ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۸، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۲(شماره پی در پی ۱۶۰)

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها، سطح متیلاسیون DNA و پروتئین ERβ در سلول‌های کومولوس زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز

الهام حسینی[۱]، مریم شاه‌حسینی[۲]، پروانه افشاریان[۲]، فرشته مهرآیین[۳]، مهناز اشرفی[۴]، رضا افلاطونیان[۳*]

[۱]گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران،[۲]گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران،[۳]گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران،[۴]گروه اندوکرینولوژی و ناباروری زنان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۲/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: در بین عوامل مهم تأثیرگذار در ناباروری زنان، اندومتریوز(با میزان شیوع تا ۵۰ درصد در زنان نابارور) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. اندومتریوز که به صورت حضور غدد و استرومای اندومتر خارج از بافت رحم شناخته می‌شود، باعث طیف وسیعی از اختلالات عملکردی در روند تکامل فولیکولی و تغییر در ریزمحیط فولیکولی می‌شود که در نهایت منجر به ایجاد تخمکی می‌گردد که از کیفیت مناسب جهت تشکیل جنین برخوردار نیست. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها، سطح متیلاسیون DNA و میزان پروتئین ERβ در ژنوم سلول‌های کومولوس زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز بود.

روش بررسی: این مطالعه، یک مطالعه موردـ شاهدی می‌باشد که در سال ۱۳۹۴ در کلینیک درمان ناباروری پژوهشگاه رویان انجام شد. تعداد ۲۴ بیمار در دو گروه مساوی تقسیم‌بندی شدند. سلول‌های کومولوس از ۱۲ بیمار نابارور مبتلا به اندومتریوز و ۱۲ خانم که علت ناباروری آنها فاکتور مردانه بود(به‌عنوان گروه کنترل) و تحت پروتکل‌های تحریک تخمک‌گذاری جهت تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم بودند، گرفته شد. استخراج کروماتین از سلول‌های کومولوس پس از تثبیت اتصال پروتئین‌های متصل به DNA و سپس لیز سلول‌ها و تهیه کروماتین محلول انجام شد. سطح اتصال و قرارگیری پروتئین MeCP2 (به عنوان مارک متیلاسیون DNA)، دو مارک اپی‌ژنتیکی مربوط به تغییرات هیستونی(H3K9me2 و H3K9ac) و پروتئین ERβ به کروماتین سلول‌های کومولوس، با استفاده از آنتی‌بادی‌های اولیه مربوطه، آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه و از طریق تکنیک Nucleosome-ELISA بررسی گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تی و لون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در گروه اندومتریوز، اتصال پروتئین MeCP2 به DNA در سطح معنی‌دار بالاتر از گروه کنترل بود. سطح دو مارک اپی‌ژنتیکی H3K9ac و H3K9me2 در کروماتین سلول‌های کومولوس گروه بیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد($p<۰/۰۵$). هم‌چنین سطح افزایش یافته‌ای از اتصال پروتئینERβ به ژنوم بیماران نیز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: تغییرات اپی‌ژنتیکی از نوع هیپراستیلاسیون و هیپرمتیلاسیون در سطح هیستون‌ها و هیپرمتیلاسیون DNA کل ژنوم سلول‌های کومولوس بیماران نابارور مبتلا به اندومتریوز، همراه با افزایش سطح اتصال پروتئین ERβ رخ داده است.

واژه‌های کلیدی: هیستون، متیلاسیون، استیلاسیون، رسپتور بتای استروژن، سلول کومولوس، اندومتریوز

* **نویسنده مسئول: رضا افلاطونیان،** تهران، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، گروه اندوکرینولوژی و ناباروری زنان

Email: R.aflatoonian@royaninstitute.org

مقدمه

اندومتریوز نوعی بیماری خوش‌خیم شایع زنانه است که به صورت حضور غدد و استرومای اندومتر خارج از بافت رحم شناخته می‌شود و با درد لگنی و ناباروری همراه است. شیوع کلی بیماری اندومتریوز در زنان در سنین باروری حدود ۱۰_۶ درصد، در حالی که شیوع آن در زنان نابارور حدود ۵۰-۳۵ درصد است(۱). علت این بیماری هنوز به درستی شناخته نشده است و در مورد نحوه ایجاد اندومتریوز، فرضیه‌ای که مورد قبول همگان باشد وجود ندارد و پاتوژنز آن تقریبا ناشناخته است. اخیراً با کمک بررسی‌هایی که با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مولکولی و ژنتیک نوین انجام گرفته است، شناخت تازه‌ای حاصل شده است که به تعریف بهتر مکانیسم‌های ایجاد کننده این بیماری و عواقب بالینی آن کمک می‌کند. پژوهش‌هایی که در مورد عملکرد ایمنی، ژنتیک و اپی‌ژنتیک زنان مبتلا به اندومتریوز صورت می‌گیرند، کم کم جنبه‌های مبهم این بیماری را آشکار خواهند کرد، به طوری که مشخص شده است که این بیماری هم قابلیت ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیکی در بافت‌های مختلف را دارد و هم تغییرات اپی‌ژنتیکی به عنوان مکانیسم کلیدی در پاتوژنز آن نقش بسزایی دارند(۳ و۲). شاید بخش مهمی از شواهدی که نشان دهنده منشاء اپی‌ژنتیکی اندومتریوز بوده، از مطالعه وو و همکاران آغاز شده باشد. در این مطالعه نشان داده شد که بیان ژنی سه آنزیم متیل ترانسفراز دخیل در مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی (متیل ترانسفراز ۱، متیل ترانسفراز A۳ و متیل ترانسفراز B۳) به طور چشم‌گیری در بیماران اندومتریوز افزایش می‌یابد و بیان کردند که تغییرات اپی‌ژنتیک به عنوان مکانیسم اصلی برای از بین رفتن تنظیم ژن عمل می‌کنند و ممکن است در بیماری‌زایی اندومتریوز هم نقش داشته باشد(۴). برخلاف تغییرات ژنتیکی، تغییرات اپی‌ژنتیکی به صورت تدریجی رخ می‌دهند که در نهایت باعث خاموش یا روشن شدن بعضی ژن‌های ویژه می‌گردند. فاکتورهای متعددی از جمله سن، رژیم غذایی، التهاب‌های مزمن و محیط) باعث القاء تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌شوند. با توجه به این که اندومتریوز یک بیماری التهابی مزمن است، ممکن است این امر باعث تغییر در متیلاسیون DNA نیز گردد(۵). [1]

