌های توموری و فاقد ویروس EBV نسبت به گروه کنترل مشخص شد که تغییر الگوی

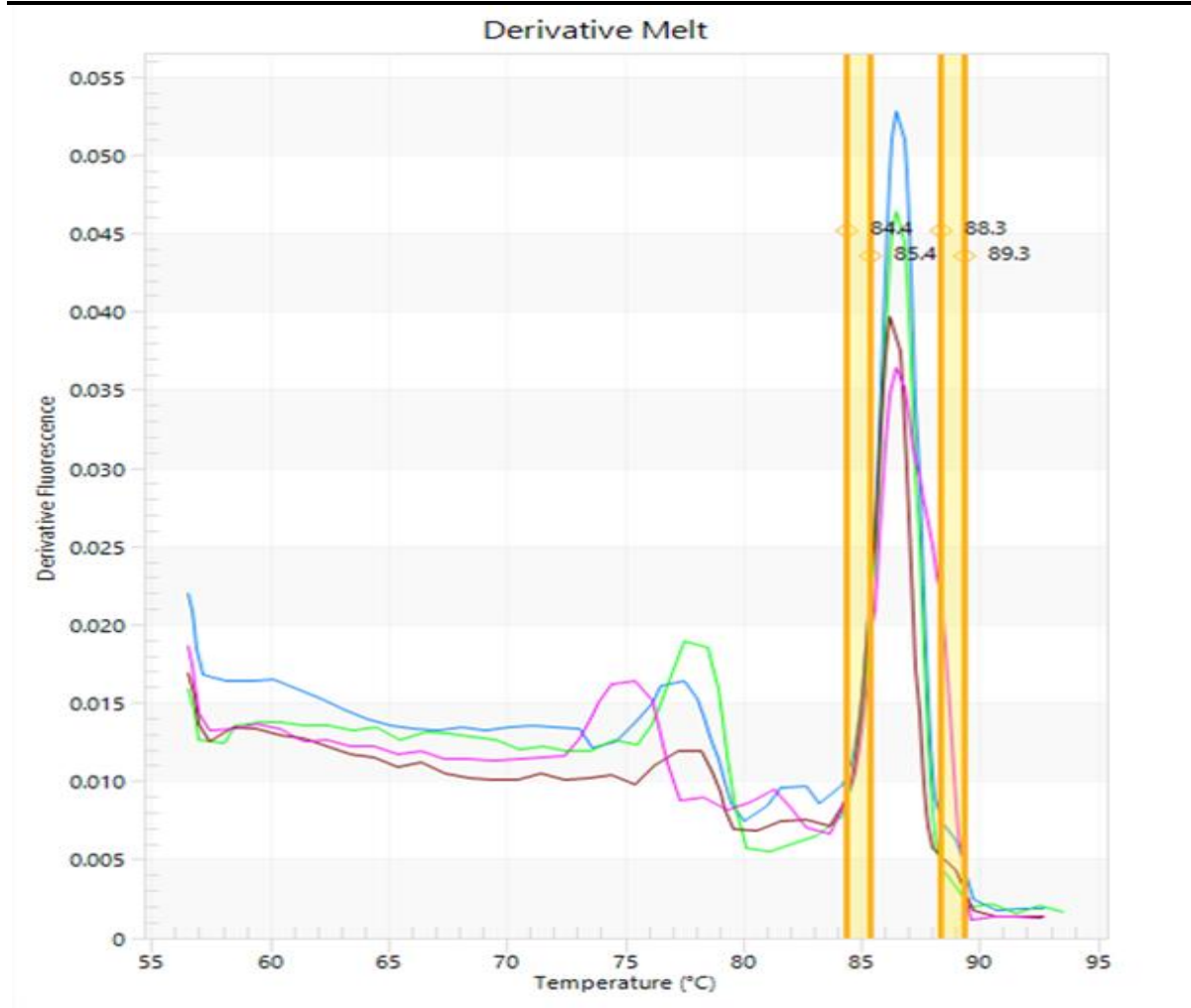
جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

منبع	اندازه (bp)	دمای اتصال	توالی پرایمر	Sequence
(۱۵)	۱۰۱	۵۹-۶۰	5'-ACAACAGAACGCTCACACCA-3'	Forward primer
			5'-TCCCTCTCGGTCGTATTCGT-3'	Reverse primer

