



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน/เมทิลเลชันที่มีผลต่อยีนที่คาดว่าจะมีผลต่อโรคสะกดเงิน

โดย ดร.เกรียงศักดิ์ ฤชศาวัต

เดือน เมษายน พศ. ๒๕๕๓

สัญญาเลขที่ TRG5180001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน/เมทิลเลชันที่มีผลต่อยีนที่คาดว่าจะมีผลต่อโรคสะกดเงิน

ผู้วิจัย สังกัด

ดร. เกรียงศักดิ์ ฤทธศาสตร์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผมขอขอบคุณ ศ. นพ. อภิวัฒน์ มุทิตาภิรักษ์ ที่ช่วยกรุณา ให้คำปรึกษา คำแนะนำที่มีค่า ช่วยแก้ไขปัญหา และ สร้างแรงกระตุ้นในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วง

ในการทำงานวิจัย ผมได้รับการสนับสนุน อย่างดียิ่ง ในการเก็บตัวอย่าง ข้อมูลผู้ป่วย และ คำแนะนำที่มีคุณค่า จาก ผศ. ดร. พญ. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร และ คุณหมอ พยาบาล เจ้าหน้าที่ รวมทั้ง ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ที่หน่วยผิวหนัง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ รพ. จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ผมขอแสดงความนับถือ

ผมได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จาก ศ. นพ. ชนพ โชติช่วง ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในการช่วยให้คำปรึกษา

และ งานวิจัยครั้งนี้ สามารถประสพผลสำเร็จได้ดี โดย นางสาว พรรณทิพา พรตเจริญ นักศึกษาปริญญาโท และ น้องๆที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีความตั้งใจในการช่วยงานวิจัยครั้งนี้

นอกจากนี้ การวิจัยยังได้รับการสนับสนุนเป็นอย่างดี ในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และ เครื่องมือกลางของ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

และสุดท้าย งานวิจัยนี้จะไม่สามารถทำได้เลย ถ้าไม่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

รูปแบบ Abstract (ภาษาอังกฤษ)

Project Code : TRG5180001

Project Title : The effect of DNA demethylation/methylation to candidate genes in Psoriasis

Investigator : Dr. Kriangsak Ruchusatsawat

Thai-National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of
Public Health 88/7 Soi Bumrajnaradura Tivanon Rd. Muang Distric. Nontaburi
11000. Tel 02-5899850-8 ext 99313. Fax 02-5915449

E-mail Address : kriangsak.r@dmshc.mail.go.th, ruchusatsawat@yahoo.com

Project Period : 2 Years (May 1, 2008- April 30, 2010)

Abnormal proliferation and differentiation of keratinocytes occur in many skin diseases. Parakeratosis is an abnormal maturation of the keratinocytes in which keratinization of epithelial cells is incomplete and abnormal retention of keratinocyte nucleuses in stratum corneum. It occurs in malignant, inflammatory as well as autoimmune skin diseases as in eczema, squamous cell carcinoma (SCC) and psoriasis. Down-regulation of ID4 protein in epidermis has been described in associated with psoriasis. The gene encoded ID4 is located within psoriasis susceptibility 1 (PSORS1). Moreover, promoter hypermethylation of *ID4* has been described in several cancers. Here, we report a previously undescribed methylated pattern of the *ID4* promoter in lesional psoriatic skin. We investigated 11 cell lines, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and micro-dissected epithelium of skin from normal subjects and lesional skin from psoriatic patients. All normal cells were unmethylated. *ID4* promoter methylation was detected in psoriasis. The *ID4* promoters of cells from the upper and lower part of psoriatic epidermis were hypermethylated and unmethylated, respectively. By immunohistochemistry, the parakeratotic keratinocytes in the upper layer of psoriasis, chronic eczema and SCC lacked ID4 protein, whereas the keratinocytes in the lower layer were densely stained. Normal epidermal keratinocytes consistently expressed ID4 protein. The lack of ID4 expression in psoriatic keratinocytes, chronic eczema and SCC may be epigenetically controlled. This finding is a novel example of a link between gene-specific promoter hypermethylation and abnormal cellular differentiation in the skin diseases. In addition, *ID4* methylation is a candidate marker for abnormal terminal differentiation of keratinocyte, particularly parakeratosis.

Keywords : ID4, DNA Methylation, Psoriasis, Parakeratosis, Immunohistochemistry

รูปแบบ บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

รหัสโครงการ: TRG5180001

ชื่อโครงการ: การเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน/เมทิลเลชันที่มีผลต่อยีนที่คาดว่าจะมีผลต่อโรคสะเก็ดเงิน

ชื่อนักวิจัย: ดร. เกรียงศักดิ์ ฤชสาธิต

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

88/7 ซ. รพ. บำราชนราทร ถ. ทิวาพันธ์ จังหวัด นนทบุรี รหัสไปรษณีย์ 11000

โทรศัพท์ 02-5899850-8 ต่อ 99313 โทรศัพท์มือถือ 085-9170044 โทรสาร 02-5915449

E-mail Address : kriangsak.r@dmsc.mail.go.th, ruchusatsawat@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (วันที่ 1 พฤษภาคม 2551 ถึงวันที่ 30 เมษายน 2553)

บทคัดย่อ

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่มีความผิดปกติของการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิวหนังซึ่งรวมถึงการเกิดพาราเคอราโตซิสซึ่งเป็นขบวนการหนึ่งที่สำคัญของการแสดงความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในชั้นของคอร์เนียม ยีน ไอดีสี่ I(Inhibitor of DNA binding/Inhibitor of differentiation 4, ID4) ที่พบว่ามียีนของ เอ็มอาร์เอ็นเอ ลดลงในโรคสะเก็ดเงิน นอกจากนี้ยังเป็นยีนที่ยับยั้งการเกิดมะเร็งซึ่งถูกควบคุมโดยขบวนการ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน การศึกษาวิจัยครั้งนี้เราได้ศึกษาใน 1) เซลล์ลายทั้งหมดจำนวน 11 ชนิด 2) เซลล์เม็ดเลือดขาว และ 3) ชิ้นเนื้อ แบบแยกชนิดเซลล์ผิวหนังโดยใช้เครื่องเลเซอร์ (Laser capture microdissection) จากตัวอย่างคนปกติ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) ผู้ป่วยผิวหนังอักเสบ (eczema) และ ผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนัง (Squamous cell carcinoma, SCC) และตรวจหาโดยวิธี MSP, DNA cloning, Sequencing, RT-PCR และ Immuno histochemistry ซึ่งพบว่า พบว่า ในเซลล์ลาย 1) กลุ่ม Hematopoietic cell lines (5 ชนิด) เช่น Jurket, Daudi, Molt4 , HL-60เป็น methylated promoterขณะที่ และK562 เป็น mixed (met/unmet) promoter PBMC เป็น unmethylated promoter 2) กลุ่ม Epithelial cell lines (6 ชนิด) เช่น Hela, HEp2, RKO, SiHA, , เป็น methylated DNA SW480 เป็น mixed (met/unmet) promoter และ HaCaT เป็น unmethylated promoter และ พบ DNA methylation ของ ยีน ID4 ในชิ้นเนื้อ ตัวอย่างจากคนปกติ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ผู้ป่วยผิวหนังอักเสบ และ ผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนัง คิดเป็น ร้อยละ 0 , 66.6 , 14.3 และ 42.8 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า ปริมาณของการเกิด DNA methylation คิดเป็น ร้อยละ 0, 34.81, 6.47 และ 21.84 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่าง คนปกติ กับ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ($p < 0.005$) และ ผู้ป่วย eczema กับ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ($p < 0.05$) นอกจากนี้ ยังพบว่า การเกิด ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน มีความสัมพันธ์กันกับการแสดงออกโดยโปรตีน ID4 ลดลงใน ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และ ผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนัง เมื่อเปรียบเทียบกับ คนปกติ ในชั้นของ คอร์เนียม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด พาราเคอราโตซิส และนับว่าเป็นการค้นพบครั้งแรกที่มีการรายงาน แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการเกิด DNA methylation ของ ยีนนี้ และ หน้าที่ของ ยีนนี้ ในโรคสะเก็ดเงินจึงเป็นเรื่องที่น่าจะมีความศึกษาต่อไป

คำหลัก : โรคสะเก็ดเงิน ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ยีนไอดีสี่ พาราเคอราโตซิส

เนื้อหางานวิจัยประกอบด้วย

บทนำ

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 2-3 ของประชากรโลก[1] อุบัติการณ์การเกิดโรคในเพศชายและหญิงไม่แตกต่างกัน ความชุกของการเกิดโรคแตกต่างกันไปตามภูมิประเทศ เชื้อชาติ และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น อัตราความชุกในประเทศ Samoa ต่ำสุดถึง 0% แต่ในประเทศ Arctic-Kasach'ye สูงถึง 11.8%[2] ทางด้านเอเชียซึ่งมีประชากรเชื้อชาติต่างๆ จำนวนมาก พบว่าความชุกของโรคสะเก็ดเงินใน India 0.5-1.5%, Malaysia 4-5.5%, Japan 1.18% และ Kuwait 3.1%[3] เป็นต้น สำหรับประเทศไทย การรายงานประจำปีของ สถาบันโรคผิวหนัง กระทรวงสาธารณสุข เฉลี่ยประมาณ 3000 รายต่อปี ซึ่งคาดว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยทั่วประเทศมากกว่านี้ อย่างแน่นอน

จากการศึกษาที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันสรุปได้ว่า โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเองซึ่งเกี่ยวข้องกับ T-lymphocyte (T-lymphocyte mediated skin autoimmune disease [5] โดยผู้ป่วยมีพันธุกรรมที่มีแนวโน้มในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเป็นแบบ type 1 immune effector functions เมื่อมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน T cell ที่ตอบสนองจะเป็น T helper1 และ T cytotoxic หลัง cytokine ที่มีรูปแบบเด่นคือ T-helper type-1 cytokine ได้แก่ interferon gamma (IFN-gamma), interleukin(IL)12 และ IL-2 เป็นต้น [4, 6] นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง proinflammatory cytokines และ chemokines ต่างๆ ทั้งหมดส่งผลให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาที่ผิดปกติของเซลล์ผิวหนัง มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์หลุดลอก และเกิดการอักเสบขึ้น

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคและกลไกการเกิดโรคที่ชัดเจน แต่เชื่อว่าปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยแต่ละรายมีการแสดงออกของโรคและความรุนแรงของโรคที่ต่างกัน มีรายงานการวิจัยที่สนับสนุนว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรม มีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดโรคคือการศึกษาในฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) ได้ค่า concordance rate ประมาณ 70% ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับฝาแฝดไข่คนละใบ (dizygotic twins) มีค่า 20% และจากการศึกษาในครอบครัว (Family studies) มีอุบัติการณ์แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมมีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน การดำเนินของโรคจะสูงขึ้นมากถึงร้อยละ 50 หรือครึ่งหนึ่งของญาติพี่น้องสายเลือดเดียวกันเมื่อทั้งพ่อและแม่เป็นโรคสะเก็ดเงิน แต่อัตราความชุกจะลดลงถึงร้อยละ 16 เมื่อพ่อหรือแม่คนใดคนหนึ่งเป็นโรค และลดลงถึงร้อยละ 8 เมื่อทั้งพ่อและแม่ไม่ได้เป็นโรค ซึ่งการศึกษาเหล่านี้สนับสนุนว่าพันธุกรรมมีบทบาทที่สำคัญต่อโรคสะเก็ดเงิน 71% ของผู้ป่วยในวัยเด็กที่เป็นโรคสะเก็ดเงินมักมีประวัติทางครอบครัวมาก่อน[4] มีการศึกษาหา Susceptibility regions บนตำแหน่งต่างๆ ของโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน ในมนุษย์ พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และการดำเนินของโรคสะเก็ดเงินหลายตัวเช่น ยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1q21, 3q21, 4q, 7p, 8, 11, 16q, 17q, 20p และ 6p มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค และการดำเนินของโรค[7]

ความสำคัญของ DNA demethylation/methylation กับโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

แนวทางการศึกษาในปัจจุบันนอกจากวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนแล้ว ยังมีการศึกษาผลของการควบคุมแบบนอกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของสาย DNA โดยเฉพาะการเกิดภาวะ DNA methylation ภายในยีน ซึ่งเป็นกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์จำเพาะ ต่างๆ ด้วย โดยการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งกับการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA demethylation/methylation ทั้งในส่วนยีนควบคุมการแสดงออกของมะเร็ง (oncogene) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) [8-10]