در مورد این بیماری تغییرات اپی‌ژنتیکی متعددی تاکنون در ژن‌های مختلف با عملکردهای متنوع از جمله؛ تکثیر سلولی، پاسخ های التهابی، پاسخ ایمنی، رگزایی و پاسخ هورمونی استروئیدی در بافت اندومتر گزارش شده است. هم‌چنین هایپرمتیلاسیون DNA در ژن‌های رسپتور پروژسترون(PR-B)[1]، کادهرین E ، هاکس A10 و هیپومتیلاسیون (ER-b)[2]، فاکتور استروئیدوژنیک ۱ و آروماتاز گزارش گردیده است(۸-۶ و۳). کاهش آنزیم هیستون‌داستیلاز (HDAC3)[3] و بیان بیش ازحد کلاژن نوع I در آندومتر یوتوپیک بیماران اندومتریوز باعث نقص در فرآیند دسیدوآئی شدن اندومتر از طریق

1- Progesterone Receptor B (PR-B)
2-Estrogen Receptor(ER-b)
3-Histone Deacetylase(HDAC3)

فعال‌سازی رونویسی نابجا ژن‌های Col1a1 و Col1a2 در موش و ژن‌های COL1A1 و COL1A2 در انسان می‌شود(۹).

از طرفی با توجه به این که اندومتریوز نوعی بیماری وابسته به استروژن است، بررسی مسیرهای سیگنالینگ ژن‌های ویژه مسیر بیوسنتز استروژن و تحقیق درباره‌ی الگو و علت تغییرات این ژن‌ها می‌تواند فهم بهتری از عوامل مؤثر در ناباروری این افراد را ایجاد کند. استروژن در ایجاد شرایط بهینه جهت فولیکوژنز و تولید تخمکی که قابلیت لقاح و تشکیل جنین داشته باشد نقش کلیدی ایفا می‌کند. اثرات استروژن از طریق اتصال به رسپتورهای آن صورت می‌گیرد. رسپتورهای استروژن از نوع رسپتورهای هسته‌ای[۱] هستند که به عنوان فاکتورهای رونویسی عمل می‌کنند و به دو فرم وجود دارند، رسپتور استروژن آلفا(ERα)[۲] و رسپتور استروژن بتا(ERβ)[۳]. مقدار ERβ به عنوان رسپتور استروژن در بافت اندومتریوزی نسبت به اندومتر طبیعی حدود صد برابر بیشتر است و این مساله با هیپومتیلاسیون جزایر CpG در ناحیه‌ی پروموتری این ژن همراه است که سبب می‌شود این گیرنده به مقدار بسیار زیادی تولید گردد. بنابراین تنظیم اپی‌ژنتیکی نقش مهمی در پاسخ‌های طبیعی هورمون‌های استروئیدی اندومتر دارد که می‌تواند بر عملکرد آن تأثیر بگذارد(۱۰). در سلول‌های استرومایی اندومتریوزی، ناحیه پروموتری ERβ را اشغال کرده و فعالیت آن را سرکوب می‌کند و سبب می‌شود مقادیر زیادی از ERβ به ناحیه پروموتری رسپتور پروژسترون متصل شده و سبب تنظیم کاهشی بروز این رسپتور گردد(۱۱). هم‌چنین ERβ نقش مهمی در عملکرد تخمدانی دارد به طوری که تغییر در بیان یا فعالیت آن ممکن است عواقب کلینیکی داشته باشد که نتیجه آن می‌تواند باعث ناباروری، کاهش رشد فولیکولی و کاهش میزان تخمک‌گذاری می‌گردد. ERβ بعد از القاء سلول‌های گرانولوزا به وسیله استروژن، بر روی پروموتر ژن‌های هدف خود(که طیف وسیعی از ژن‌ها هستند به عنوان مثال ژن‌های آروماتاز و اکتیوین بتا A) قرار گرفته و باعث تغییر در فعالیت آنها می‌شود.[۱]

این داده‌ها بینشی در مورد برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیک و عملکرد هورمون‌های استروئیدی در آندومتر ارایه می‌کنند که به پاتوژنز و پاتوفیزیولوژی آندومتریوز کمک می‌کند(۵ و۳). با وجود پژوهش‌های وسیع صورت گرفته بر روی اندومتر بیماران اندومتریوز، تاکنون پژوهش‌های معدودی اثرات اندومتریوز را بر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی در سلول‌های تخمدانی به ویژه کومولوس بررسی کرده‌اند.

با توجه به این که تغییرات نوکلئوزوم، بخشی از مکانیسم‌های مولکولی اپی‌ژنتیکی است که می‌تواند رونویسی DNA وابسته به آن را تحت تأثیر قرار دهد، استفاده از روش نوکلئوزوم الایزا می‌تواند جهت بررسی کمّی تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها و

1-Nuclear Receptor
2-Estrogen Receptor α(ERα)
3-Estrogen Receptor β(ERβ)

شاخص‌های اپی‌ژنتیکی مرتبط با آنها در ژنوم مورد استفاده قرار گیرد(۱۲). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها، سطح متیلاسیون DNA و میزان پروتئین ERβ در ژنوم سلول‌های کومولوس زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز بود.

روش بررسی

این مطالعه، یک مطالعه مورد- شاهدی می‌باشد که در سال ۱۳۹۴ بر روی زنان نابارور ۱۸ تا ۳۶ سال مراجعه‌کننده به کلینیک درمان ناباروری پژوهشگاه رویان که وارد سیکل‌های ART گردیده‌اند، انجام و به وسیله کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران و پژوهشگاه رویان مورد تایید قرار گرفت. با توجه به اهداف مورد نظر در این پژوهش، تعداد ۲۴ بیمار در دو گروه تقسیم‌بندی گردیدند. حجم نمونه مورد نیاز در هر گروه، ۱۲ نفر بوده: بدین ترتیب که در گروه بیماران ۱۲ نمونه بیمار مبتلا به اندومتریوز و گروه کنترل ۱۲ نمونه مربوط به زنان سالمی که جهت اهداء جنین یا تخمک مراجعه می‌کنند و یا زنان با فاکتور لوله‌ای وارد مطالعه گردیدند. فلوچارت انتخاب بیماران در گروه اندومتریوز و گروه کنترل در شکل ۱ نمایش داده شده است.