جدول ۲: مشخصات ترکیب PCR

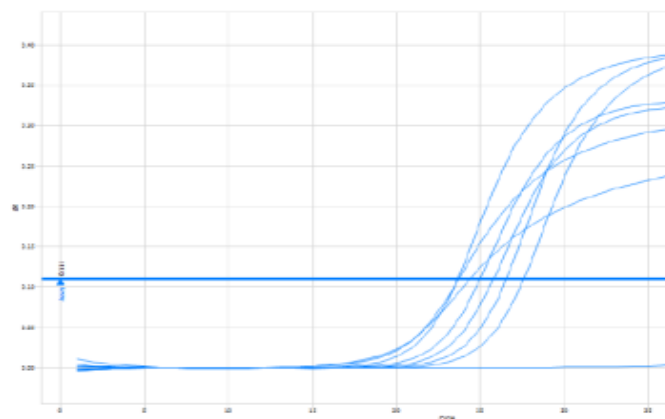
مقدار مواد بر حسب میکرومول	مواد مورد استفاده در PCR
۱۰	Eva green Real time PCR master mix
۰/۳	Forward primer (10pmo1/μl)
۰/۳	Reverse Primer (10pmo1/1μ)

DEPC treated water	۷/۴
DNA	۲

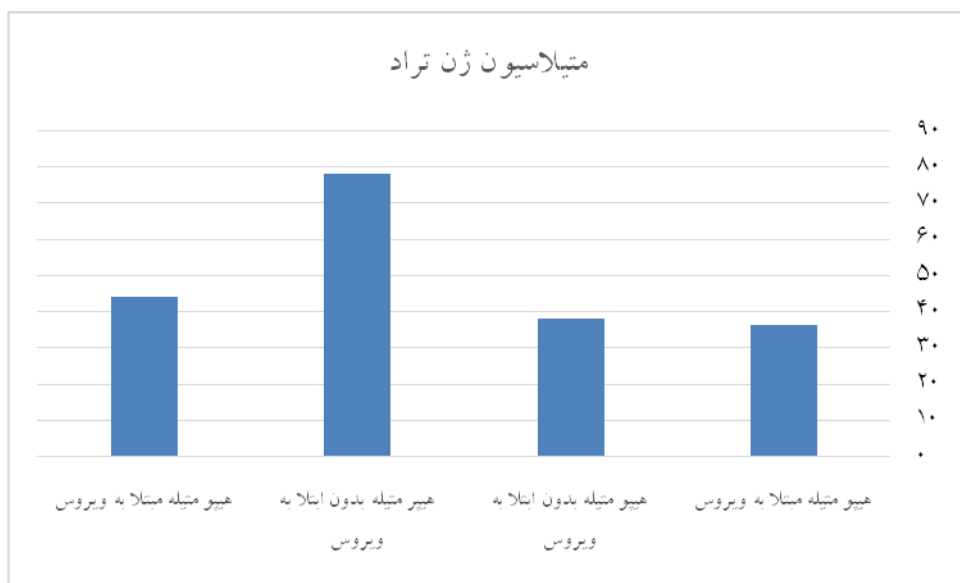


نمودار ۱: دمای مربوط به واکنش های PCR

Amplification Plot



نمودار ۲: تکثیر PCR برای لوده های مختلف ویروسی



نمودار ۳: دیاگرام تغییر الگوی متیلاسیون ژن TRADD در نمونه های توموری و حاشیه تومور در گروه های EBV مثبت و منفی

جدول ۳: تغییر الگوی متیلاسیون نسبی ژن TRADD در نمونه های توموری و دارای ویروس EBV به تفکیک مرحله بندی لنفوم هوچکین

زن تراد	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۴	کل
هیپو متیله	۳	۱۸	۸	۲	۳۱
هیپرمتیله	۱۲	۱۴	۱۵	۸	۴۹
کل	۱۵	۳۲	۲۳	۱۰	۸۰

جدول ۴: تست کای دو تغییر الگوی متیلاسیون نسبی ژن TRADD در نمونه های توموری و دارای ویروس EBV به تفکیک مرحله بندی لنفوم هوچکین

آزمون مربع کای		
مقدار	درجه آزادی	سطح معنی داری
۷,۹۸۵	۳	۰,۰۴۶
۸,۲۱۸	۳	۰,۰۴۲
۰,۲۰۹	۱	۰,۶۴۸

اگرچه اپشتن بار ویروس EBV در سلول های

بدخیم HRS رد اشترنبرگ که بخشی از بیماری

بحث

لمفومای هوچکین کلاسیک است حضور میابد، اینکه چگونه ویروس در پاتوژنز بیماری کمک کننده است همچنان مجهول باقی مانده است. واضح است که از مطالعات مربوط به سرطان های مرتبط با EBV که ویروس فقط برای ایجاد تومور کافی نبوده و سایر فاکتورهای انکوژنیک نیازمند است (۱۶). لذا هدف از این پژوهش بررسی الگوی متیلاسیون ژن TRADD در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین EBV مثبت است.