ปัจจุบันมีการศึกษา DNA methylation กับโรค autoimmune ยังมีไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation กับโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) โดยจากรายงานการศึกษาเบื้องต้นของกลุ่มผู้วิจัยเราเองในเรื่องภาวะ methylation ของยีน *SHP-1* ซึ่งทำหน้าที่เป็น negative regulatory signal gene ของ epithelial cells และจัดอยู่ในกลุ่มของ tumor suppressor gene ใน hematopoietic cells *SHP-1* มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการเจริญและเพิ่มจำนวนซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์นั้นๆ จากการศึกษาครั้งนี้พบผลที่น่าสนใจอย่างมากคือบริเวณ promoter ของยีนนี้เกิดกระบวนการ demethylation หรือ hypomethylation ในเซลล์ผิวหนังของคนไข้โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ hypomethylation จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคผิวหนัง (skin pathogenesis) โดยเฉพาะเกี่ยวข้องกับระดับการเพิ่ม *SHP-1* transcription ในผิวของโรคสะเก็ดเงิน [11] อย่างไรก็ตามกลไกการเกิด demethylation ของยีน *SHP-1* ยังไม่เป็นที่ชัดเจน และยังไม่มียารายงานยืนยันจำเพาะที่เกี่ยวข้องกับ pathogenesis ของโรคอื่นๆ นอกจากยีน *SHP-1* ในโรคสะเก็ดเงิน

สำหรับยีนที่คาดว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรค สะเก็ดเงิน มีประมาณ 1338 ยีน [12] ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นระบบดังนี้คือ Cell organization and Biogenesis, Cell proliferation, Epidermal Differentiation, Exocytosis, Immune response, Inflammation response, JAK/STAT cascade, Leukotriene Met, Melanin Biosynthesis, Mitotic Cell Cycle, Neurogenesis, Nitric Biosynthesis and Transcription ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในโรคสะเก็ดเงิน [12]

Process	I vs. N	U vs. N	U vs. I	Genes	Process	I vs. N	U vs. N	U vs. I	Genes	Process	I vs. N	U vs. N	U vs. I	Genes
Arg. Cell.	↑	↑	↑	ARG1, ARG2	Immune Resp.	↑	↑	↑	TRIM22, CD24, DEFB2, FCGR3B, IL4R, IL7R, IL8RB, RGS1, SCYA20, SERPINA3, ARHGAP24, C1QB, C1R, CCR1, CD53, CD83, CTSC, LGALS3BP, MICB, MMDA, PX19, SCYA18, SCYA2, STAT3, TLR2	Mitotic Cell Cycle	↑	↑	↑	ANLN, CDKN2B, CKS2, ECGF1, HEC, MAD2L1, MPHOSPH6, SMC4L1, ZRF1, BCCIP, CDK5R1, GSPT1, KNSL1, KPNA2, PCNA, PRC1, REV1L, SEI1, CCNE2, CSPG6, SGT1, CCND1, CDKN1C, CHES1
Cell Organization and Biogenesis	↑	↑	↑	ECGF1, SMC4L1, KNSL1, PRC1, CSPG6, TOP1, DNMT1L, LOC56993, PFX, CBX4, PEX11A, SCA7	Inflamm. Resp.	↑	↑	↑	EBI2, APOE, AQP9, CRIP1, F3, SCYA27, ALCAM, ITGB1	Neurogenesis	↑	↑	↑	GDA, OLFM1, STAT3, MAFB, CKTSF1B1, ALDH3A2, EGR2, FABP7, PCP4, MJD, CLNB, DPYSL3, LOC51195, SPON2
Cell Proliferation	↑	↑	↑	CDKN2B, CKS2, HBP17, IL8, IL8RB, KRT16, LAMP3, MAD, PBEF, AREG, CDK5R1, GSPT1, IFITM1, MCT-1, MYC, PCNA, SEI1, UHRF1, CTBP2, DAB2, MKPX, BTC, CRIP1, CTNNBIP1, FABP7, INSIG1, CDKN1C, GNRH1, LMO1, RARRES1, SFN, IRS2, SCYA14	JAK-STAT Cascade	↑	↑	↑	STAT1, NMI, SCYA2, STAT3	NO Biosyn.	↑	↑	↑	GCH1, ARG2, GCHFR
Epidermal Differentiation	↑	↑	↑	S100A7, ALOX12B, FABP5, KRT16, SPRR1B, DSP, ATP2A2, CTGF, DCT, ALDH3A2, KRT15, LAMC2, SCEL	Leukotriene Met.	↑	↑	↑	CLP, ALOX5AP	Transcription	↑	↑	↑	STAT1, TRIM22, ELL2, HIF1A, NMI, PTTG1, MYC, STAT3, UHRF1, TMF1, PREB, CTNNBIP1, GATA3, ID4, PPARG, PPARGC1, THRSP, RBBP2, SOX5, SOX9, TAF8L, CBX4, GTF3A
Exo-cytosis	↑	↑	↑	LMAN1, SNAP23, PRO1912, SEDL	Melanin Biosyn.	↑	↑	↑	DCT, TYR					

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ยีนเหล่านี้มีทั้งการเพิ่มขึ้นและลดลง สำหรับในกลุ่มของยีนที่เพิ่มขึ้นและมีความน่าสนใจเป็นอย่างมากคือ Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ซึ่งมีรายงานจากการทดลองของ Sano และคณะ พบว่า หนูที่ใส่ ยีน STAT3 และกระตุ้นให้ทำงานตลอดเวลา (K.5Stat3C mice) มีผลทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงินได้ [13] และ นอกจากนี้ การที่ STAT3 เพิ่มขึ้นมาก ใน T cell Lymphoma ยังเป็นสาเหตุที่สำคัญในการเกิด DNA methylation ที่ promoter ของยีน *SHP-1* ขึ้นด้วย [14] ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจความสัมพันธ์ของ STAT3 กับยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิด DNA methylation กับ ยีน *SHP-1* เช่น C/EBP, nuclear transcription factor Y, Oct1 [15] erg-1, Sp3 transcription factor, Jun-B [16] ที่อาจจะมีส่วนต่อการเกิด demethylation/methylation ของยีน *SHP-1* อย่างไรก็ตามยังมี ยีนอื่นๆอีกที่คาด

ว่าน่าจะมีผลต่อการเกิดโรคสะกดเงิน เช่น ยีน GADD45 (The growth arrest-and DNA- damage-inducible-proteins 45) GADD 45 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ การทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) และการหยุดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (anti-proliferation effect) [17] GADD สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ GADD α , β , γ โดยมีความเหมือนกันอยู่ที่ 55-58 % ของกรดอะมิโน นอกจากนี้ GADD ยังเกี่ยวข้องกับ การกระตุ้นของ เอ็นไซม์ไคเนส ในกลุ่ม ของ p38/c-Jun [18] ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของ เซลล์ (cell proliferation) ในหลายๆสถานะ เช่น G1-S, G2-M และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะปอโตซิส (Apoptosis) [19-21] โดยเร็วๆนี้มีการศึกษาของการเกิด DNA methylation ของยีน GADD มีผลทำให้ ขาดการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปอด ความสัมพันธ์ที่คาดว่ายีนGADD น่าจะ เกี่ยวข้องกับโรคสะกดเงินคือในเนื้อเยื่อของโรคสะกดเงินมีการกระตุ้นของ p38 อยู่ตลอดเวลาและ ทำให้เกิด hyperproliferation [22] และ p38 เองก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนGADD จากข้อมูลเบื้องต้นนี้ เองทำให้คณะผู้วิจัยคาดว่า ยีน GADD น่าจะมีความสัมพันธ์กับโรคนี้ด้วย

สำหรับ ยีน ID4 (Inhibitor of DNA binding/Inhibitor of differentiation 4) มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของ ยีน ID4 ใน ผู้ป่วยโรคสะกดเงิน จากการทำการทดลองของ Oestreicher และ คณะ [23] และ ยังพบว่า ยีน ID4เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม 6p21.3 ที่จำเพาะกับส่วนของ PSORS1 [24] ซึ่งเป็นส่วนของ ยีนที่ susceptible locus สำหรับ โรคสะกดเงิน โดย ยีน ID4 มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลง (cell proliferation and differentiation) [25,26] และการตายแบบอะปอโตซิส (apoptosis)[27] ID4 เป็น สมาชิก ของ กลุ่ม the basic helix-loop-helix (bHLH) ที่ไม่มีในส่วนของ basic region ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของ การเป็น transcription factor [28] นอกจากนี้ ยีน ID4 ยังมีคุณสมบัติเป็น ยีนต้านมะเร็ง ในมะเร็งหลายๆชนิดเช่น malignant lymphoma [29] , gastric adenocarcinoma [30] breast cancer [31] และ colorectal carcinoma [32] ในทางตรงข้าม ยีน ID4 อาจจะเป็น oncogene ได้ ซึ่งพบว่าเพิ่มมากขึ้นใน prostate cancer [33] and bladder cancer [34] ซึ่งก็ พบว่ายีน ID4 ถูกควบคุมโดยขบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นตามรายงานในโรคมะเร็งข้างต้น [30-32] แต่ อย่างไรก็ตามการลดลงของ ID4 ยังไม่ได้มีการรายงานถึงขบวนการที่ควบคุม และ กลไกที่เกี่ยวข้องของยีนนี้ กับโรคสะกดเงิน

ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยคัดเลือกยีนจำเพาะที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับ pathogenesis ของโรคและ ทำการศึกษาภาวะ DNA demethylation/methylation ในยีนนั้น รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด DNA demethylation/methylation ของยีนนั้นในผู้ป่วยโรคสะกดเงิน โดยทำการศึกษาในเซลล์ผิวหนังและเซลล์เม็ด เลือดขาวชนิดต่างๆ ของผู้ป่วย เพื่อเข้าใจกลไกการเกิดและการดำเนินของโรคสะกดเงินและอาจเป็น ประโยชน์ในการพัฒนาวิธีป้องกันและรักษาโรคแบบใหม่ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาภาวะ demethylation/methylation ใน candidate gene ที่ได้คัดเลือกว่ามี สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดโรคสะกดเงิน (psoriasis) โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคสะกดเงินกับกลุ่มควบคุม
2. เพื่อศึกษากลไกที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ demethylation/methylation ใน ยีนที่พบ ในโรคสะกดเงิน

วิธีทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้จะแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วนคือ

- การศึกษาการเปลี่ยนแปลงภาวะ methylation ของ กลุ่มของ candidate gene ในโรคสะเก็ดเงิน
- การควบคุมของภาวะ methylation ต่อ การแสดงออกของยีนในโรคสะเก็ดเงิน

1. กลุ่มประชากรที่นำมาศึกษา

กลุ่มศึกษา คือ ผู้ป่วยประชากรไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย จำนวน 80 คน

2. การเก็บตัวอย่างเลือดและการคัดแยกเซลล์

เก็บตัวอย่างเลือด 10 มล. ใน heparin tube บั่นแยก peripheral blood mononuclear cell (PBMC) โดยใช้วิธี Ficoll-Hypaque density gradient และใช้ immunomagnetic bead ที่จำเพาะในการแยก CD4+ T cell, CD8+ T cell และ B cell

3. การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ผู้ป่วยจะได้รับการตัดชิ้นเนื้อโดยวิธี punch biopsy ซึ่งผู้วิจัยจะนำส่งตรวจพยาธิสภาพตามปกติ โดยการย้อม H&E และทำการตัดชิ้นเนื้อจาก paraffin section แยกเซลล์ชั้นหนังกำพร้าออกมาศึกษาโดยทำการแยกเซลล์ด้วยวิธี **micro-dissection** ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สำหรับชิ้นเนื้อของคนปกติ ผู้วิจัยจะขอจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดศัลยกรรมตกแต่ง โดยทำการเก็บชิ้นเนื้อภายหลังจากที่ผู้ป่วยเซ็นติใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ และทำการเก็บชิ้นเนื้อและแยกเซลล์เช่นเดียวกับชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย

4. การศึกษา DNA methylation ใน candidate gene

สกัด DNA จากเซลล์ที่แยกได้โดยใช้วิธี phenol-chloroform extraction และนำมาศึกษาลักษณะการเกิด methylation ในส่วน promoter ของ candidate gene ซึ่งอยู่ในยีนนั้นๆ โดยใช้วิธี Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA), Methylation Specific PCR (MSP) ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้หลักการคือ การนำ DNA ที่สกัดได้มาเติมสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) แต่จะไม่เปลี่ยน methylcytosine (^mC) วิธีการแรกสามารถนำไปเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ซึ่งจะทำให้ amplicons ที่ได้มี Thymidine (T) แทน cytosine (C) ทั้งหมดยกเว้น methylcytosine (^mC) ที่ไม่เปลี่ยน ดังนั้นจึงสามารถใช้ restriction enzyme ที่เหมาะสมตัดเพื่อแยกความแตกต่างได้ ส่วนวิธีที่สองจะอาศัยคุณสมบัติของ primer ที่มีความจำเพาะต่อ sequence ที่เกิดหรือไม่เกิดภาวะ methylation ซึ่งจะมีการออกแบบให้มีขนาดของ amplicon แตกต่างกัน โดยการศึกษาภาวะ methylation จะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ methylation ใน candidate gene กับ การเกิดโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