بیماران تحت تحریک تخمدان[۱] با استفاده از پروتکل آگونیستGnRH قرار گرفتند. نحوه درمان بدین صورت بود که از روز ۱۹-۱۷ سیکل قبل، روزانه میزان ۵۰۰ میکروگرم GnRHa زیر جلدی دریافت کرده و بعد از دو هفته تجویز و مهار تخمدان (endometrial thickness<5 mm and serum estradiol level<50 pg/ml)، میزان GnRHa به نصف کاهش یافته و تحریک تخمدان با استفاده از r-FSH (gonal-F, Merk Serono, Switzerland) با دوز IU 225-150 آغاز گردید. بعد از مشاهده حداقل دو عدد فولیکول غالب بزرگتر از ۱۸ میلی‌متر، 10,000IU hCG (Choriomon, IBSA, Lugano, Switzerland) به صورت عضلانی جهت القای تخمک‌گذاری تزریق شده و بعد از ۳۶-۳۴ ساعت تخمک‌گیری به صورت واژینال انجام گردید(۱۳).[۱]

دریافت تخمک ۳۸-۳۶ ساعت بعد از تزریق hCG انجام گرفت. مایع فولیکولی از فولیکول‌ها تخلیه و به پتری‌دیش منتقل شده، کمپلکس تخمک - کومولوس(COC)[۲] جدا گردیده و در انکوباتور با CO2 برابر ۶ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا زمان تزریق اسپرم نگهداری شدند. قبل از انجام تزریق درون‌سیتوپلاسمی اسپرم، تخمک‌ها به طور مختصر در معرض آنزیم هیالورونیداز قرار گرفته تا سلول‌های کومولوس از آنها جدا گردد. سلول‌های کومولوس جهت آنالیزهای بعدی ابتدا دو مرتبه در محیط کشت فاقد آنزیم و دو مرتبه با PBS سرد شستشو و سانتریفوژ گردیدند.

به وسیله نوکلئوزوم الیزا[۳]، سطح کلی متیلاسیون DNA با کمک پروتئین باند شونده به ناحیه Cpg[۴] (به عنوان مارک متیلاسیون DNA)، دو مارک اپی‌ژنتیکی مربوط به تغییرات هیستونی(H3K9me2 و H3K9ac) و هم‌چنین میزان حضور پروتئین ERβ در کروماتین سلول‌های کومولوس جدا شده از بیماران

1-Controlled Ovarian Hyperstimulation(COH)
2-Cumulus-Oocyte Complex
3-Nucleosome ELISA
4-Methyl-Cpg-Binding Protein (MeCP2)

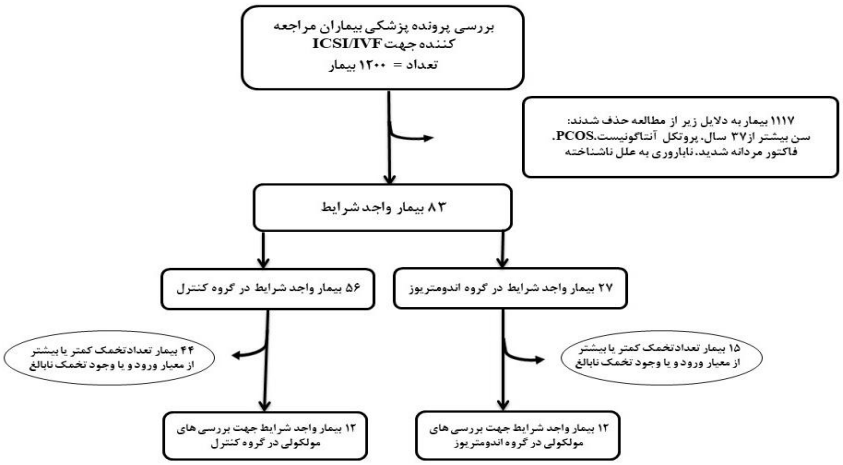
اندومتریوز در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

روش انجام تکنیک نوکلئوزوم الایزا، رسوب سلولی در مرحله پیشین بافر کامل که شامل بافر لیزکننده سلولی و مهارکننده پروتئاز جهت جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها بود، اضافه شد. سپس به‌منظور خردکردن کروماتین، نمونه‌ها به مدت ۱۲ سیکل(۳۰ثانیه روشن ـ۳۰ ثانیه خاموش) در وضعیت بالاترین درجه دستگاه سونیکاتور قرار داده شدند. سونیکاسیون موجب خرد شدن کروماتین می‌شود، ولی پروتئین‌های اتصال یافته به کروماتین هم‌چنان متصل به DNA باقی می‌مانند.

سپس جذب DNA دورشته‌ای کروماتین خردشده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ۲۰۰۰ اندازه‌گیری و به هر چاهک پلیت معادل ۴۰۰۰ نانوگرم کروماتین و بافر پوشش دهنده افزوده شد. نمونه مربوط به هر گروه بیمار، در دو چاهک(double) ریخته شد. برای به دست آوردن زمینه درچند چاهک هیچ DNAای ریخته نشد و به عنوان نمونه کنترل یا بدون آنتی‌ژن در نظر گرفته شد، پلیت‌ها یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس آنتی‌بادی‌های اولیه و آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه با HRP افزوده شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه Multiskan spectrum ELISA-Reader خوانده شد.

برای استاندارد نمودن داده‌ها، تفاضل OD هر آنتی‌بادی و Background آن محاسبه گردید. برای نرمال نمودن داده‌ها، میانگین استاندارد هر آنتی‌بادی بر میانگین استاندارد آنتی‌بادی H1 که صرف نظر از نوع مارک اپی‌ژنتیکی فقط نوکلئوزوم را تشخیص می‌داد، تقسیم شد. در نهایت از اعداد حاصل از دو تکرار بیولوژیکی میانگین گرفته شد و به صورت نمودار ارایه شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری تی‌تست، تی مستقل و لون تجزیه و تحلیل شدند.



شکل ۱: فلوچارت انتخاب بیماران در گروه اندومتریوز و گروه کنترل

یافته‌ها

اطلاعات دموگرافی و مشخصات بالینی بیماران اندومتریوز و گروه کنترل در جدول ۱ ارایه شده است. از نظر سن، BMI، سطح FSH یا LH و روزهای تحریک تخمدان اختلاف معنی‌داری میان دو گروه وجود نداشت، ولی دوز تام گنادوتروپین و جنین‌های با کیفیت بد در بیماران اندومتریوز به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. حداقل یک ناهنجاری مورفولوژیک به ترتیب در ۴۱/۷۴ درصد (۴۳/۱۰۶) و ۶۷/۷۴ درصد (۶۳/۹۳) از تخمک‌های جمع‌آوری شده از بیماران شاهد و آندومتریوز مشاهده شد.