ویروس های سرطان زا حدود ۱۵-۱۰ درصد از کل سرطان های دنیا و حدود ۱/۳ میلیون سرطان در سال را شامل می شوند (۱۷). نقشی که ویروس ایشیتین - بار در بیماری لنفوم هوچکین دارد، هنوز به طور کامل مشخص نشده است. شواهدی از قبیل: افزایش خطر در افرادی که در گذشته به بیماری مونونوکلئوز عفونی مبتلا شده اند، افزایش تیترا آنتی بادی علیه آنتی کسپید ویروسی و همچنین اثبات حضور ویروس در سلول های بدخیم رید اشتربنرگ، ویروس ایشیتین بار را به لنفوم هوچکین مرتبط می کند (۱۸). چاتپاتاهی و همکاران طی مطالعه ای تحت عنوان، اتصال NPM-RAR به TRADD به صورت انتخابی باعث مهار فعال سازی کاسپاز و فعال سازی NF-KB و JNK می شود. آن ها مهار فعال سازی TNF (Tumor Necrosis Factor) را برای القای اپوپتوز پیشنهاد دادند. به پیشنهاد ایشان دو فاکتور NF-KB و JNK که باعث تحریک رشد و بقای سلول می شود. این یک مکانیزم جدیدی است که از طریق آن NPM-RAR به توسعه فنوتیپ لوسمی کمک می کند (۱۹) ایزومی و همکاران مشاهده کردند که پروتئین LMP1

ویروس ایشیتین بار با TRADD و پروتئین RIP (Receptor Interacting Protein) درگیر می شود، اما باعث القای مرگ سلولی نمی شود و یا نیازمند RIP برای فعال سازی NF-KB نمی باشد (۲۰). هرش و همکاران نشان دادند که CD30، یک عضو (TNFR)، به طور پیوسته به وسیله سلول های تومور لنفوم (ALCL) بیان می شود. تحریک CD30 موجب مرگ سلولی وابسته به کاسپاز سلول های عظیم ALCL در صورت مهار کانال NF-KB یا مهار پروتئازوم می شود (۲۱). دچانت و همکاران مطالعه ای تحت عنوان، غربالگری، شناسایی و تجزیه و تحلیل سه جهش جدید در ژن TRADD در بچه ها با ALL و AL-PS انجام دادند که در این مطالعه مشخص شد در ژن FADD (Fas-associated Porotein with death domain) هیچ تغییر ژنتیکی یافت نشده است. با این حال ۳ جهش جدید در ژن TRADD می تواند شناسایی شود. آن ها در منطقه ای شناخته شده از ژن TRADD واقع شده اند که به طور عمده اعمال کننده اثرات ضد مرگ سلولی هستند. عملکرد آنالیز سلول ها بیان بالای جهش TRADD، CDNA ثابت کرد که کاهش فعالیت NF-KB و در نتیجه افزایش مرگ سلولی نسبت به نوع تغییر نیافته TRADD را نشان می دهد. این نتایج در غالب مطالعه ایشان مشخص می کرد که جهش در ژن TRADD به توسعه مختلف هماتولوژیک کمک می کند. شناسایی جهش ها اثرات قابل توجهی بر TRADD دارند. به طور عمده سیگنالینگ و بقاء سلول ممکن نیست آسیب شناسی بیماری های مورد بررسی را شرح دهد. (۲۲). ایوپولوس

ویروس اپیشتن بار و القای بیان ژن سلولی انجام دادند که در این مطالعه، القاء بیان ژن سلولی به وسیله پروتئین LMP1 اپیشتین-بار مورد بررسی قرار گرفت. که نشان داد بیان LMP1 باعث افزایش فاکتور FAS و TRAF1 در سلول‌های B می‌شود. این نتایج در غالب مطالعه ایشان مشخص کرد که وقتی جهش LMP1(P204A/Q206A) اتفاق افتد LMP1 باعث ۶۰ درصد فعال سازی NF-kB می‌شود که باعث مهار مرگ سلولی می‌شود(۲۶). مطالعه حاضر نشان داد الگوی متیلاسیون ژن TRADD همراهی نزدیکی با عفونت‌های ویروسی EBV دارد و متیلاسیون ژن TRADD می‌تواند باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی گردد. به طوری که بیماران مبتلا به EBV در طول عمر خود می‌توانند تأثیر بیشتری از تغییر رفتار ژن TRADD بگیرند که آن می‌تواند منجر به بدرقتاری سلول‌های ایمنی و در نهایت لنفوم شود. پیشنهاد می‌شود مطالعه‌های تکمیلی بیشتری نظیر؛ NGS (Next Generation Sequencing) برای تأیید الگوی متیلاسیون در بیماران حاضر انجام شود و تأثیر قومیت و نژادهای مختلف ایران مورد ارزیابی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب می‌باشد. بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب قدردانی به عمل می‌آید.