5. การวัดระดับของแสดงออกของยีน (mRNA) ซึ่งควบคุมโดย ขบวนการดี เอ็น เอ เมทิลเลชันโดยวิธี Real time RT-PCR

การสกัด RNA จากตัวอย่าง โดยใช้ Trizol reagent (Life technologies. Inc) ต่อด้วย การสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี (RT) (Promega, USA) จากนั้น ใช้ QuantiTect SYBR Green I (Qiagen, Hilden, Germany) ตาม protocol. และ นำเข้าเครื่อง Light Cycler machine (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) วิเคราะห์ผลโดยการวัด specific peak และ ดู specific band โดย การใช้ agarose electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide. สำหรับการวัดระดับของ PCR product ใช้เทียบกับ GAPDH ซึ่งเป็นยีนควบคุม และ การย้อม Immunohistochem สำหรับดูการแสดงออกของยีน

ผลการทดลอง

- เลือก candidate gene (GADD45 gamma และ ID4)

การทดลองที่ 1 ผลของ GADD45 gamma ใน Cell lines

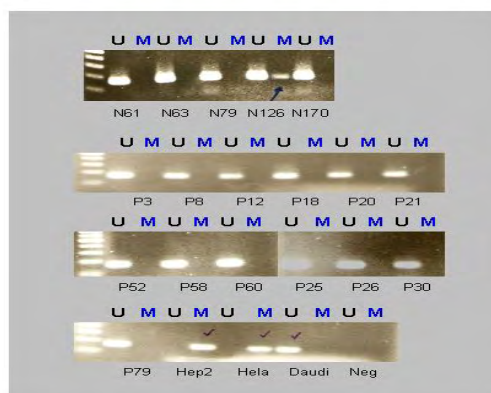
Gadd45-gamma results in cell line



พบว่า ใน 1) กลุ่ม Hematopoietic cell lines เช่น Jurkat, Daudi, K562, HL-60 และ PBMC เป็น unmethylated DNA 2) กลุ่ม Epithelial cell lines มีความหลากหลาย เช่น Hep2 และ HeLa เป็น methylated DNA, UACC903, HepG2 เป็น Mixed DNA, HaCat ,เป็น unmethylated DNA

การทดลองที่ 2 ผล GADD 45 gamma ใน PBMC ของ คนปกติ และผู้ป่วยโรคสะกดเงิน

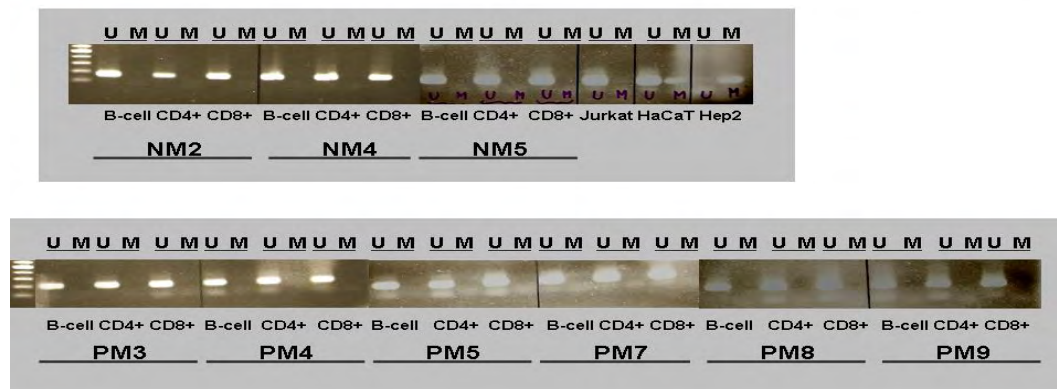
Gadd45-gamma results in total leukocyte



พบว่า ในกลุ่มคนปกติ NS61, NS63, N79, และ NS170 เป็น Unmethylated DNA แต่ N126 เป็น Mixed DNA – ขณะที่ กลุ่มผู้ป่วยโรคสะกดเงิน P3, P8, P12, P18, P20, P21, P25, P26, P30, P52, P58, P60 และ P79 เป็น unmethylated DNA เหมือนกัน (Hep2 และ HeLa เป็น positive methylated DNA control , Daudi เป็น positive unmethylated DNA control, H₂O เป็น Negative control)

การทดลองที่ 3 ผล GADD 45 gamma ใน ชนิดของเซลล์ CD4, CD8 และ B เซลล์ ของ คนปกติ และ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

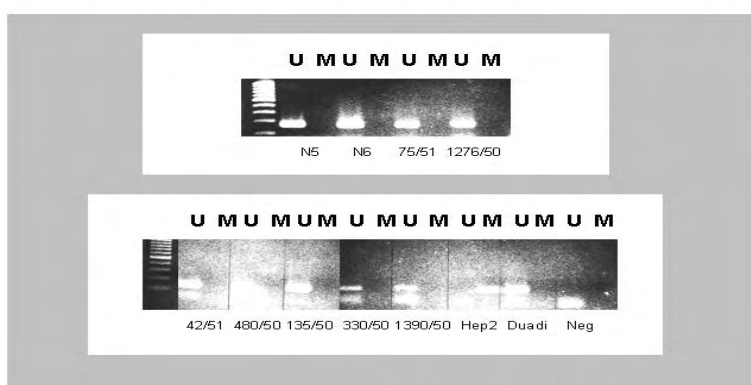
Gadd45-gamma results in B-cell,CD4+Tcell and CD8+Tcell



พบว่า ในคนปกติ (NM2, NM4 และ NM5) เซลล์ทั้ง CD4, CD8 และ B cell ทั้งหมด เป็น Unmethylated DNA ซึ่ง ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (PM3, PM4, PM5, PM7, PM8 และ PM9) เซลล์ทั้ง CD4, CD8 และ B cell ทั้งหมด เป็น Unmethylated DNA โดยมี (Hep2 เป็น positive methylated DNA control , Juket และ HaCat เป็น positive unmethylated DNA controll)

การทดลองที่ 4 ผล GADD45 gamma ในepithelial cell ของคนปกติ และผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

Gadd45-gamma results in epidermal tissue



Methylation in normal tissue= 0%

Methylation in psoriasis tissue= 0%

พบว่า ในคนปกติ (N5 และ N6) epithelial cells ทั้งหมด เป็น Unmethylated DNA ซึ่ง ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (135/50, 330/50, 480/50, 1276/50, 1390/50, 42/51 และ 75/51) epithelial cells ทั้งหมด เป็น Unmethylated DNA โดยมี (Hep2 เป็น positive methylated DNA control , Daudi เป็น positive unmethylated DNA control, H₂O เป็น Negative control)

การทดลองที่ 5 ผลของ ID4 ใน Cell lines

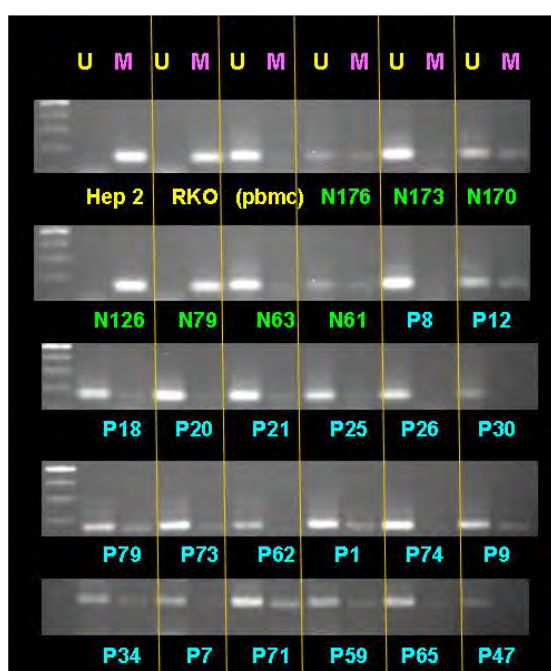
ID4 results in cell line



พบว่า ใน 1) กลุ่ม Hematopoietic cell lines เช่น Jurket, Daudi, Molt4 , และ เป็น methylated DNA ขณะที่ HL-60, และ K562 เป็น mixed DNA PBMC เป็น unmethylated DNA 2) กลุ่ม Epithelial cell lines เช่น Hela, Hep2, HepG2, Caski, SiHA, HaCAT, RKO เป็น methylated DNA SW480 เป็น Mixed DNA และ UACC903 เป็น unmethylated DNA

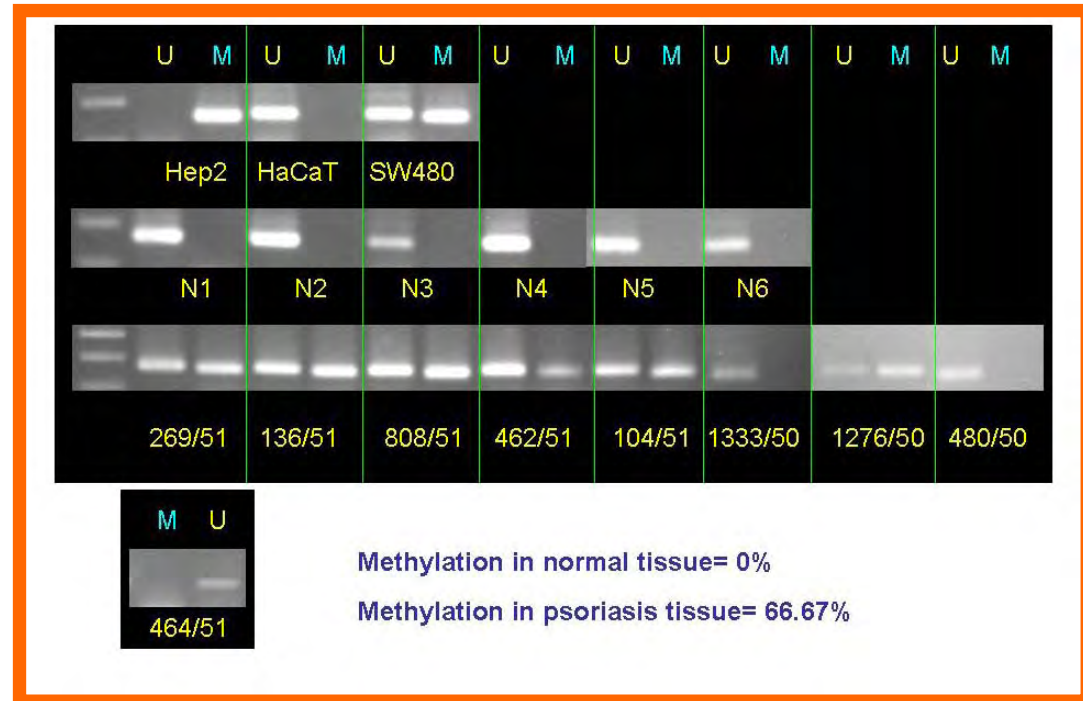
การทดลองที่ 6 ผลการตรวจหา DNA methylation ของ ยีน ID4 ใน PBMC

การตรวจหา DNA methylation ของ ยีน ID4 ใน PBMC จาก ตัวอย่างจากกลุ่ม healthy (N) จำนวน 7 ราย และจากผู้ป่วยโรคมะเร็ง (P) จำนวน 20 ราย ผลที่ได้คือ พบการเกิด DNA methylation ในกลุ่ม healthy 5/7 ราย คิดเป็นร้อยละ 71.4 และ จากผู้ป่วย 14/20 ราย คิดเป็นร้อยละ 70.0 ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



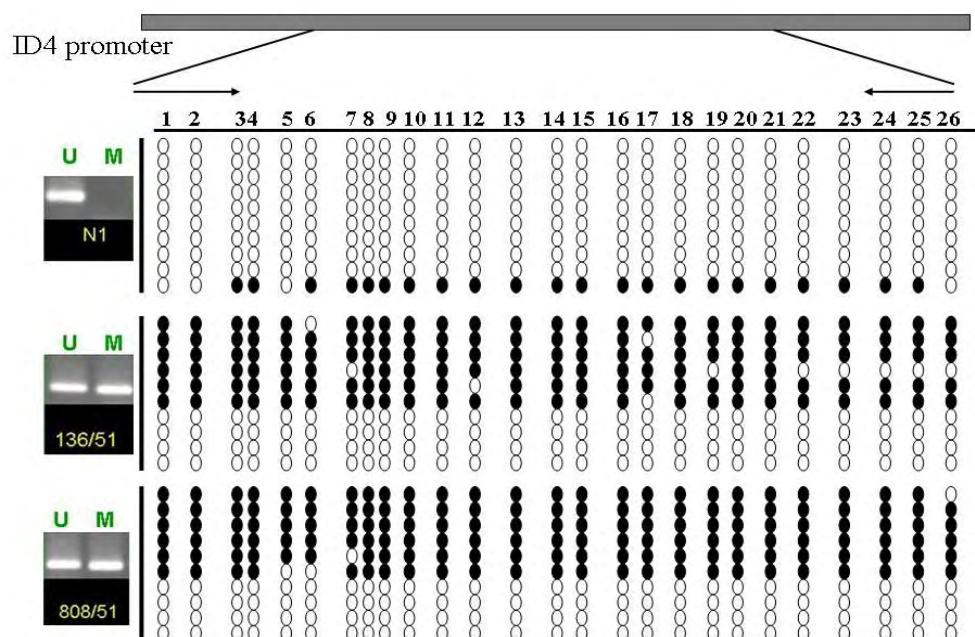
การทดลองที่ 7 ผลการตรวจหา DNA methylation ของ ยีน ID4 ใน ชั้นเนื้อ