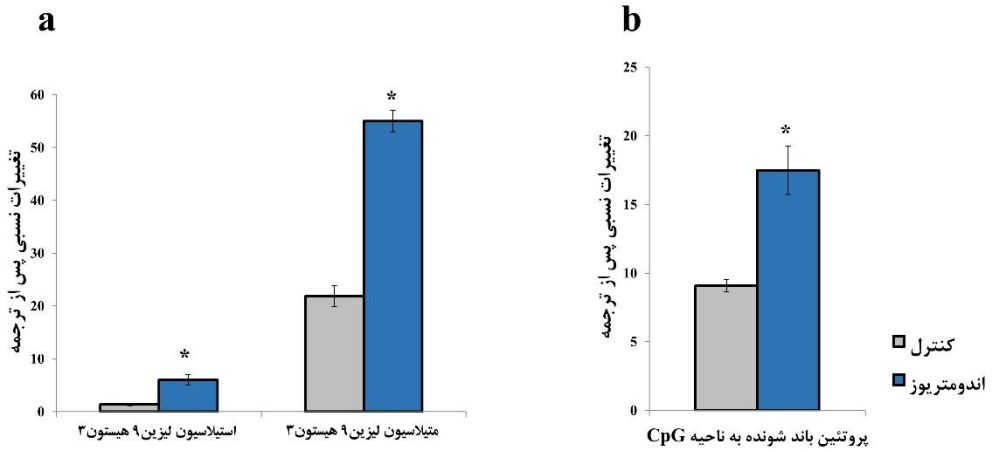
شکل **۲**[a] نتایج بررسی کمّی مارک‌های اپی‌ژنتیکی استیلاسیون لیزین۹ هیستون۳ و متیلاسیون لیزین۹ هیستون۳ در کروماتین تهیه شده از سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. سطح مارک اپی‌ژنتیکی لیزین۹ هیستون در سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد(p=۰/۰۴). هم‌چنین میزان حضور پروتئین متیلاسیون لیزین۹ هیستون۳ در سلول‌های کومولوس این بیماران نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد(p=۰/۰۱). سطح اتصال پروتئین باند شونده به ناحیه CpG در بیماران اندومتریوز نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد (p=۰/۰۳)(شکل **۲**[b]) که این می‌تواند مبنی بر افزایش میزان متیلاسیون DNA در سلول‌های کومولوس این بیماران باشد.

نتایج مقایسه‌ی کمّی میزان حضور پروتئین ERβ در کروماتین تهیه شده از سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز با گروه کنترل(شکل ۳) نشان داد که سطح اتصال پروتئین ERβ در سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت (p=۰/۰۱).

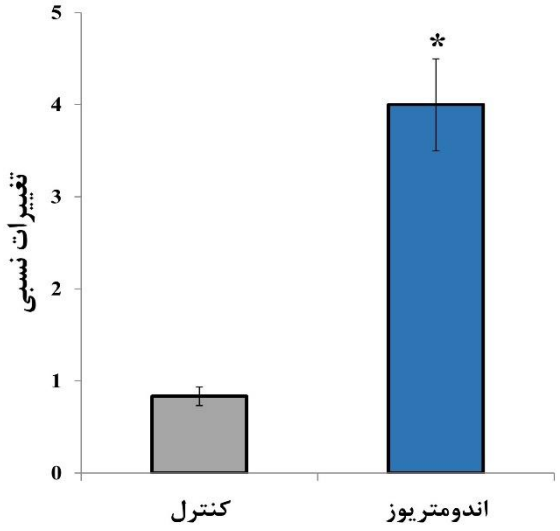
نتایج مطالعه به صورت شماتیک در شکل ۴ نمایش داده شده است. در گروه اندومتریوز نسبت به گروه کنترل افزایش مارک‌های اپی‌ژنتیکی استیلاسیون لیزین۹ هیستون۳ و متیلاسیون لیزین۹ هیستون ۳ و حضور پروتئین ERβ را نشان می‌دهد.

جدول ۱: اطلاعات دموگرافیک و بالینی گروه اندومتریوز و کنترل

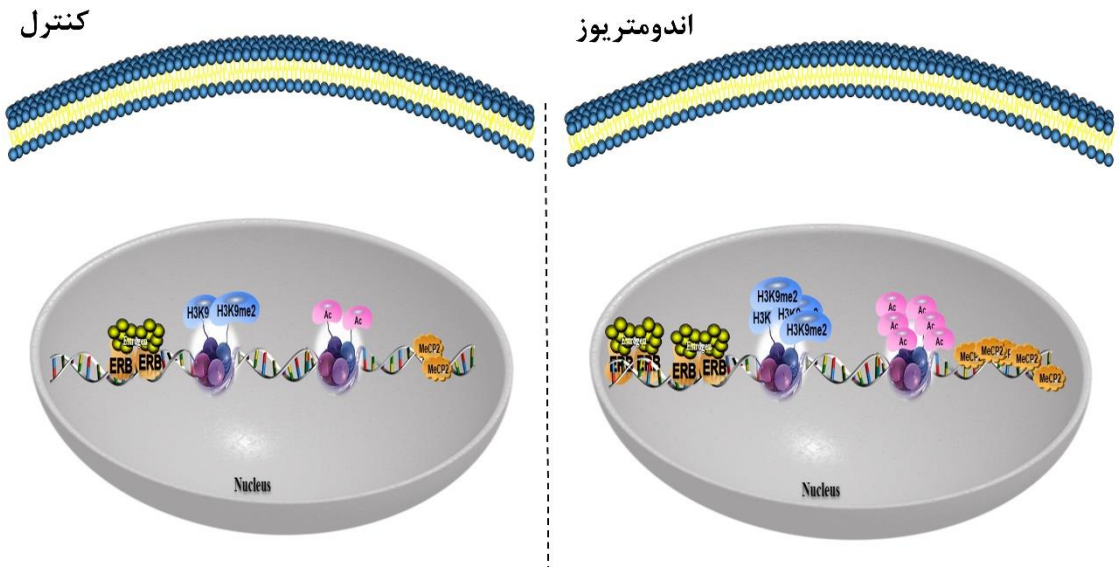
متغیر	کنترل (تعداد ۱۲)	اندومتریوز (تعداد ۱۲)	سطح معنی‌داری
سن (سال)	۳۱/۵۸± ۳/۴۷	۳۱/۶۶ ± ۳/۵۲	NS
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر متر مربع)	۲۵/۱ ±۳/۵	۲۴/۹۹± ۳/۰۳	NS
هورمون لوتئینه کننده (واحد بین المللی/لیتر)	۷/۶۳± ۱/۸	۸/۷ ±۲/۱	NS
هورمون محرک فولیکولی (واحد بین المللی/لیتر)	۸/۳۲± ۲/۳	۹/۵۲ ±۲/۵	NS
آنتی مولرین هورمون (نانوگرم/میلی لیتر)	۱/۵± ۰/۴۲	۱/۲ ±۰/۳۴	NS
تعداد فولیکول آنترال (تعداد)	۱۰/۴۱ ±۳/۵	۸/۹۱± ۱/۵	NS
مدت تحریک تخمک‌گذاری(روز)	۱۰/۵± ۱/۷۳	۱۰/۹۱± ۱/۸۳	NS
دوز کل گنادوتروپین (IU)	۱۹۸۹± ۴۱۱	۲۹۸۷± ۱۱۵۶	۰/۰۱
تعدادکل تخمک‌ها	۱۰۶	۹۳	NS
میانگین تعداد تخمک‌ها	۸/۸۳ ±۴/۴۶	۷/۷۵± ۱/۶۵	NS
درصدتخمک ناهنجار(٪)	۴۱/۷۴	۶۷/۷۴	۰/۰۴
تعداد جنین با کیفیت‌خوب	۵/۴۱± ۲/۴	۳/۲۵± ۲/+۰۹	۰/۰۲
تعداد جنین با کیفیت‌بد	۱/۲۵± ۱/۴۲	۲/۸۳± ۱/۵۲	۰/۰۱