و همکاران مطالعه‌ای تحت عنوان، بیان ژن به وسیله سلول‌های رد استرنبرگ؛ میانبرهای مرگ سلولی و فعال‌سازی انجام دادند که در این مطالعه مشخص شد حضور ویروس آنفولانزای اپیشتین بار(EBV) عفونت پروتئین(LMP1) تقریباً یک عامل ناکارآمد در فعال‌سازی تومور است(۲۳). مطالعه نربنوت و همکاران نشان داد اُنکو پروتئین LMP1 ویروس Epstein-Barr از فعال سازی پروموتورهای ویروسی یا سلولی بدون ایجاد سیتواستازی جلوگیری می‌کند، پروتئین LMP1 ویروس EBV برای ایمن‌سازی لنفوسیت‌های B انسان مورد نیاز است و به عنوان یک عضو پروتئینی فعال از خانواده TNF-receptor، از طریق به کارگیری TRAFها و مولکول‌های TRADD در دامنه ترمینال Carboxy آن، منجر به فعال شدن فاکتورهای NF-KB و AP1 می‌شود. در این مطالعه نربنوت و همکاران یک فعالیت مهار کننده جدید را که بر روی پروتئین‌های ویروسی یا سلولی مؤثر است، توصیف کردند، که نیاز به دامنه‌های پوشاننده غشایی ۳-۴ یا ۵-۶ دارد و با سیتواستازی و مرگ سلولی همراه نیست(۲۴). گلیسن و همکاران مطالعه‌ای تحت عنوان، بیان ژن از طریق سلول‌های رد استرنبرگ؛ مسیر آپوپتوز و فعال‌سازی انجام دادند که در این مطالعه مشخص شد، حالت فعال‌سازی و مقاومت به آپوپتوز سلول‌های رد استرنبرگ ممکن است به دلیل اختلال در ژن‌های این فرایند باشد(۲۵) دورن و همکاران در طی مطالعه‌ای تحت عنوان، نقش محل اتصال TRAF و فعال‌سازی NF-kB در پروتئین LMP1

REFERENCES

1. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, EL Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009 ;10: 321-2.
2. Chung PJ, Chang YS, Liang CL, Meng CL. Negative regulation of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-mediated functions by the bone morphogenetic protein receptor IA-binding protein, BRAM1. *J Biol Chem* 2002; 277(42): 39850-7.
3. Abadi RZ, Sistani NS, Mohtasham N, Hesari KK, Vaezi T, Pazouki M, et al. The prevalence of Epstein-Barr virus infection in head and neck non-Hodgkin's lymphomas in Khorasan, northeast of Iran. *J Pak Med Assoc* 2013 ; 63(7): 882-7.
4. ABE M. Hodgkin's lymphoma. *Nihon Rinsho* 2001; 59(7): 557-65
5. Naresh KN, Johnson J, Srinivas V, Soman CS, Saikia T, Advani SH, et al. Epstein—Barr virus association in classical Hodgkin's disease provides survival advantage to patients and correlates with higher expression of proliferation markers in Reed—Sternberg cells. *Ann Oncol* 2000; 11(1): 91-6.
6. Narbonnet S, Mariamé B. The Epstein—Barr virus oncoprotein LMP1 inhibits the activity of viral or cellular promoters without inducing cytostasis. *Virology* 2006; 350(2): 381-93.
7. Dhiab MB, Ziadi S, Saad H, Louhichi T, Trimeche M. Changing patterns in the Epstein-Barr virus(EBV) and Hodgkin lymphoma association in Tunisia. *Ann Hematol* 2016; 95(9): 1537-43.
8. Allday, Martin J. How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma?. *Seminars in Cancer Biology Vol* 2009; 19(6): 366-76.
9. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2006; 118(8): 1853-61.
10. Pobezinskaya YL, Liu Z. The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle* 2012;11(5): 871-6.
11. Viard-Leveugle I, Gaide O, Jankovic D, Feldmeyer I, Kerl K, Pickard CH, et al .TNF- α and IFN- γ are potential inducers of Fas-mediated keratinocyte apoptosis through activation of inducible nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol* 2013; 133(2): 489-98.
12. O'Brien V. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 1998; 79(8): 1833-45.
13. Hengartner MQ. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407 (6805): 770-6.
14. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: Apoptosis through mitochondrial dependent and -independent pathways. *Oncogene* 2001; 20(17): 2122-33.
15. Yong Xu, Xue Zheng M, Zhang L, GongX, Rou X, Zhen C, et al. Dynamic expression of death receptor adapter proteins tradd and fadd in Eimeria tenella-induced host cell apoptosis. *Poult Sci* 2017; 96: 1438–44.
16. Ikeda O, Miyasaka Y, Yoshida R, Mizushima A, Oritani K, Sekine Y, et al. BS69 cooperates with TRAF3 in the regulation of Epstein-Barr virus-derived LMP1/CTAR1-induced NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 2010; 584(5): 865-72.
17. Martin D, Gutkind JS. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 2009; 27(S2): S31.
18. Re D, Kuppers R, Diehl V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(26): 6379-86.
19. Chattopadhyay A, Abecassis I, Redner RL. NPM-RAR binding to TRADD selectively inhibits caspase activation, while allowing activation of NFkB and JNK. *Leuk Lymphoma* 2015; 56(12): 3401-6.
20. Izumi KM, Cahir McFarland ED, Ting AT, Riley EA, Seed B, Kieff ED. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 1999; 19(8): 5759-67.