การตรวจหา DNA methylation ของ ยีน ID4 ใน ชั้นเนื้อ (Paraffin embedded tissues) จาก ตัวอย่าง จากกลุ่ม healthy (N) จำนวน 6 ราย และจากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (P)จำนวน 9 ราย ผลที่ได้คือ พบการเกิด DNA methylation ในกลุ่ม healthy 0/6 ราย คิดเป็นร้อยละ 0 และ จากผู้ป่วย 6/9 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.6 ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



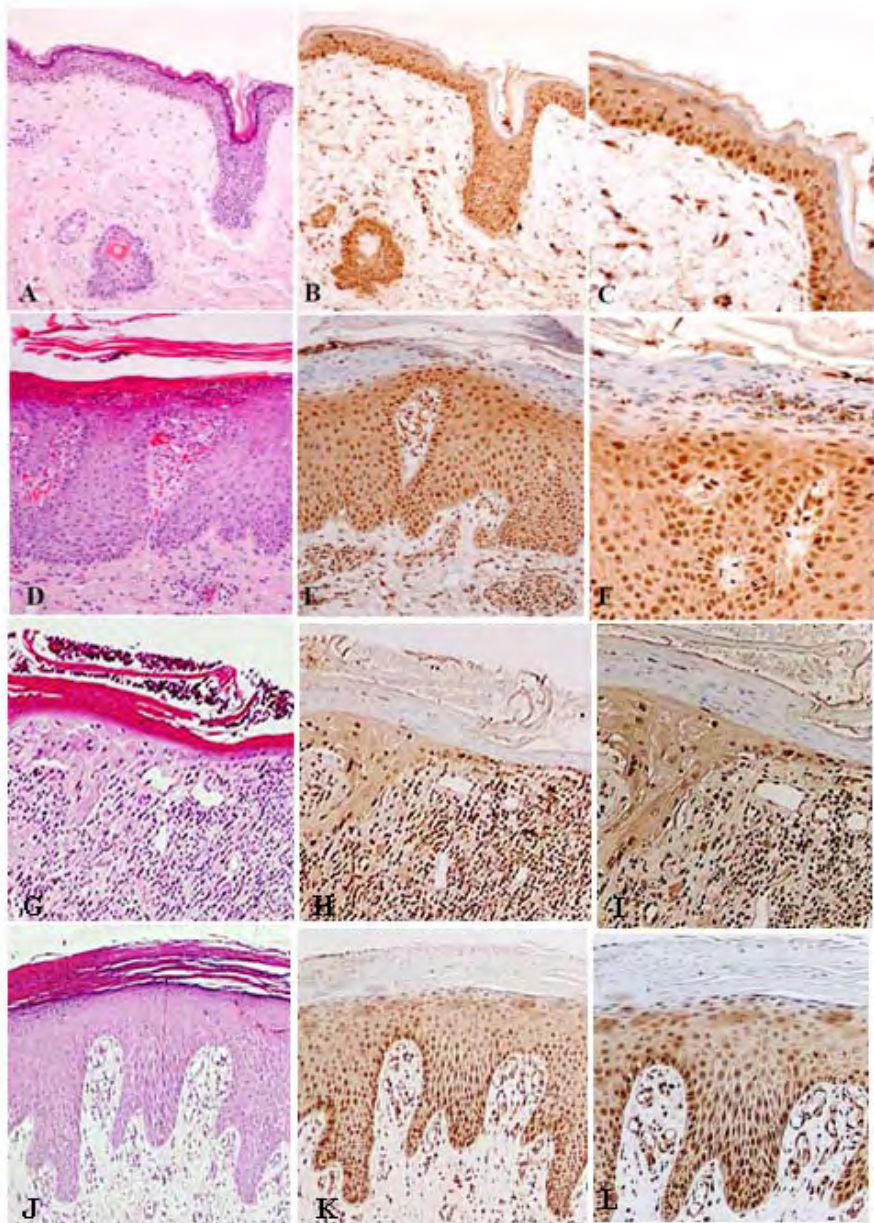
การทดลองที่ 8

การยืนยัน การเกิด DNA methylation โดยการ cloning Sequencing โดย คัดเลือกตัวอย่าง N1, 136/51 และ 808/51



การทดลองที่ 9 การทำ Immunohistochemistry

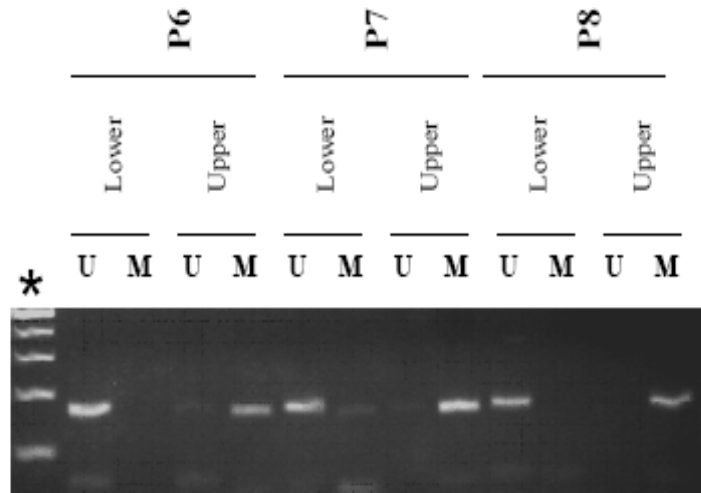
การทำ Immunohistochemistry จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ คนปกติ (n=6) เทียบกับ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (n=9) ผู้ป่วย eczema (n=7) และ ผู้ป่วย SCC (n=7)



รูปภาพ (A, B และ C) เป็นของคนปกติ (D, E และ F) เป็นของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งพบว่า ในส่วนของ parakeratosis มีการติดสี น้อยกว่า ปกติ (G, H และ I) เป็นของผู้ป่วย eczema ซึ่งพบว่า ในส่วนของ parakeratosis มีการติดสี น้อยกว่า ปกติ (J, K และ L) เป็นของผู้ป่วย SCC ซึ่งพบว่า ในส่วนของ parakeratosis มีการติดสี น้อยกว่า ปกติ

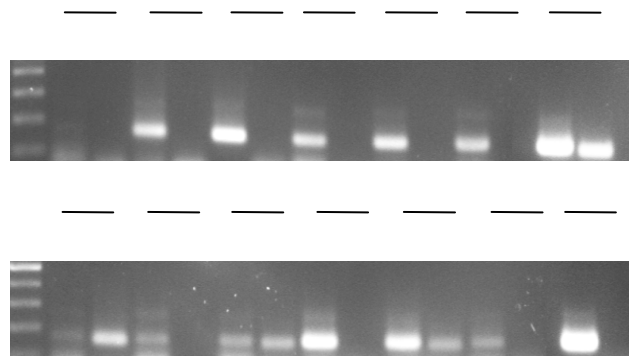
การทดลองที่ 10

การแยกชั้น ของ Epidermis เป็น ส่วนบน (Parakeratosis) และ ส่วนล่าง ของตัวอย่างผู้ป่วยโรค สะเก็ดเงิน (n=3) พบว่า ในในส่วนบนให้ผล methylation คิดเป็นร้อยละ 100



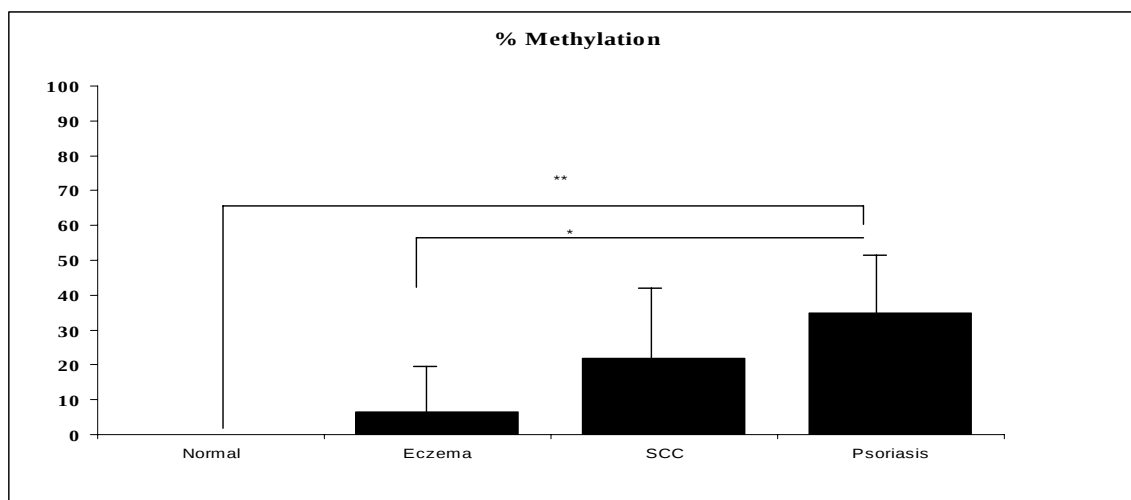
การทดลองที่ 11

การตรวจหา DNA methylation ของ ยีน ID4 ใน ชิ้นเนื้อ (Paraffin embedded tissues) จาก ตัวอย่างจาก ผู้ป่วย eczema (E) จำนวน 7 ราย และจากผู้ป่วย scc (S) จำนวน 7 ราย ผลที่ได้คือ พบการเกิด DNA methylation ในกลุ่ม eczema 1/7 ราย คิดเป็นร้อยละ 14.3 และ จากผู้ป่วย scc 3/7 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.8



การทดลองที่ 12 กราฟแสดง ร้อยละของปริมาณของ การเกิด ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น

พบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นใน คนปกติ (normal), โรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis), eczema และ scc คิดเป็น ร้อยละ 0, 6.47, 21.84 และ 34.81 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าระหว่าง คนปกติ กับ โรคสะเก็ดเงิน มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.005$ และ eczema กับ โรคสะเก็ดเงิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ โดยที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ SCC กับ โรคสะเก็ดเงิน



	% Methylation	SD
Normal	0	0
Eczema	6.47	17.12
SCC	21.84	28.16
Psoriasis	34.81	26.27

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ยีน GADD 45 gamma พบว่า ให้ผลเป็น unmethylation ในตัวอย่างที่เป็น เม็ดเลือดขาว (ทั้งแยก ชนิดของเซลล์ CD4, CD8 และ B cell) และ ตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อ ทั้งใน คนปกติ และ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับ ยีน ID4 พบว่า จำนวน ตัวอย่างที่เกิด DNA methylation ในตัวอย่าง ที่เป็นชิ้นเนื้อ ของคน ปกติ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน eczema และ SCC คิดเป็น ร้อยละ 0 , 66.6 , 14.3 และ 42.8 ตามลำดับ และ พบว่า ปริมาณของ DNA methylation คิดเป็น ร้อยละ 0, 34.81, 6.47 และ 21.84 ซึ่งมีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญ ระหว่าง คนปกติ กับ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ($p < 0.005$) และ ผู้ป่วย eczema กับ ผู้ป่วยโรคสะเก็ด เงิน ($p < 0.05$) ซึ่งสามารถบอกถึง ความสัมพันธ์ของการเกิด DNA methylation กับ โรคผิวหนังเหล่านี้ได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า การเกิด DNA methylation มีความสำคัญต่อการเกิด Parakeratosis ซึ่งเป็น ขบวนการสำคัญที่พบในโรคสะเก็ดเงิน แต่อย่างไรก็ตาม การเกิด Parakeratosis ยังสามารถเกิดในโรค scc และ eczema ได้ และ ขบวนการเกิด Parakeratosis ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป ความเกี่ยวเนื่อง ของ ยีน ID4 กับ โรคสะเก็ดเงิน มีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า การทำงานของ ID4 มักจะทำงานตรงข้ามกับ สมาชิกของ IDs (ID1, ID2 และ ID3) เช่น กรณี ID1 มักจะพบมากใน colorectal carcinoma [35] และ

gastric cancer [36] แต่ จะพบว่า ID4 ลดลง และมีรายงานถึงการเพิ่มของ ID1 ใน โรคมะเร็ง [37] และ ไม่มีรายงานถึง ID4