شکل ۲: a: سطح مارک‌های اپی‌ژنتیکی H3K9ac **و** H3K9me2 **در کروماتین سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز و گروه کنترل. b: حضور متفاوت مارک اپی‌ژنتیکی** MeCP2 **در کروماتین سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز در مقایسه با گروه کنترل.**



شکل ۳: حضور متفاوت Estrogen Receptor β **در کروماتین سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز و گروه کنترل**



شکل۴: شکل شماتیک تغییرات اپی‌ژنتیکی در سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز در مقایسه با گروه کنترل

بحث

اندومتریوز باعث طیف وسیعی از اختلالات عملکردی در روند تکامل فولیکولی و تغییر در ریزمحیط فولیکولی می‌شود که در نهایت منجر به ایجاد تخمکی می‌گردد که از کیفیت مناسب جهت تشکیل جنین برخوردار نیست، ولی علت این تغییرات به درستی مشخص نیست(۱۴)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها، سطح متیلاسیون DNA و میزان پروتئین ERβ در ژنوم سلول‌های کومولوس زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز دچار تغییرات اپی‌ژنتیکی معنی‌دار از نوع هیپراستیلاسیون و هیپرمتیلاسیون هیستون‌ها و هیپرمتیلاسیون DNA در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل گردیده‌اند. همچنین سطح اتصال پروتئین ERβ به نواحی کروماتینی سلول‌های کومولوس که به عنوان یک عامل رونویسی مهم عمل می‌کند افزایش معنی‌داری نشان داد.

در بین عوامل مهم تأثیرگذار در ناباروری زنان، اندومتریوز(با میزان شیوع تا ۵۰ درصد در زنان نابارور) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. این بیماری باعث طیف وسیعی از اختلالات عملکردی در روند تکامل فولیکولی و تغییر در ریزمحیط فولیکولی می‌شود که در نهایت منجر به ایجاد تخمکی می‌گردد که از کیفیت مناسب جهت تشکیل جنین برخوردار نیست. مشکلات تخمدانی به همراه کاهش پذیرش اندومتر در زنان با سابقه ناباروری که تشخیص اندومتریوز در آنها محرز گردیده است، سبب کاهش میزان باروری می‌گردد(۱۶ و ۱۵).

با وجود پژوهش‌های وسیع صورت گرفته بر روی پروفایل بیان ژنی اندومتر بیماران اندومتریوز و

ارتباط آن با تغییرات اپی‌ژنتیکی، تاکنون پژوهش‌های معدودی ارتباط اندومتریوز را با مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی در سلول‌های تخمدانی به ویژه کومولوس و گرانولوزا بررسی کرده‌اند. در یکی از این بررسی‌ها که به وسیله باومن و همکاران بر روی تخمدان مدل اندومتریوز بابون[۱] صورت گرفت، تغییرات وسیع در پروفایل اپی‌ژنتیکی و هم‌چنین بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای اپی‌ژنتیکی که باعث تغییر شکل[۲] کروماتینی می‌شوند، را نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر تغییرات اپی‌ژنتیکی رخ داده در نواحی تنظیمی برخی ژن‌های مهم دخیل در مسیرهای سیگنالینگ رسپتورهای هسته‌ای و هم‌چنین در مسیرهای مربوط به حفظ پرتوانی[۳] جنین را عامل مهمی در کاهش کیفیت تخمک و هم‌چنین در مکانیسم‌های ناباروری وابسته به اندومتریوز اعلام کردند(۱۷). علاوه بر این اندومتریوز باعث افزایش متیلاسیون ناحیه پروموتری ژن رسپتور آندروژن(AR)[۴] در سلول‌های گرانولوزا می‌گردد که این تغییر منجر به اختلال در بیان AR و متعاقب آن رسپتور هورمون محرک فولیکولی شود(FSHR)[۵] می‌شود. در نهایت اثرات متقابل این دو عامل مهم که لازمه تکامل نرمال فولیکول به سمت مرحله آنترال است، در تخمدان بیماران اندومتریوز دچار اختلال می‌شود(۴).

دو مکانیسم اپی‌ژنتیکی مهم، متیلاسیون DNA و تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها، بیان ژن را بدون تغییر توالی ژن، تنظیم و کنترل می‌کنند.

