

مقاله تحقیقی

بررسی الگوی متیلاسیون ژن های LC3 و ULK-1 مرتبط با اتوفاژی، در بیماران مبتلا به سرطان سلول های غیرکوچک ریه (NSCLC)

شیمیا زارع کاریزی^۱، شهره زارع کاریزی^۱، مرتضی کریمی پور^{۲*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران

۲. بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: mortezakarimi@yahoo.com

محل انجام تحقیق: انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۱۸

چکیده

سرطان ریه علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان می باشد. تشخیص این سرطان معمولاً در مراحل پیشرفته صورت می گیرد که در آن پیش آگهی ضعیف و گزینه های درمانی محدود است. بررسی الگوی متیلاسیون ژن های موثر در اتوفاژی بیانگر اهمیت تغییرات اپی ژنتیکی در اثر بر بیان ژن های مهار کننده توموری می باشد. در این مطالعه الگوی متیلاسیون ژن های موثر در اتوفاژی در بیماران مبتلا به سرطان سلول های غیرکوچک ریه (NSCLC) مورد بررسی قرار گرفت. وضعیت متیلاسیون ژن های ULK1 و LC3 در ۳۰ نمونه مبتلا به NSCLC و ۳۰ نمونه بافت غیرتومور: مجاور آن، پس از استخراج DNA ژنومی، با استفاده از تیمار بی سولفیت و روش MS-HRM مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز نتایج با استفاده از T-test انجام شد. اختلاف معناداری میان میزان سطوح متیلاسیونی نواحی پروموتری میا نمونه های توموری و نرمال در بیماران مبتلا به NSCLC مشاهده نشد ($P \text{ value} > 0.05$). از آنجایی که متیلاسیون NA معمولاً با خاموشی ژن همراه می باشد، لذا نقش متیلاسیون این ژن ها در توسعه و پیشرفت سرطان پیچیده بوده و نیاز به مطالعات بیشتر و جامعه آماری بزرگتر می باشد.

واژه های کلیدی: سرطان ریه سلول غیر کوچک، الگوی متیلاسیون، اتوفاژی

مقدمه

سرطان سلول های غیرکوچک ریه (NSCLC) و سرطان سلول های کوچک ریه (SCLC) که به ترتیب ۸۵ و ۵ درصد موارد سرطان ریه را به خود اختصاص می دهد؛ (۴،۵). شروع و پیشرفت سرطان ریه به یک عامل معی محدود نمی شود. بر اساس مطالعات عوامل محیطی ژنتیکی نقش مهمی را در این راستا ایفا می کنند. مبحث دیگری که اخیراً مورد توجه محققان قرار گرفته تاکنون در بسیاری از موارد سرطان، نقش آن به اثبات رسیده است، بحث اپی ژنتیک است (۶). بدون شک

سرطان ریه یکی از شایع ترین و کشنده ترین انواع سرطان در میان مردان و زنان در سراسر جهان می باشد (۱). نسبت بیماران مبتلا به سرطان ریه در دو دهه گذشته در کشورهای در حال توسعه از ۳۱ به ۴۹/۹ درصد افزایش یافته است (۲). در سال ۲۰۱۲ در کشور آمریکا ۱۶۰/۳۴۰ مورد مرگ در اثر سرطان ریه برآورد شد (۳). بر طبق معیارهای سازمان جهانی سلامت، سرطان ریه در دو گروه کلی طبقه بندی می شود:

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه

جهت بررسی الگوی متیلاسیون ژن‌های LC3 و ULK1، ۳۰ نمونه توموری و ۳۰ نمونه بافت نرمال مجاور تومور از بیماران مبتلا به NSCLC که پیش‌تر بیماری آن‌ها توسط پاتولوژیست‌ها تشخیص داده شده بود، با رضایت آن‌ها از بیمارستان مسیح دانشوری تهران وارد مطالعه شد. این نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز شدند.

استخراج DNA و تیمار بی سولفیت

استخراج DNA، با کیت QIAamp DNA extraction kit (Qiagen, United States) با توجه به دستورالعمل ارائه شده توسط این شرکت انجام شد. تیمار بی سولفیت با استفاده از پروتکل کیت EZ DNA Methylation Gold (Zymo research, US) صورت گرفت. DNA بی سولفیت شده تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه کنترل‌های دارای الگوی متیلاسیون مختلف

برای تهیه کنترل با درصد متیلاسیون مختلف از نمونه‌ی خون انسانی استفاده شد. بدین ترتیب از DNA استخراج شده از خون پس از تیمار بی سولفیت، به عنوان کنترل غیرمتیله (صفر درصد) استفاده شد. از همین نمونه‌ی خون و آنزیم *M.SssI* (Thermo Scientific, USA) با توجه به پروتکل شرکت سازنده، کنترل کاملاً متیله (۱۰۰ درصد) ایجاد شد. در نهایت با ترکیب نسبت‌های دلخواه، نمونه‌های DNA با درصد متیلاسیون ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد حاصل گردید.