สำหรับ ขบวนการทำให้เกิด ID4 promoter methylation ที่สัมพันธ์กับ โรคมะเร็ง ยังไม่มีการ รายงานมาก่อน แต่มีรายงานที่เกี่ยวข้องเช่นการกระตุ้นของ Cdc42 สามารถทำให้เกิดการเพิ่มของ DNMTs และสามารถ ทำให้เกิด ID4 promoter methylation ใน colorectal carcinoma [38] ได้ และ Cdc42 ยัง สามารถ กระตุ้น Mixed Lineage Kinases3 (MLK3) [39] และ p21 –activated kinase (PAK) [40] ซึ่งมีความ เกี่ยวข้องกับ การเพิ่มของ phosphorylated p38 โดยที่ phosphorylated p38 มีความสำคัญอย่างมากในโรคมะเร็ง [41]

สำหรับการศึกษารุ่นนี้ เราพบหลักฐานของการเกิด ID4 promoter methylation ที่มีความ เกี่ยวข้องกับ Parakeratosis ซึ่งเป็นขบวนการสำคัญอย่างหนึ่งของโรคมะเร็ง และเกี่ยวกับการ เปลี่ยนแปลง (Cell differentiation) อาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อให้ถึงกลไกการทำงานใน เซลล์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Nickoloff, B.J. and F.O. Nestle, *Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities.* J Clin Invest, 2004. 113(12): p. 1664-75.
2. Christophers, E., *Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum.* Clin Exp Dermatol, 2001. 26(4): p. 314-20.
3. Raychaudhuri, S.P. and E.M. Farber, *The prevalence of psoriasis in the world.* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2001. 15(1): p. 16-7.
4. Schon, M.P. and W.H. Boehncke, *Psoriasis.* N Engl J Med, 2005. 352(18): p. 1899-912.
5. Bowcock, A.M. and J.G. Krueger, *Getting under the skin: the immunogenetics of*
6. Nickoloff, B.J., *The immunologic and genetic basis of psoriasis.* Arch Dermatol, 1999. 135(9): p. 1104-10.
7. Barker, J.N., *Genetic aspects of psoriasis.* Clin Exp Dermatol, 2001. 26(4): p. 321-5.
8. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.* Nature, 2004. 429(6990): p. 457-63.
9. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease.* Nat Rev Genet, 2005. 6(8): p. 597-610.
10. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications.* Cmaj, 2006. 174(3): p. 341-8.
11. Ruchusatsawat, K., et al., *SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis.* J Mol Med, 2006. 84(2): p. 175-82.
12. Zhou X, Krueger JG, Kao MC, Lee E, Du F, Menter A, et al. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics* 2003;13(1):69-78.
13. Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, et al. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 2005;11(1):43-9.

14. Zhang Q, Wang HY, Marzec M, Raghunath PN, Nagasawa T, Wasik MA. STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(19):6948-53.
15. Xu Y, Banville D, Zhao HF, Zhao X, Shen SH. Transcriptional activity of the SHP-1 gene in MCF7 cells is differentially regulated by binding of NF-Y factor to two distinct CCAAT-elements. *Gene* 2001;269(1-2):141-53.
16. Alvarez JV, Febbo PG, Ramaswamy S, Loda M, Richardson A, Frank DA. Identification of a genetic signature of activated signal transducer and activator of transcription 3 in human tumors. *Cancer Res* 2005;65(12):5054-62.
17. Zhan Q, Lord KA, Alamo I, Jr., Hollander MC, Carrier F, Ron D, et al. The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Mol Cell Biol* 1994;14(4):2361-71.
18. Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 1998;95(4):521-30.
19. Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA. GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 2002;192(3):327-38.
20. Fan W, Richter G, Cereseto A, Beadling C, Smith KA. Cytokine response gene 6 induces p21 and regulates both cell growth and arrest. *Oncogene* 1999;18(47):6573-82.
21. Chi H, Lu B, Takekawa M, Davis RJ, Flavell RA. GADD45beta/GADD45gamma and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4-independent IFNgamma production in T cells. *Embo J* 2004;23(7):1576-86.
22. Johansen C, Kragballe K, Westergaard M, Henningsen J, Kristiansen K, Iversen L. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 2005;152(1):37-42.
23. Oestreicher JL, Walters IB, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Surette J, Schwertschlag U, Dorner AJ, Krueger JG, Trepicchio WL (2001) Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J.* 1:272-287
24. Rigolet M, Rich T, Gross-Morand MS, Molina-Gomes D, Viegas-Pequignot E, Junien C (1998) cDNA cloning, tissue distribution and chromosomal localization of the human ID4 gene. *DNA Res.* 5:309-313
25. Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 20:429-440
26. Kondo T, Raff M (2000) The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J.* 19:1998-2007
27. Andres-Barquin PJ, Hernandez MC, Israel MA (1999) Id4 expression induces apoptosis in astrocytic cultures and is down-regulated by activation of the cAMP-dependent signal transduction pathway. *Exp Cell Res.* 247:347-355

28. Desprez PY, Sumida T, Coppe JP (2003) Helix-loop-helix proteins in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 8:225-239
29. Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ, Raval A, Liu TH, Ding W, Mao C, Liu S, Smith LT, Lee S, Rassenti L, Marcucci G, Byrd J, Caligiuri MA, Plass C (2005) Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet*. 37:265-274
30. Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Li R, So S, Yuen ST, Leung SY (2003) Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene*. 22:6946-6953
31. Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE, Hoon DS (2005) Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene*. 24:4721-4727
32. Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS (2004) Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res*. 10:7475-7483
33. Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW (2006) Id proteins expression in prostate cancer: high-level expression of Id-4 in primary prostate cancer is associated with development of metastases. *Mod Pathol*. 19:931-941
34. Wu Q, Hoffmann MJ, Hartmann FH, Schulz WA (2005) Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. *Mol Cancer*. 4:16
35. Wilson JW, Deed RW, Inoue T, Balzi M, Becciolini A, Faraoni P, Potten CS, Norton JD (2001) Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res*. 61:8803-8810
36. Jang TJ, Jung KH, Choi EA (2006) Id-1 gene downregulation by sulindac sulfide and its upregulation during tumor development in gastric cancer. *Int J Cancer*. 118:1356-1363
37. Björntorp E, Parsa R, Thornemo M, Wennberg AM, Lindahl A. (2003) The helix-loop-helix transcription factor Id1 is highly expressed in psoriatic involved skin. *Acta Derm Venereol*. 83(6):403-9.
38. Gomez Del Pulgar T, Valdes-Mora F, Bandres E, Perez-Palacios R, Espina C, Cejas P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Casado E, Gonzalez-Baron M, Garcia-Foncillas J, Lacal JC (2008) Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism. *Int J Oncol*. 33:185-193
39. Du Y, Bock BC, Schachter KA, Chao M, Gallo KA (2005) Cdc42 induces activation loop phosphorylation and membrane targeting of mixed lineage kinase 3. *J Biol Chem*. 280:42984-42993
40. Wery-Zennaro S, Zugaza JL, Letourneur M, Bertoglio J, Pierre J (2000) IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38 MAPK-dependent pathways in keratinocytes. *Oncogene*. 19:1596-1604

41. Johansen C, Kragballe K, Westergaard M, Henningsen J, Kristiansen K, Iversen L (2005) The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. Br J Dermatol. 152:37-42

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากงานวิจัยในเบื้องต้นนี้บ่งชี้ว่าการเกิด DNA methylation ในส่วน โปรโมเตอร์ ของยีน ID4 ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด Parakeratosis ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบมากในโรคนี้ นับว่าเป็นการค้นพบเป็นครั้งแรกที่มีการรายงาน (submitted paper, รายละเอียดตามเอกสารที่แนบ) แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งกลไกการเกิด DNA methylation ของ ยีนนี้ และ หน้าที่ของ ยีนนี้ ในโรคสะเก็ด จึงเป็นเรื่องที่น่าจะมีการศึกษาต่อไป เช่น 1) กลไกการเกิดภาวะ DNA methylation ของ ID4 promoter 2) หน้าที่ของ ID4 รวมทั้ง 3) ความสัมพันธ์ของ ID4 promoter methylation กับ ความรุนแรงของโรค ของโรคสะเก็ดเงินและอาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีป้องกันและรักษาโรคแบบใหม่ต่อไป

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)
(อยู่ในระหว่างการแก้ไข manuscript)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

6. ภาคผนวก ประกอบด้วย reprint หรือ manuscript และบทความสำหรับการ
เผยแพร่

6.1 การเผยแพร่โปรเตอร์

- 1) ¹ Wongpiyabovorn J, Ruchusatsawat K Youngsathi S, Protjaroen P, Hirankarn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation status in Psoriasis. การประชุมวิชาการนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส (การประชุมของสกว) . 16-18 ตุลาคม 2551. ณ โรงแรมชะอำ รีสอร์ท บีช
- 2) Phantipa Protjaroen, Kriangsak Ruchusatsawat, and Jongkonnee Wongpiyabovorn MD. The promoter methylation of cyclooxygenase-2 gene in psoriasis. The 12 th National Graduate Research Conference 12-13 กุมภาพันธ์ 2552 ณ คณะวิศวกรรม มหาวิทยาลัย ขอนแก่น
- 3) .Ruchusatsawat, K., Protjaroen, P., Shuangshoti, S., Mutirangura, A., Wongpiyabovorn, J.^{*} *Inhibitor of DNA binding/Inhibitor of differentiation 4 (ID4) Promoter methylation associated with abnormal differentiation in Psoriasis* การประชุมวิชาการนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส (การประชุมของสกว) . 15-17 ตุลาคม 2552. ณ โรงแรมชะอำ รีสอร์ท บีช

6.2 manuscript (เอกสารที่แนบ)

Promoter methylation of Inhibitor of DNA binding/Inhibitor of differentiation 4 (ID4) is associated with abnormal keratinocyte differentiation (parakeratosis) in skin diseases

Kriangsak Ruchusatsawat¹, Phantipa Protjaroen², Shanop Shuangshoti³, Apiwat Mutirangura⁴, Jongkonnee Wongpiyabovorn⁵

¹National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Inter-Department of Medical Microbiology, Faculty of Graduate School
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

⁴Center of Excellence in Molecular Genetics of Cancer and Human Diseases,
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

⁵Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand

Correspondence to: Jongkonnee Wongpiyabovorn, MD, PhD. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 road, Bangkok 10330, Email: Jongkonnee.w@chula.ac.th, Phone: (662) 256-4132 ext 627, Fax: (662) 252-5952

Keywords: ID4, DNA Methylation, Psoriasis, Immunohistochemistry

Abbreviation: ID4, Inhibitor of DNA binding/Inhibitor of differentiation 4; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; bHLH, basic helix-loop-helix family; TGS, tumor suppressor gene ; PASI, Psoriasis Area and Severity Index; MSP, Methylation Specific PCR; LCM, Laser capture microdissection; IHC, Immunohistochemistry; MLK3, Mixed Lineage Kinase3; PAK, p21-activated kinase

Abstract

Abnormal proliferation and differentiation of keratinocytes occur in many skin diseases. Parakeratosis is an abnormal maturation of the keratinocytes in which keratinization of epithelial cells is incomplete and abnormal retention of keratinocyte nuclei in stratum corneum. It occurs in malignant, inflammatory as well as autoimmune skin diseases as in eczema, squamous cell carcinoma (SCC) and psoriasis. Down-regulation of ID4 protein in epidermis has been described in association with psoriasis. The gene encoding ID4 is located within psoriasis susceptibility 1 (PSORS1). Moreover, promoter hypermethylation of *ID4* has been described in several cancers. Here, we report a previously undescribed methylated pattern of the *ID4* promoter in lesional psoriatic skin. We investigated 11 cell lines, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and micro-dissected epithelium of skin from normal subjects and lesional skin from psoriatic patients. All normal cells were unmethylated. *ID4* promoter methylation was detected in psoriasis. The *ID4* promoters of cells from the upper and lower part of psoriatic epidermis were hypermethylated and unmethylated, respectively. By immunohistochemistry, the parakeratotic keratinocytes in the upper layer of psoriasis, chronic eczema and SCC lacked ID4 protein, whereas the keratinocytes in the lower layer were densely stained. Normal epidermal keratinocytes consistently expressed ID4 protein. The lack of ID4 expression in psoriatic keratinocytes, chronic eczema and SCC may be epigenetically controlled. This finding is a novel example of a link between gene-specific promoter hypermethylation and abnormal cellular differentiation in the skin diseases. In addition, *ID4* methylation is a candidate marker for abnormal terminal differentiation of keratinocyte, particularly parakeratosis.