متیلاسیون DNA شناخته شده‌ترین مارک اپی‌ژنتیک به شمار می‌رود، هنگامی که جزایر CpG ناحیه پروموتر یک ژن فاقد متیلاسیون بوده و فاکتورهای نسخه‌برداری مناسب به آن دسترسی دارند، بیان ژن میسر می‌شود. در مقابل، متیلاسیون جزایر CpG، با ساختار بسته کروماتین و در نتیجه عدم نسخه‌برداری ژن‌های مربوطه همراه است. در مطالعه حاضر، نتایج بررسی متیلاسیون DNA به کمک MeCP2 که قادر به اتصال به نواحی متیله شده DNA است، نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان حضور این پروتئین(به صورت افزایشی) در ژنوم بیماران اندومتریوز نسبت به گروه کنترل وجود دارد. متیلاسیون DNA از طریق متیل‌ترانسفرازها(DNMTs) کاتالیز می‌شود. از آن جایی که DNMTs مسئول آغاز و یا پایداری الگوی متیلاسیون ژنومی می‌باشند، محتمل است که تغییر در بیان آنها، باعث تغییرات وسیع در الگوی متیلاسیون در افراد اندومتریوز گردد(۱۸).[۱] از طرفی خانواده‌ای از پروتئین‌ها شناسایی شده‌اند که به طور اختصاصی به نواحی متیله شده DNA اتصال می‌یابند. این پروتئین‌ها را تحت نام کلی .پروتئین‌های متصل شونده به DNA متیله (MBD)[۶] می‌نامند. پروتئین باند شونده به ناحیه Cpg (MeCP2)[۷] اولین عضو شناخته‌شده این خانواده است که به طور اختصاصی ترادف‌های متیله‌ی DNA را شناسایی کرده و متصل می‌گردد و می‌تواند باعث

1-Baboon Endometriosis Model
2-Remodeling
3-Pluripotency
4-Androgen Receptor
5- Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR)
6-Methylated DNA Binding Protein Family(MBD)
7-Methyl-Cpg-Binding Protein 2(MeCP2)

مهـار ژن گـردد، بـدین صـورت کـه ایـن پـروتئین بـا شناسـایی نـواحی متیلـه DNA(حتـی در سـطح یـک نوکلئوتید) و اتصال به آنها، سبب تغییـرات سـاختاری در اسـیدهای آمینـه هیسـتون‌ها و فشـرده شـدن کرومـاتین می‌شـود و یـا باعـث فراخـوانی هیستون‌داسـتیلازها بـه نـواحی متیلـه DNA می‌شـود. آنزیم‌هـای هیستون‌داسـتیلاز باعـث داسـتیله شـدن باقیمانده‌های لیزین[1] دم‌های هیسـتونی می‌گردنـد، کـه این تغییرات منجر به مهار بیشـتر ژن می‌شـود. چـون متیلاسیون DNA با تغییرات کروماتین ارتبـاط نزدیکـی دارد، بیان نادرست این آنـزیم‌هـا، عـلاوه بـر مـارکری جهت تغییرات سطح متیلاسیون، می تواند نشان دهنده تغییرات اپی‌ژنتیکی دیگر در اندومتریوز نیـز باشـد(۲۰ و ۱۹، ۶). اخیراً مشـخص شـده اسـت کـه از الگوهـای متیلاسیون DNA می توان برای پیش‌بینی سن سـلول‌ها با دقت بالا استفاده کرد(۲۱). مطالعه جالبی کـه جهـت بررسی سـن بـاروری از تحلیـل میـزان متیلاسـیون DNA سلول‌های گرانولوزا استفاده کرده بـود، نشـان داد که می توان با بررسی سـطح متیلاسـیون و سـن اپی‌ژنتیکی و ارتباط آن با مارکرهای ذخیره تخمـدان، سـن بـاروری فـرد را تخمـین زد (۲۲). هم‌چنـین سـلول‌های فولیکـولی نسـبت بـه سـایر سـلول‌های سوماتیک با افزایش سن، مسیر متیلاسیون متفـاوتی را دنبال می‌کنند و عملکرد آنها تحت تأثیر سـن قـرار می گیرد(۲۳).

تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌های هیسـتونی نیز یکی دیگر از تغییرات اپی‌ژنتیکی است کـه می‌توانـد بیان ژن را تغییر دهد. این تغییرات شیمیایی با افـزوده شدن یک گروه شیمیایی به اسیدهای آمینه ویـژه‌ای در ساختار پروتئین‌ها رخ می‌دهـد. بسـته بـه ماهیـت ایـن تغییرات، تأثیر نهایی آنها ممکن است فعال شدن ژن(بـا افزایش دسترسی نواحی فعال کننده رونویسی بـه ژن) و یـا خـاموش شـدن ژن(بـا ایجـاد حالـت متـراکم در کروماتین و عدم دسترسی نـواحی رونویسـی بـه ژن) باشد. معمولاً متیلاسیون و داستیلاسیون هیسـتون‌هـا باعث فشرده‌ترشدن کروماتین و شکل‌گیـری سـاختار هتروکروماتینی شده و به خاموشی ژن می‌انجامـد. در مقابل استیلاسیون و دمتیلاسـیون هیسـتونی غالبـاً بـا حالت بازشده ساختار کروماتین و رونویسی فعال ژن همراه است(۲۴). [1]

با توجه به مجموع نتایجی که از بررسی سطوح مارک‌های اپـی‌ژنتیکـی در ایـن مطالعـه بـه دسـت آمـد، می‌توان چنین استنباط کرد که تغییرات اپی‌ژنتیکـی کـه شـامل؛ هیپرمتیلاسـیون DNA، هیپراستیلاسـیون و هیپرمتیلاسیون هیستونی است سبب تغییـرات اساسـی در ساختار کرومـاتین سـلول‌های کومولـوس بیمـاران اندومتریوز گردیده است. این احتمـال وجـود دارد کـه این تغییرات نقش مهمـی در تغییـرات غیرنرمـال بیـان ژن‌هایی که دخیل در فولیکولوژنز هستند ایفـا کـرده و در نهایت منجر به عملکرد نادرست تخمدان گردد.