- 21.Hirsch B, Von Der Wall E, Hummel M, Dürkop H. RIP1 expression is necessary for CD30-mediated cell death induction in anaplastic large-cell lymphoma cells. *Lab Invest* 2013; 93(6): 677-89.
- 22.Dechant MJ, Scheuerpflug CG, Pauly E, Van der Werff Ten Bosch J, et al. Screening, identification, and functional analysis of three novel missense mutations in the TRADD gene in children with ALL and ALPS. *Pediatric Blood & Cancer* 2008; 51(5): 616-20.
- 23.Eliopoulos AG, Waites ER, Blake SM, Davies C, Murray P, Young LS. TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J Virol* 2003; 77(2): 1316-28.
- 24.Narbonnet S, Mariamé B. The Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 inhibits the activity of viral or cellular promoters without inducing cytostasis. *Virology* 2006; 350(2): 381-93.
- 25.Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, Mürer A, Overkamp T, et al. Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* 2010;188(6): 851-62.
- 26.Devergne O, Cahir McFarland ED, Mosialos G, Izumi KM, Ware CF, Kieff E. Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol*. 1998;72(10):7900-8.

Study of *TRADD* Methylation Pattern in Patients with Hodgkin's Lymphoma EBV Positive

Ahmadi B¹, Ahmadi Zadeh Ch^{2*}

¹Department of Biology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran, ²Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Received: 21 Aug 2017

Accepted: 25 Dec 2017

Abstract

Background & aim: Epstein-Barr virus is one of the major causes of Hodgkin's lymphoma present in the Rhodestrenberg cells, which is part of classical Hodgkin's lymphoma. *TRADD* gene is an essential adapter for complex signaling and induction of apoptosis, necrosis, activation of NF-κB and MAP Kinase. The present study aimed to examine the methylation pattern of the *TRADD* gene in patients with Hodgkin's lymphoma EBV positive.

Methods: The present study was a case-control one. The case group included 80 patients with Hodgkin's lymphoma and the control group was the tumor margin in the case group. Spectrophotometry and electrophoresis on agarose gel were used to determine the quantity and quality of DNA. A change in the pattern of methylation of the *TRADD* gene was carried out using the EvaGreen method and a comparison of the high resolution melting point with HRM method. The collected data were analyzed using ANOVA.

Results: In the present study, subtypes were respectively 46.3%, 25%, 11.3%, 10% and 7.5% nodular sclerosis, cellular solid, rich lymphocyte, nonspecific lymphocyte and unspecified. Comparison of the transformation pattern of hypermethylation of *TRADD* gene in viral samples with non-viral samples was 61.3% and 32.5%, which indicated significant changes. Evaluation of the significance of *TRADD* methylation pattern by segmentation of lymphoma indicated a significant relation between T lymphoma, grade and different stages in presence of EBV virus ($P=0.046$).

Conclusion: The present study indicated that the methylation pattern of *TRADD* gene is closely related to EBV viral infections. EBV patients are highly affected by change in the behavior of the *TRADD* gene, which results in malpractice of immune cells, and ultimately lymphoma.

Keywords: Epstein-Barr virus, Hodgkin's disease, methylation, *TRADD*

Corresponding author: Ahmadi Zadeh CH, Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Ahmadi B, Ahmadi Zadeh CH. Study of *TRADD* Methylation Pattern in Patients with Hodgkin's Lymphoma EBV Positive. Armaghane-danesh 2019; 23(6): 778-791