Introduction

The skin is a highly regulated organ maintaining tight control of proliferation, differentiation, and apoptosis. Terminal differentiation of keratinocyte is the final step which granular cells through to cornified cells. During terminal differentiation, keratinocytes lose nucleus and keratohyaline granules and keratin filaments are compacted. Parakeratosis is an abnormal maturation of the keratinocyte in which keratinization of epithelial cells is incomplete and abnormal retention of keratinocyte nucleus in stratum corneum. It appears clinically as scale. It occurs in malignant, inflammatory as well as autoimmune skin diseases such as squamous cell carcinoma (SCC), eczema, lichen planus, and psoriasis [1]. Failure in processing of profilaggrin to filaggrin monomers results in retention of the keratohyaline granules in the stratum corneum has been reported to be a cause of abnormal keratinization and differentiation [2]. However, the induction mechanisms and maintenance of parakeratosis remain unclear.

Psoriasis, a T-cell mediated autoimmune disease, is characterized by keratinocyte hyperproliferation, abnormal terminal differentiation and inflammation in both the epidermis and dermis [3,4]. One of the histological hallmarks of psoriasis is confluent parakeratosis infiltrated by neutrophils [1]. The disease affects approximately 2-4% of the population worldwide [5,6]. Both genetic [7] and environmental factors [8] influence the development of disease. Gene-gene interaction and gene-environmental interaction have been proposed to play a role in induction and maintenance of the disease. Accumulating data by genome-wide scans and association studies have recognized multiple major susceptible loci for psoriasis, especially in the major histocompatibility complex. Global genome-wide expression studies have identified a large number of genes related to proliferation, differentiation and inflammatory processes that could play a role in the pathogenesis and therapy of psoriasis [9]. Despite the discovery of disease-associated loci by genome-wide scans and genome-wide expression studies, the specific genes that play a contributory role in disease development and progression still remain unclear. Epigenetic phenomena have also been implicated in the pathogenesis of psoriasis. We reported hypomethylation of the *SHP-1* promoter 2 in the epidermis of psoriatic lesions [10]. Other reports have illustrated *p16* hypomethylation in bone marrow mononuclear cells from psoriatic patients [11,12].

Recent large-scale gene expression studies using cDNA microarray have identified down-regulation of ID4 in psoriatic skin lesion [13,14]. The ID4 gene maps to the PSORS1 on chromosome 6p21.3, which is the major susceptible locus for psoriasis. However, the precise mechanism in down regulation of ID4 is still uncertain. ID4 is a member of the basic helix-loop-helix (bHLH) family, although the ID protein lacks a basic region. It is mainly expressed in the thyroid, brain, fetal tissue and some nervous system tumor cell lines [15]. It behaves as a dominant negative inhibitor of gene transcription [16]. ID4 has been reported to be an important factor for cell proliferation and differentiation [17,18] and apoptosis [19]. Down-regulation of ID4 protein has been demonstrated to induce tumor cell dedifferentiation in colorectal cancer. ID4 hypermethylation can be used a prognostic marker independent of stage of CRC [20]. Beside, ID4 was also linked with the regulation of oligodendrocyte development and differentiation [21] *ID4* has been proposed to be a tumor suppressor gene (TSG) in various types of cancer such as malignant lymphoma [22], gastric adenocarcinoma [23], breast cancer [24] and colorectal carcinoma [20]. Conversely, *ID4* plays a role as an oncogene in prostate cancer [25] and bladder cancer [26]. Other ID proteins (ID1, ID2 and ID3) are expressed in normal human epidermal skin and are dysregulated in SCC. The majority of keratinocytes of poorly differentiated SCC highly expressed ID1 and ID3 compared to well differentiated SCCs. Whereas, ID2 expression levels are similar in each state [27] However there was no any report of ID4 in SCC of the skin. Aberrant CpG methylation in the 5' promoter regions of TSGs is a crucial epigenetic phenomenon in various cancers [28]. Transcriptional silencing of *ID4* by promoter hypermethylation has been reported in many cancers, including cholangiocarcinoma, breast cancer, malignant lymphoma and gastric adenocarcinoma [23,24];[29,30]. However, the precise mechanism in down regulation of ID4 is still uncertain. This study, we explored whether *ID4* is silenced by promoter hypermethylation in psoriasis. Moreover, the expression of ID4 in normal skin, psoriasis, eczema and SCC was investigated.

Materials and Methods

Cell lines

Six epithelial cell lines: Hela, Hep2, SIHA, RKO, SW480, and HaCaT and 5 hematopoietic cell lines: Daudi, Jurkat, Molt4, HL-60 and K562 were used in this study. All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

or RPMI1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, UK) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO, USA) and antibiotics (50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin). All cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂.

Patients and Controls

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 27 subjects (7 healthy volunteers and 20 patients with chronic plaque psoriasis) and tissues biopsies of 27 subjects (6 healthy volunteers, 9 patients with chronic plaque psoriasis, 6 patients with chronic eczema and 6 patients with SCC) were studied. All psoriatic, eczema and SCC patients were diagnosed as chronic plaque type psoriasis, chronic eczema and SCC, respectively by a dermatologist at King Chulalongkorn Memorial Hospital. Patients with psoriatic arthritis or other autoimmune diseases were excluded from the study. All patients were free from systemic skin therapies for at least 4 weeks or topical skin therapies for at least 2 weeks prior to sample collection. Control subjects were normal healthy subjects recruited from elective plastic surgery cases at King Chulalongkorn Memorial Hospital. All of them had no personal or family history of autoimmune disease. The study was approved by the ethics committee of King Chulalongkorn University and all participants provided informed consent.

Laser capture microdissection

Epidermal skin from paraffin-embedded tissue of 9 psoriatic patients and 6 normal subjects were micro-dissected using The PALM MicroLaser Microdissection System (P.A.L.M. MicroLaser Technologies AG, Burnried, Germany). The samples were stained with Hematoxylin and Eosin (Arcturus Biosciences Inc, CA, and USA) for accurate selection of epidermal skin. The laser-dissected epidermis was removed from the slide by laser cutter pulse and pushed directly into the cap of a microcentrifuge tube.

DNA extraction and Bisulfite Modification

Dissected tissues were digested with 50 µl of proteinase K containing lysis buffer at 50°C for 5 hours, followed by heated deactivation of proteinase K at 95°C for 10 minutes. After extraction, all DNA samples were treated with sodium bisulfite using the EZ DNA methylation Kit™ (Zymo Research, Orange, CA, USA). Briefly,

500 ng of extracted DNA was modified using sodium bisulfite to convert unmethylated (cytosine to uracil) but not methylated DNA.

DNA Methylation Status Detection by Methylation Specific PCR (MSP) and Bisulfite Sequencing

ID4 Promoter region (-615 to +139) was analyzed for methylation using a MSP method and verified by bisulfite cloning and sequencing as previously described [31]. Bisulfite oligonucleotide sequences of ID4 were derived from Genbank NT 007592. Briefly, this method distinguishes unmethylated from methylated alleles in a given gene based on sequence changes produced after bisulfite treatment of DNA. Primers were designed to distinguish methylated from unmethylated DNA in bisulfite-modified DNA. For MSP, 1 μ L of modified DNA was amplified using MSP primers that specifically recognized the unmethylated DNA (U forward 5'-GGT AGT TG GAT TTT TTG TTT TTT AGT ATT-3' U reverse 5'-AAC TAT ATT TAT AAA ACC ATA CAC CCC A-3', product size 157 bp) or methylated DNA (M forward 5'-TAG TCG GAT TTT TCG TTT TTT AGT ATC-3' M reverse 5'-CTA TAT TTA TAA AAC CGT ACG CCC CG-3', product size 161 bp) [32].

Determination of mRNA Expression Level by Real Time RT-PCR

Total RNA was extracted from cell lines, 5 cc from each whole blood sample using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Two μ g of total RNA samples were reversely transcribed with oligo dT primer. For Real Time PCR, 1 μ l of cDNA was amplified using ID4 primer and GAPDH primer as previously described. For ID4 mRNA detection, touchdown PCR was used and CT values were normalized in reference to the housekeeping gene GAPDH, as previously reported [32,33].

Immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemistry was performed on 4- μ m formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections mounted on positively charged glass slides. Tissue sections were baked overnight at 60°C. Heat-induced epitope retrieval was carried out by placing slides in a pressure cooker containing Ventana Cell Conditioning 1 (CC1) solution (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), and microwaving for 15 minutes on the high setting in a 900 watt microwave oven. Prior to incubation with the

primary antibody directed against ID4 protein (Santa Cruz Biotechnology, Inc. at dilution 1:25), sections were blocked for endogenous peroxidase and biotin. Immunohistochemistry was performed by an automated immunostainer (Ventana benchmark LT, Tucson, USA).

Statistical Analysis

Methylation status and mRNA expression level were compared between groups by unmatched two-tail *t* test method using the SPSS software for windows 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A *P* value of < 0.05 was considered to be significant.

Results

Inverse correlation between DNA methylation status and mRNA expression level in cell lines

ID4 methylation in cell lines as determined by MSP is exhibited in Figure 1A. Most of the epithelial cell lines including Hela, HEp2, SIHA and RKO showed only a methylation-specific band by MSP and were determined to be hypermethylated. SW480 showed both methylation-specific and unmethylation-specific bands. Conversely, HaCaT showed only an unmethylation-specific band and was determined to be unmethylated. In hematopoietic cell lines, Daudi, Jurkat, Molt4, HL-60 showed only a methylation-specific band, whereas, K562 showed both methylation-specific and unmethylation-specific bands. To verify the MSP technique, bisulfite cloning and sequencing of *ID4* promoter methylation of HEp2, SW480 and HaCaT was done as shown in Figure 1B. Most CpG dinucleotides of HEp2 and HaCaT were methylated and unmethylated, respectively. However, variable numbers of methylated CpGs were discovered in SW480 alleles. This partial methylation may explain how SW480 MSP yielded both methylated and unmethylated amplicons.

Real-time RT-PCR revealed an inverse correlation between *ID4* mRNA expression and DNA methylation status in all cell lines. Hela, Hep2, SiHA, RKO, Daudi, Jurkat, Molt4, HL-60, K562 lacked *ID4* mRNA expression. In contrast, HaCaT expressed the highest *ID4* mRNA level (19.4) (Table 1). Similar to many genes, *ID4* methylation may down regulate expression.

Hypermethylation of *ID4* promoter associated with psoriasis

Next, we explored *ID4* promoter methylation in microdissected epidermis from paraffin-embedded tissue of psoriatic skin and compared this to normal epidermis using the MSP method. Six out of nine micro-dissected psoriatic epidermal skins showed both methylated and unmethylated *ID4* amplicons. In contrast, all of the six micro-dissected normal skins showed unmethylation of the *ID4* promoter (Figure 2A). The average methylation level in psoriatic epidermis (34.81%) was significantly increased compared to normal skin (0%) ($p=0.004$) (Fig 2C). Bisulfite cloning and sequencing of the *ID4* promoter region, which represented 26 CpG sites, was performed in DNA from micro-dissected epidermis from 1 healthy control with unmethylated *ID4* and 2 psoriasis patients with semihypermethylated *ID4* by MSP. Nearly all clones from healthy control (9/10 clones) showed unmethylated CpG. In contrast, almost half of all clones from both psoriatic patients show two distinct epigenetic-modified populations. There were either heavily methylated or almost completely unmethylated CpGs (Figure 2B). For *ID4* promoter methylation in PBMCs, the average methylation level in psoriasis patients was not significantly increased compared to healthy volunteers (Data not shown).

Loss of *ID4* protein expression associated with parakeratotic keratinocytes in psoriasis, chronic eczema and SCC

The lesional skin samples of 9 psoriasis and 6 normal skins from plastic surgery cases were analyzed for *ID4* protein by immunohistochemistry. Whereas normal epidermis was diffusely positive, only in the lower aspect (near the dermis) of psoriatic skin expressed *ID4*. There was a significant decrease in both *ID4* nuclear and cytoplasmic staining in all keratinocytes in the upper part of the epidermis (parakeratosis). To investigate whether the down-regulation of *ID4* protein occurs in other skin diseases with aberrant keratinocyte differentiation, 6 chronic eczema and 6 SCC were analyzed. Parakeratotic nuclei and cytoplasm of keratinocyte in the upper part of epidermis of all chronic eczema and SCC also showed decrease staining of *ID4* as shown in Figure 3A-L.

To explore the role of DNA methylation controlling *ID4* protein expression in psoriatic epidermis, LCM was used for separating the upper (*ID4*-non-expressing) and the lower (*ID4*-expressing) from psoriatic epidermis using ICH as a guide. From all 3 psoriatic patients, the upper layers of psoriatic epidermis showed only methylated bands while the lower layers of psoriatic epidermis showed only unmethylated bands

(Figure 4). This finding confirmed down-regulation of ID4 protein expression resulted from methylation of ID4 promoter. Moreover, increased methylation of ID4 promoter may be a key mechanism in the abnormal differentiation of the psoriatic keratinocyte.