انـواع وسـیعی از فرآینـدهای درون سـلولی و عملکردهـای بیولـوژیکی بـه وسـیله ERβ کنتـرل و

1-Lysin Residues

میانجی‌گری می‌شود از جمله؛ همانندسازی DNA و ترمیم آن، سیکل سلولی، آپوپتوز، رونویسی، متابولیسم لیپیدها، حمل و نقل‌های درون سلولی، بلوغ mRNA و ترجمه آن و مسیرهای متنوع سیگنالینگ درون سلولی(۲۵). تمامی این عملکردها که به وسیله رسپتورهای استروژن میانجی‌گری می‌گردد از طریق برهمکنش آنها با فاکتورهای رونویسی و عواملی که در نهایت سبب تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌شوند، صورت می‌گیرد(۲۷ و ۲۶). ERβ از طریق اتصال به توالی‌های عناصر رسپتور استروژن (ERE)[1] اثرات ویژه خود را اعمال می‌کند. اتصال لیگاند به رسپتور، باعث دایمریزاسیون رسپتور، اتصال آن به نواحی ERE ژن‌های هدف و فراخوانی تنظیم‌گرهای رونویسی می‌شود که در نهایت کمپلکسی تشکیل می‌شود که باعث تغییراتی در پروموتر ژن می‌گردد. مجموع این اثرات تنظیمی و هدایتی، روی ماشین رونویسی و توانایی دستکاری محیط کروماتینی، سبب کنترل رونویسی می‌گردد(۲۸). حاصل مطالعه حسینی و همکاران نشان داد که هیپواستیلاسیون H3K9 در سه ناحیه پروموتری PII، PI.3 و PI.4 ژن آروماتاز و هیپرمتیلاسیون H3K9 ناحیه پروموتری PII(به عنوان مهم‌ترین پروموتر این ژن در سلول‌های تخمدانی) در سلول‌های کومولوس بیماران اندومتریوز رخ داده که نشان دهنده تغییرات اپی‌ژنتیکی در جهت کاهش بیان ژن آروماتاز می‌باشد. این تغییرات اپی‌ژنتیکی همراه با اتصال متفاوت Erβ به نواحی پروموتری آروماتاز، عامل تغییر بیان آروماتاز در این شرایط پاتولوژیکی است. این امکان وجود دارد که اتصال متفاوت ERβ باعث جابجایی پروموتری در ژن آروماتاز شده، فرآیند استروئیدوژنز فولیکولی را تحت تأثیر قرار داده، که منجر به عدم بلوغ تخمک و کاهش کیفیت جنین شود(۳۰). یکی از محدودیت‌های این مطالعه، تعداد بسیار کم سلول‌های به دست آمده از هر بیمار بود، که این تعداد کم اجازه بررسی جامع اپی‌ژنتیکی تمامی هیستون‌ها را برای محقیقین فراهم نکرد و برخی از بیماران به دلیل تعداد کم سلول‌ها از مطالعه کنار گذاشته شدند. هم‌چنین سلول‌های کومولوس به دست آمده از چندین تخمک هر بیمار با هم تجمیع شدند. اگر بتوان پروفایل اپی‌ژنتیکی این بیماران را بطور جامع بررسی کرد، پاتوژنز بیماری روشن‌تر خواهد شد. از سوی دیگر، معیارهای دقیق و سخت‌گیرانه جهت ورود افراد به مطالعه و مدنظر قرار دادن تمامی عوامل مخدوش‌کننده، اعتبار داده‌ها را افزایش داده است.[1]

لذا پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی به بررسی ژن‌هایی که در مسیر فعال سازی فاکتور رونویسی ERβ نقش دارند و هم‌چنین ژن‌های کواکتیویتور و کورسپتور آن پرداخت که می‌تواند دید بهتری نسبت به عوامل منجر به ناباروری در شرایط پاتولوژیکی اندومتریوز ایجاد کند.

1-Estrogen Response Element

نتیجه‌گیری

تغییرات اپی‌ژنتیکی از نوع هیپراستیلاسیون و هیپرمتیلاسیون در سطح هیستون‌ها و هیپرمتیلاسیون DNA کل ژنوم سلول‌های کومولوس بیماران مبتلا به اندومتریوز رخ داده است. این تغییرات همراه با تغییر سطح اتصال ERβ به ژنوم می تواند سبب تغییر در کروماتین و بیان ژن شود. این تغییرات ممکن است از عوامل مهم تغییردهنده عملکردهای بیولوژیکی سلول‌های تخمدانی در طی فرآیند تکامل تخمک در بیماران اندومتریوز بوده، در نتیجه تخمک‌های با کیفیت پائین در این بیماران تکامل یابد. حتی طی درمان به وسیله تکنیک‌های نوین درمان ناباروری در این بیماران، به‌طور معمول تعداد اندکی تخمک که دارای کیفیت ضعیف هستند استحصال می‌گردد، که در نهایت این تخمک‌ها از میزان لقاح، تسهیم و لانه‌گزینی کمی برخوردار هستند، مجموع این وقایع می‌تواند سبب ناباروری در این بیماران گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی با کد ۲۳۱۰۸ در دانشگاه علوم پزشکی ایران و کد EC/93/1062 در پژوهشگاه رویان به ثبت رسیده است. بدین وسیله محققین از پژوهشگاه رویان و دانشگاه علوم پزشکی ایران به واسطه حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

1.Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, Dâ€™Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Human Reproduction 2005; 20(10): 2698-704.
2.Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Gomel V, Martin DC. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. Fertility and Sterility 2019; 111(2): 327-40.
3.Houshdaran S, Nezhat CR, Vo KC, Zelenko Z, Irwin JC, Giudice LC. Aberrant endometrial DNA methylome and associated gene expression in women with endometriosis. Biology of Reproduction 2016; 95(5): 1-16.
4.Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. Fertility and Sterility 2007; 87(1): 24-32.
5.Nasu K, Kawano Y, Tsukamoto Y, Takano M, Takai N, Li HL, et al. Aberrant DNA methylation status of endometriosis: Epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research 2011; 37(7): 683-95.
6.Wu Y, Halverson G, Basir Z, Strawn E, Yan P, Guo SW. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2005; 193(2): 371-80.
7.Izawa M, Harada T, Taniguchi F, Ohama Y, Takenaka Y, Terakawa N. An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. Fertility and Sterility 2008; 89: 1390-6.
8.Kim TH, Yoo J-Y, Choi K-C, Shin J-H, Leach RE, Fazleabas AT, et al. Loss of HDAC3 results in nonreceptive endometrium and female infertility. Sci Transl Med 2019; 11(474): eaaf7533.
9.Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. Mol Hum Reprod 2010; 16(5): 297-310.
10.Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, et al., editors. Role of estrogen receptor-β in endometriosis. Seminars in Reproductive Medicine 2012; 30(1): 39-45.
11.Dai B, Rasmussen TP. Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells. Stem Cells 2007; 25(10): 2567-74.
12.Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2009; 26(6): 347-54.
13.Kitajima M, Matsumoto K, Kajimura I, Harada A, Miyashita N, Matsumura A, et al. The Effects of Endometriosis on Ovarian Functions. Endocrines 2021; 2(2): 142-9.
14.Simon C, Gutierrez A, Vidal A, De los Santos M, Tarin J, Remohi J, et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. Human Reproduction 1994; 9(4): 725-9.
15.Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, GARCIA-VELASCO JA, Remohí J, et al. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. Annals of the New York Academy of Sciences 2001; 943(1): 122-30.
16.Baumann C, Olson M, Wang K, Fazleabas A, De La Fuente R. Arginine methyltransferases mediate an epigenetic ovarian response to endometriosis. Reproduction 2015; 150(4): 297-310.
17.La Marca A, Nelson S, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, et al. Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. Reproductive Biomedicine Online 2011; 22(4): 341-9.
18.Izawa M, Taniguchi F, Harada T. Epigenetics in endometriosis. Endometriosis: Springer; 2014; 107-23.
19.Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, Esteller M. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. Nucleic Acids Research 2003; 31(6): 1765-74.
20.Morin SJ, Tao X, Marin D, Zhan Y, Landis J, Bedard J, et al. DNA methylation-based age prediction and telomere length in white blood cells and cumulus cells of infertile women with normal or poor response to ovarian stimulation. Aging (Albany NY) 2018; 10(12): 3761.
21.Knight A, Hipp H, Abhari S, Gerkowicz S, Katler Q, McKenzie L, et al. Markers of ovarian reserve are associated with reproductive age acceleration in granulosa cells from IVF patients. Human Reproduction 2022; 37(10): 2438-45.