Discussion

Although promoter methylation has been proposed to play a role in cellular differentiation and in the pathogenesis of autoimmune diseases, there have been very few reports to substantiate this [34]. We demonstrated *SHP-1* was methylated in some lymphomas and unmethylated in normal white blood cells, as well as methylated in normal skin and demethylated in psoriasis [10]. Recently, two groups reported that *p16*, methylated in several cancers, is also methylated in psoriasis [11,12]. Therefore, it is reasonable to hypothesize that if certain genes are under epigenetic control in cancer, such controls might also be found in psoriasis. However, our previous study in *SHP-1* demonstrated that the pattern of DNA methylation in psoriasis may be different from cancer. The present study reports a unique methylation pattern of *ID4* in lesional psoriatic skin with unmethylated and methylated *ID4* expressed in the lower and upper layers of psoriatic skin, respectively. To our knowledge, this is the first demonstration that promoter methylation may be involved in the cellular differentiation process. Moreover, alterations of the epigenetic process can coexist in abnormal skin.

Four members in the ID family, namely ID1, ID2, ID3 and ID4, have been previously described. Although, they are in the same family, these proteins serve different roles. ID proteins have been reported to be regulators of cell cycle control, embryonic development, and angiogenesis in normal biological processes. In mouse and rat embryogenesis, ID4 expression is restricted to the early development of the nervous system and oligodendrocyte precursor cells, whereas, ID1-ID3 are expressed highly in the later stages of nervous system and oligodendrocyte development [18,19]; [35,36]. The role of ID is also well described in several cancers; up-regulation of ID1 has been suggested as a prognostic maker in colorectal adenocarcinoma [37] and gastric cancer [38], whereas ID4 is reduced in these cancers [20, 23].

Methylation of the *ID4* promoter has been implicated in differentiation and metastasis in malignant diseases but not in non-malignant disease. Our study is the first to report *ID4* promoter methylation in relation to psoriasis. ID4 promoter

hypermethylation is present in psoriatic skin decreasing ID4 expression. However, further genetic approach is necessary to elucidate whether ID4 is the candidate gene for PSORS1.

The underlying defects that induce *ID4* promoter methylation in psoriasis are still unknown. Cdc42 was reported to induce *ID4* promoter methylation in colorectal adenocarcinoma by modulation of DNMT levels [39]. In addition, Cdc42 has been widely described to influence expression of DNMTs in many cancers [28]. Cdc42 has been shown to activate the Mixed Lineage Kinase3 (MLK3) and p21-activated kinase (PAK) [40] pathways that are involved in the JNK pathway thereby increasing phosphorylated p38 [41]. Increased phosphorylated p38 in the skin is an important pathogenetic step in psoriasis [42,43] and it is tempting to hypothesize a relationship between Cdc42 and *ID4* promoter methylation in psoriasis.

Abnormal retention of the nucleus in the stratum corneum, referred to “parakeratosis”, is the result of abnormal terminal differentiation of keratinocytes, and clinically appears as a silvery scale, providing one of the typical clinical features of psoriasis. Our study demonstrates down-regulation of ID4 related to parakeratotic keratinocyte which has never been reported. By immunohistochemistry, psoriatic, chronic eczema and SCC keratinocytes in the lower part of epidermis expressed ID4 protein while parakeratotic keratinocytes in the upper part did not. This finding support many previous reports in a variety of malignant diseases that expression of ID4 protein relates to differentiation of the cells. Down-regulation of ID4 protein promotes dedifferentiation and proliferation in various malignant cancer cells such as colorectal cancer, gastric adenocarcinoma, esophageal adenocarcinoma, cholangiocarcinoma, and breast cancer [23,24];[29,38]. Keratinocytes differentiation requires multistep molecular events. To our knowledge, our study may be the first which included an epigenetic event, particularly in parakeratosis formation. Here we demonstrated down regulation of ID4 in all parakeratotic keratinocyte. Therefore, it is more likely that ID4 methylation may be an early step for parakeratosis development. Because the increase in parakeratotic cells are common in several abnormal skin conditions, determining the molecular level of this condition should be an important clue for better understanding and future treatment.

In conclusion, this study documents additional evidence that ID4 may be important in parakeratosis and the pathogenesis of psoriasis. DNA methylation may

be a key mechanism to down regulate ID4. Moreover, this epigenetic change may be closely related to cellular differentiation. Specifically *ID4* promoter hypermethylation correlates with parakeratosis of the epidermis. Thus, ID4 may be an interesting candidate for the development of molecular definition of parakeratosis and new mechanism in the future.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund (TRF) TRG5180001, RMU5080064 and Mutirangura Senior Research Scholar TRF, Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine and Lupus Research Unit, Chulalongkorn University, Thailand. The authors are grateful to Dr. Santhitham Prom-on for bioinformatics data, Prof Paul Scott Thorner for reviewing the manuscript, and Ms Mookda Chaipipat for performing immunohistochemical study.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References:

- 1 Brady SP (2004) Parakeratosis. *J Am Acad Dermatol.* 50:77-84
- 2 Northcutt AD, Nelson DM, Tschen JA (1991) Axillary granular parakeratosis. *J Am Acad Dermatol.* 24:541-544
- 3 Bowcock AM, Krueger JG (2005) Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol.* 5:699-711
- 4 Luba KM, Stulberg DL (2006) Chronic plaque psoriasis. *Am Fam Physician.* 73:636-644
- 5 Greaves MW, Weinstein GD (1995) Treatment of psoriasis. *N Engl J Med.* 332:581-588
- 6 Nickoloff BJ, Nestle FO (2004) Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 113:1664-1675
- 7 Burden AD, Javed S, Bailey M, Hodgins M, Connor M, Tillman D (1998) Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. *J Invest Dermatol.* 110:958-960
- 8 Bos JD, De Rie MA (1999) The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today.* 20:40-46
- 9 Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, Gudjonsson JE, et al. (2009) Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet.* 41:199-204
- 10 Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Shuangshoti S, Hirankarn N, Mutirangura A (2006) SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med.* 84:175-182
- 11 Zhang K, Zhang R, Li X, Yin G, Niu X, Hou R (2007) The mRNA expression and promoter methylation status of the p16 gene in colony-forming cells with high proliferative potential in patients with psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 32:702-708
- 12 Chen M, Cui PG, Yao X, Cao YH, Gong JQ, Li AS, Chen ZQ (2007) [The methylation locus and frequency pattern on p16 INK4a gene promoter CpG in epidermis of patients with psoriasis]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 24:674-676
- 13 Oestreicher JL, Walters IB, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Surette J, Schwertschlag U, Dorner AJ, Krueger JG, Trepicchio WL (2001) Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J.* 1:272-287
- 14 Bowcock AM, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Fernandez-Vina MA, Menter A (2001) Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet.* 10:1793-1805
- 15 Rigolet M, Rich T, Gross-Morand MS, Molina-Gomes D, Viegas-Pequignot E, Junien C (1998) cDNA cloning, tissue distribution and chromosomal localization of the human ID4 gene. *DNA Res.* 5:309-313
- 16 Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 20:429-440
- 17 Desprez PY, Sumida T, Coppe JP (2003) Helix-loop-helix proteins in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 8:225-239

- 18 Kondo T, Raff M (2000) The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J.* 19:1998-2007
- 19 Andres-Barquin PJ, Hernandez MC, Israel MA (1999) Id4 expression induces apoptosis in astrocytic cultures and is down-regulated by activation of the cAMP-dependent signal transduction pathway. *Exp Cell Res.* 247:347-355
- 20 Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS (2004) Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res.* 10:7475-7483
- 21 Samanta J, Kessler JA (2004) Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development.* 131:4131-4142
- 22 Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ, Raval A, Liu TH, Ding W, Mao C, Liu S, Smith LT, Lee S, Rassenti L, Marcucci G, Byrd J, Caligiuri MA, Plass C (2005) Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet.* 37:265-274
- 23 Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Li R, So S, Yuen ST, Leung SY (2003) Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene.* 22:6946-6953
- 24 Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE, Hoon DS (2005) Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene.* 24:4721-4727
- 25 Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW (2006) Id proteins expression in prostate cancer: high-level expression of Id-4 in primary prostate cancer is associated with development of metastases. *Mod Pathol.* 19:931-941
- 26 Wu Q, Hoffmann MJ, Hartmann FH, Schulz WA (2005) Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. *Mol Cancer.* 4:16
- 27 Langlands K, Down GA, Kealey T (2000) Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 60:5929-5933
- 28 Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3:415-428
- 29 Uhm KO, Lee ES, Lee YM, Kim HS, Park YN, Park SH (2008) Aberrant promoter CpG islands methylation of tumor suppressor genes in cholangiocarcinoma. *Oncol Res.* 17:151-157
- 30 Hagiwara K, Nagai H, Li Y, Ohashi H, Hotta T, Saito H (2007) Frequent DNA methylation but not mutation of the ID4 gene in malignant lymphoma. *J Clin Exp Hematop.* 47:15-18
- 31 Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH (1997) Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet.* 16:16-17
- 32 Noetzel E, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E (2008) Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. *BMC Cancer.* 8:154
- 33 Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H (2003) Up-regulation of interleukin-13 receptor alpha1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 33:31-40

- 34 Strickland FM, Richardson BC (2008) Epigenetics in human autoimmunity. Epigenetics in autoimmunity - DNA methylation in systemic lupus erythematosus and beyond. *Autoimmunity*. 41:278-286
- 35 Jen Y, Manova K, Benezra R (1997) Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev Dyn*. 208:92-106
- 36 Riechmann V, Sablitzky F (1995) Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system. *Cell Growth Differ*. 6:837-843
- 37 Wilson JW, Deed RW, Inoue T, Balzi M, Becciolini A, Faraoni P, Potten CS, Norton JD (2001) Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res*. 61:8803-8810
- 38 Jang TJ, Jung KH, Choi EA (2006) Id-1 gene downregulation by sulindac sulfide and its upregulation during tumor development in gastric cancer. *Int J Cancer*. 118:1356-1363
- 39 Gomez Del Pulgar T, Valdes-Mora F, Bandres E, Perez-Palacios R, Espina C, Cejas P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Casado E, Gonzalez-Baron M, Garcia-Foncillas J, Lacal JC (2008) Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism. *Int J Oncol*. 33:185-193
- 40 Du Y, Bock BC, Schachter KA, Chao M, Gallo KA (2005) Cdc42 induces activation loop phosphorylation and membrane targeting of mixed lineage kinase 3. *J Biol Chem*. 280:42984-42993
- 41 Wery-Zennaro S, Zugaza JL, Letourneur M, Bertoglio J, Pierre J (2000) IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38 MAPK-dependent pathways in keratinocytes. *Oncogene*. 19:1596-1604
- 42 Johansen C, Kragballe K, Westergaard M, Henningsen J, Kristiansen K, Iversen L (2005) The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 152:37-42
- 43 Haase I, Hobbs RM, Romero MR, Broad S, Watt FM (2001) A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest*. 108:527-536

Figure legends

Figure 1. *ID4* promoter methylation in cell lines. (A) *ID4* promoter methylation of epithelial and hematopoietic cell lines as detected by MSP. The 161 and 157 bp PCR products represent nonmethylation and methylation, and are indicated by *U* and *M*, respectively. Cell sources of genomic DNA are listed above each lane. * indicates standard size DNA markers. (B) Methylation status of CpG nucleotides in the promoter of HEp2, SW 480 and HaCaT was confirmed by bisulfite DNA sequencing. The uppermost *vertical bar* identifies the relevant nucleotide sequence in GenBank (Accession NT007592). The *numbers* and *arrows* indicate the start and end sequence nucleotide in relation to the transcriptional start codon, ATG (nucleotide 1). The *numbers* of the line below indicate CpG nucleotides. *Each circle* indicates the methylation status of each selected clone. *Black* and *white circles* are methylated and unmethylated CpG dinucleotides, respectively.

Figure 2. *ID4* promoter methylation in normal and psoriatic skin. (A) *ID4* promoter methylation status of 15 microdissected epidermis from 9 psoriatic patients and 6 normal subjects were analyzed using the MSP technique. The 161 and 157 bp PCR products reflecting nonmethylation and methylation, are indicated by *U* and *M*, respectively. Sample sources of genomic DNA are listed above each lane. HEp2, HaCaT, SW480 were used as positive controls for hypermethylation, nonmethylation and semi-methylation, respectively. * indicates the standard size DNA marker. (B) Bisulfite cloning and sequencing using primers covering all 26 CpG sites in MSP region was performed to verify the MSP results. Microdissected epidermis from two psoriatic patients (P6 and P7) and one normal subject (N1) that represented hypermethylation, semi-methylation and nonmethylation, respectively, were analyzed to identify methylation patterns.

(C) The percentage of *ID4* methylation was compared between normal skin and psoriatic skin. T indicates standard deviation (SD). The star (★) indicates significant differences of $p=0.004$ psoriatic compared to normal epidermis.

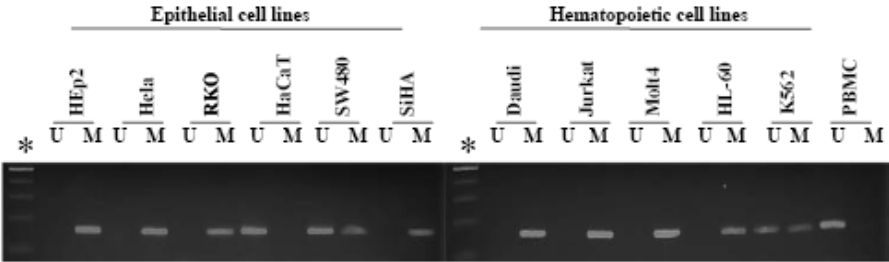
Figure 3. Immunohistochemical detection of *ID4* in skin from psoriatic patients and normal subject using a polyclonal antibody to *ID4* as described. (A-C) is normal skin from a normal patient and (D-F) is lesional skin from psoriatic patient. (G-I) is lesional skin from SCC patients and (J-K) is lesional skin from eczema patients. A,

D, G and J show the light microscopic appearances (hematoxylin and eosin, x10). Normal skin displays nuclear and cytoplasmic staining of ID4 in all layers of keratinocytes (B x10 and C x20). Keratinocytes in lesional skin from psoriatic, chronic eczema and SCC patients displays nuclear and cytoplasmic staining of ID4 only in the lower part of the epidermis. . Parakeratotic keratinocyte in psoriatic, chronic eczema and SCC skin lack of nuclear and cytoplasmic staining of ID4. A Munro's microabscess, a collection of neutrophil in stratum corneum of psoriatic lesion, displays both nuclear and cytoplasmic staining of ID4 (E,H,K x10 and F,I,L x20)

Figure 4. *ID4* promoter methylation analysis of psoriatic epidermis comparing microdissected upper and lower epidermis. LCM was use to separate keratinocytes from the upper (ID4-negative) and lower parts of the epidermis (ID4-positive). Munro's microabscesses were removed from the slide by cutter pulse before capturing upper keratinocytes. Specimens from 3 psoriatic patients were analyzed for ID4 promoter methylation status by the MSP technique. The 161 and 157 bp PCR products, reflecting nonmethylation and methylation, are indicated by *U* and *M*, respectively. Sample sources of genomic DNA are listed above each lane. HEP2, HaCaT, and SW480 were used as positive controls for hypermethylation, nonmethylation and semi-methylation, respectively. * indicates standard size DNA markers.

Figure 1

A



B

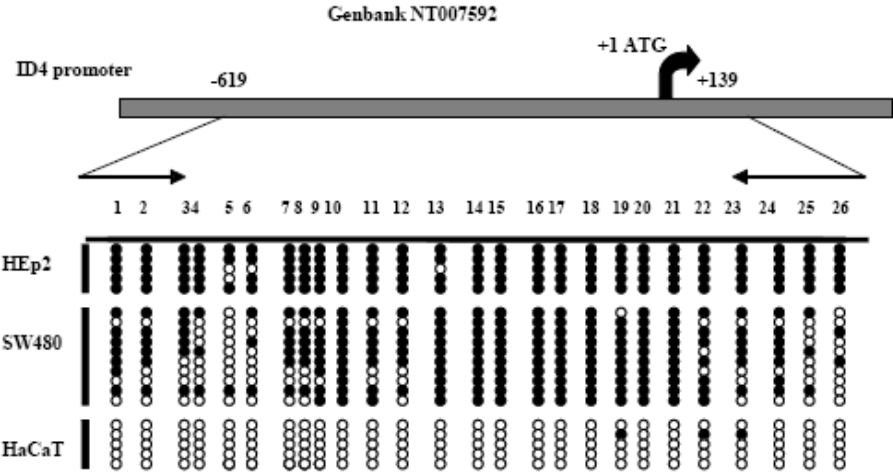
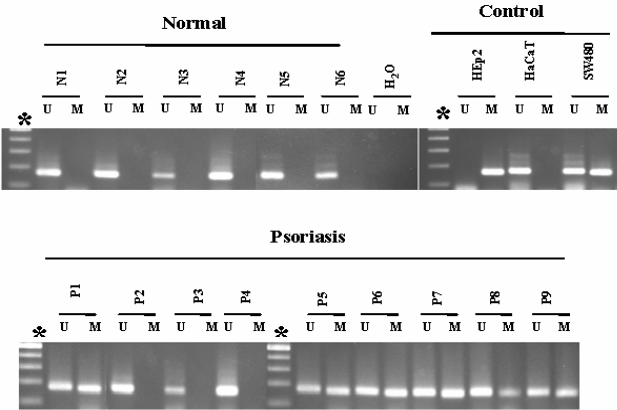
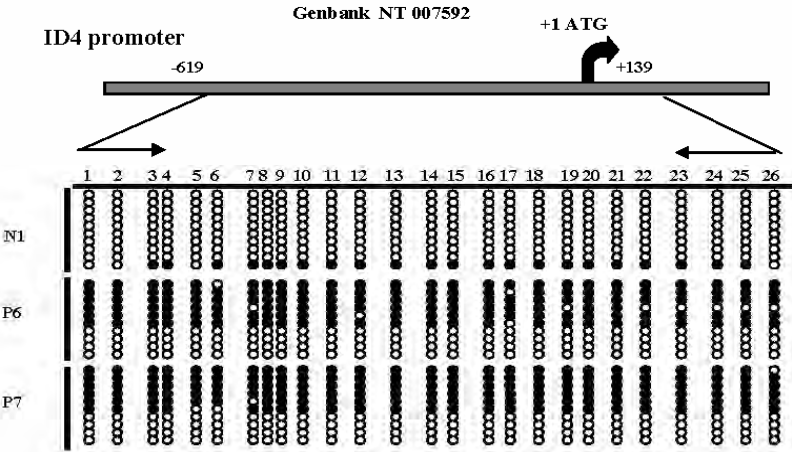


Figure 2

A



B



C

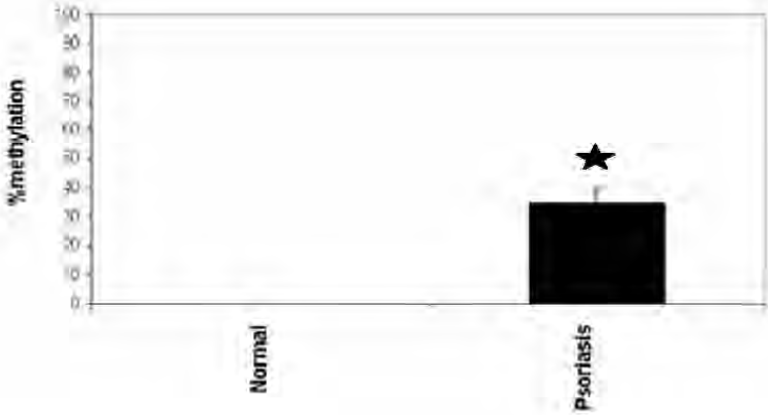


Figure 3

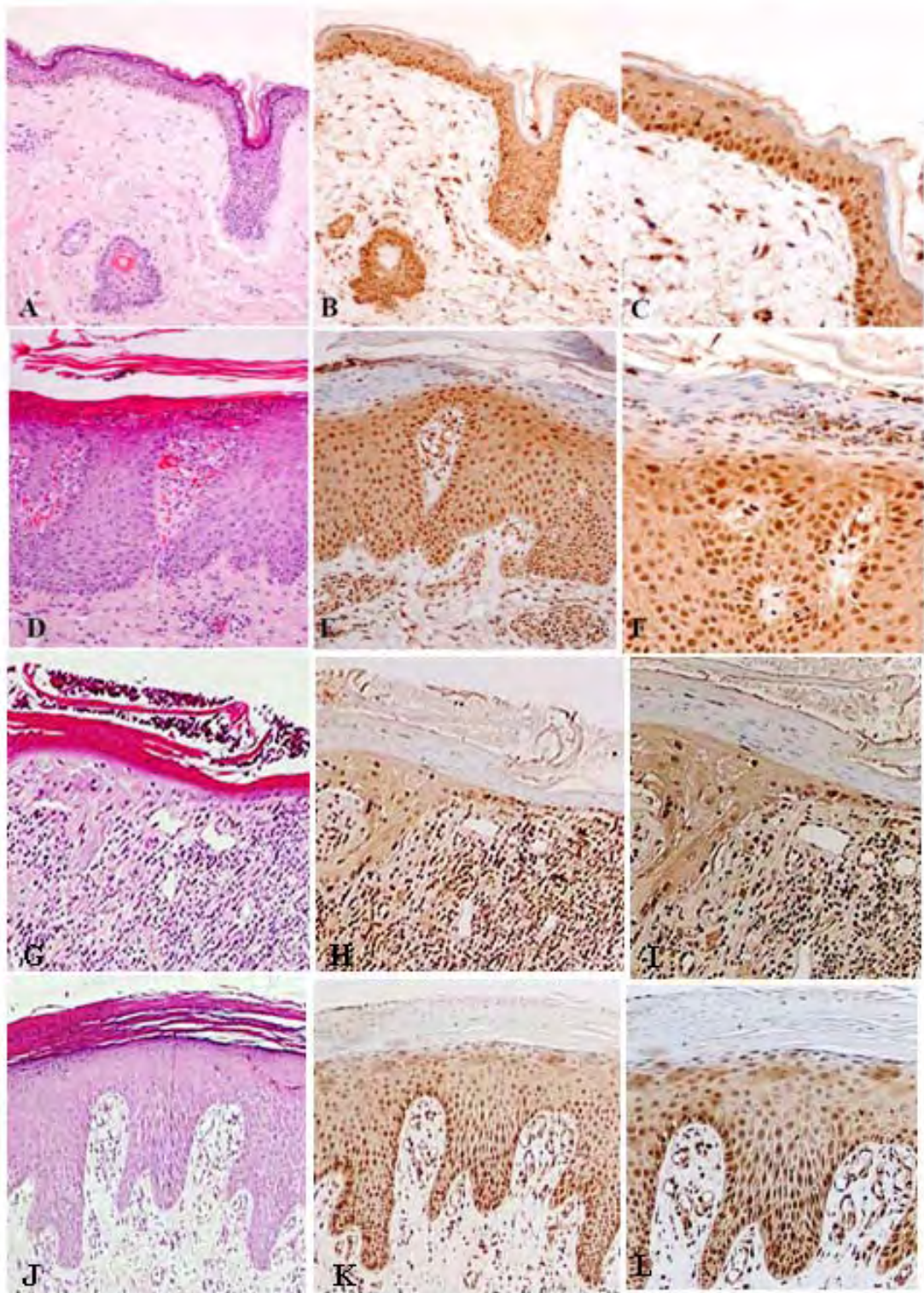


Figure 4

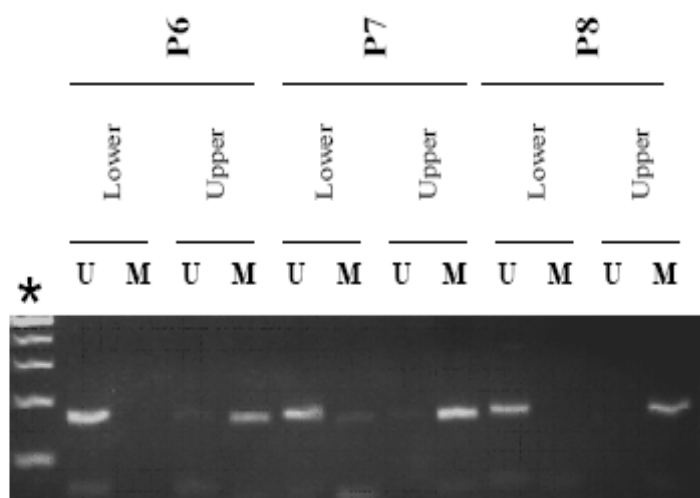


Table 1 Inverse correlation of ID4 promoter status and mRNA level of 12 Cell lines

Epithelial cell lines

HEp2	Methylated promoter	0
Hela	Methylated promoter	0
RKO	Methylated promoter	0
HaCaT	Unmethylated promoter	19.4
SW480	Met/Unmet promoter	0.14
SiHA	Methylated promoter	0

Hematopoietic cell lines

Daudi	Methylated promoter	0
Jurkat	Methylated promoter	0
Molt4	Methylated promoter	0
HL-60	Methylated promoter	0
K562	Met/Unmet promoter	0
PBMC	Unmethylated promoter	0.43

Table 1 The levels of *ID4* mRNA expression in epithelial and hematopoietic cell lines analyzed by Real time RT-PCR. GAPDH was used as a control. The expression levels are presented as ID4 copy number / GAPDH copy number. Names of all cell lines are listed for each row.