22.Olsen KW, Castillo-Fernandez J, Zedeler A, Freiesleben NC, Bungum M, Chan AC, et al. A distinctive epigenetic ageing profile in human granulosa cells. Human Reproduction 2020; 35(6): 1332-45.
23.Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science 2001; 293(5532): 1074-80.
24.Dago DN, Scafoglio C, Rinaldi A, Memoli D, Giurato G, Nassa G, et al. Estrogen receptor beta impacts hormone-induced alternative mRNA splicing in breast cancer cells. BMC Qenomics 2015; 16(1): 1.
25.Hervouet E, Cartron PF, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. Epigenetics 2013; 8(3): 237-45.
26.Guglielmotto M, Reineri S, Iannello A, Ferrero G, Vanzan L, Miano V, et al. E2 regulates epigenetic signature on Neuroglobin enhancer-promoter in neuronal cells. Frontiers in Cellular Neuroscience 2016; 10: 147.
27.Wolffe AP. Chromatin remodeling regulated by steroid and nuclear receptors. Cell Research 1997; 7(2): 127-42.
28.Hosseini E, Mehraein F, Shahhoseini M, Karimian L, Nikmard F, Ashrafi M, et al. Epigenetic alterations of CYP19A1 gene in Cumulus cells and its relevance to infertility in endometriosis. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2016; 33(8): 1105-13.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Investigating Post-translational Changes of Histones, DNA Methylation Level, and ERβ Protein Level in the Cumulus Cell Genome of Infertile Women with Endometriosis

Hosseini E[1], Shahhosseini M[2], Afsharian P[2], Mehrayin F[3], Ashrafi M[4], Aflatoonian R[4*]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran, [2]Department of Genetics, Reproductive Medicine Research Center, Jihad Academic Reproductive Medicine and Biology Research Institute, Royan Research Institute, Tehran, Iran, [3]Department of Anatomy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, [4]Department of Endocrinology and Female Infertility, Reproductive Medicine Research Center, Jihad Academic Research Institute of Reproductive Biology and Medical Sciences, Royan Research Institute, Tehran, Iran.

Received: 23 Apr 2023 Accepted: 24 Jul 2023

Abstract

Background & aim: Among the important factors affecting female infertility, endometriosis (with a prevalence rate of up to 50% in infertile women) has a special place. Endometriosis, which is known as the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine tissue, causes a wide range of functional disorders in the process of follicular development and changes in the follicular microenvironment, which ultimately leads to the creation of an egg that is of suitable quality for the formation of The fetus does not have Therefore, the aim of the present study was to determine and investigate post-translational changes of histones, DNA methylation level and ERβ protein level in the genome of cumulus cells of infertile women with endometriosis.

Methods: The present case-control study was conducted at the infertility treatment clinic of Royan Research Institute in 2014. Twenty-four patients were divided into two equal groups. Cumulus cells were obtained from 12 infertile patients with endometriosis and 12 women with male factor infertility (as a control group) under ovulation stimulation protocols for intracytoplasmic sperm injection. Extraction of chromatin from cumulus cells was done after stabilization of DNA binding proteins and then cell lysis and preparation of soluble chromatin. The binding and incorporation levels of MeCP2 protein (as DNA methylation marker), two epigenetic markers related to histone modifications (H3K9me2 and H3K9ac), and ERβ protein to chromatin of cumulus cells were evaluated using the corresponding primary antibodies, secondary antibodies conjugated and Nucleosome-ELISA technique. Data were analyzed using independent t-test t and Levene's test.

Results: MeCP2 protein incorporation into DNA was significantly higher in the endometriosis group than in the control group. The level of two epigenetic marks H3K9ac and H3K9me2 in the chromatin of cumulus cells of the patient group showed a significant increase compared to the control group ($P<0.05$). In addition, an increased level of binding of ERβ protein to the genome was observed compared to the control group.

Conclusion: Epigenetic changes, including histone hyperacetylation and hypermethylation, and DNA hypermethylation of the whole genome of cumulus cells of patients with endometriosis had occurred, accompanied by an increase in the level of ERβ protein binding.

Keywords: Histone, Methylation, Acetylation, Estrogen Receptor Beta, Cumulus Cells, Endometriosis.

***Corresponding author: Aflatoonian R,** Department of Endocrinology and Female Infertility, Reproductive Medicine Research Center, Jihad Academic Research Institute of Reproductive Biology and Medical Sciences, Royan Research Institute, Tehran, Iran.
Email: R.aflatoonian@royaninstitute.org

Please cite this article as follows: Hosseini E, Shahhosseini M, Afsharian P, Mehrayin F, Ashrafi M, Aflatoonian R. Investigating Post-translational Changes of Histones, DNA Methylation Level, and ERβ Protein Level in the Cumulus Cell Genome of Infertile Women with Endometriosis. Armaghane-danesh 2023; 28(5): 689-703.