روش فن ذوب DNA با تفکیک بالا

روش فن ذوب DNA با تفکیک بالا از DNA بی سولفیت شده، به عنوان الگو استفاده می‌کند. با توجه به دستورالعمل ارائه شده، حجم کلی واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل: ۴ میکرولیتر 5x HOT FIREPol EvaGreen HRM Mix (ROX)، ۱۳/۸ میکرولیتر H₂O، ۱ میکرولیتر از DNA بی سولفیت، ۱/۲ میکرولیتر از ترکیب پرایمر رفت و برگشت (غلظت ۶ پیکومول بر میکرولیتر). توالی

متیلاسیون DNA شناخته شده‌ترین تغییر اپی‌ژنتیکی است که با خاموش کردن ژن‌های سرکوب کننده تومور و اختلال در الگوی متیلاسیون آنکوژن‌ها سلول را به سوی سرطانی شدن پیش می‌برد (۷). متیلاسیون DNA می‌تواند ژن‌های موثر و کلیدی در مسیرهای سیگنالینگ سلولی و مکانیسم‌های مهمی از جمله اتوفازی را تحت تاثیر قرار دهد (۸). اتوفازی به معنی خودخوری است و به‌طور گسترده به فرآیندهای کاتابولیک سلولی اشاره می‌کند که در آن مواد سیتوپلاسمی برای تخریب به لیزوزوم‌ها منتقل می‌شوند. اتوفازی نقشی کلیدی در حفظ همئوستازی سلولی در برابر سلول‌های سالم ایفا می‌کند و به عنوان یک رویداد یا یک اتفاق سیتوپلاسمی در نظر گرفته می‌شود. مطالعات اخیر شبکه‌ی رونویسی و اپی‌ژنتیکی را به عنوان تنظیم کننده اتوفازی آشکار ساخته است (۹). ژن‌های متعددی در فرایند اتوفازی دخیل هستند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن Beclin 1 و ULK1 اشاره نمود. ژن LC3 در موقعیت کروموزومی 17q21 قرار دارد. این ژن پروتئینی با توالی خطی ۴۵۰ اسیدآمینو را کد می‌کند که وزنی معادل 60 KDa دارد. LC3 در ساختارهای سیتوپلاسمی مثلاً شبکه آندوپلاسمی میتوکندری غشا و هسته دیده می‌شود و یک مولکول تخصصی است که یک نقش چندکاره در سلول ایفا می‌کند، از جمله نقش مستقیم در آغاز اتوفازی. همچنین به‌طور غیرمستقیم در فرآیندهای بیولوژیکی از جمله نمو اندوسیتوز، سازگاری با استرس، افزایش سن و مرگ سلولی دارد (۱۰).

ژن ULK-1 روی کروموزوم 12q24.3 قرار دارد و دارای 28 اگزون است. تنظیم فعالیت ULK1 توسط سطوح انرژی و مواد غذایی در ارتباط با نقش اصلی اتوفازی در محافظت از سلول‌ها در برابر گرسنگی می‌باشد. در طی گرسنگی (نیاز به مواد غذایی) سلول‌ها یک فرایند وابسته به لیزوزوم را آغاز می‌کنند که به عنوان اتوفازی شناخته می‌شود (۱۱). در این پژوهش، وضعیت متیلاسیون نواحی تنظیمی دو ژن دخیل در فرایند اتوفازی از جمله LC3 و ULK1 در ۳۰ بیمار مبتلا به NSCLC، توسط روش MS-HRM مورد بررسی قرار گرفت.

ثانیه، سپس طویل سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در انتها نیز برای نمودار دمای ذوب شرایط مقابل به کار گرفته شد: ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۷ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و افزایش آرام دما تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد.

پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ ارائه شده است. شرایط ذوب و تکثیر در نظر گرفته شده بدین صورت است: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل به صورت ۹۴ درجه برای ۱۵ ثانیه، ۵۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن LC3 و ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن ulk-1، ۷۲ درجه به مدت ۳۰

جدول ۱ - توالی پرایمرها و سایز محصول تکثیر ژن‌های ULK1 و LC3.

primer	sequence	PCR Product
LC3-F	5-CACGAACGCCTATCTCTACAA-3	111bp
LC3-R	5-GATGTCGGGGTAGTAAGTGAT-3	
ULK-1-F	5-TCGTGTGTTTGTGATATTGTTTT-3	۱۲۹bp
ULK-1-R	5-CCTCGACCCTAACTACCAA-3	

نتایج مربوط به وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن

ULK-1

پس از بررسی وضعیت متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن ULK-1 مشاهده شد که اکثر نمونه‌های نرمال در بازه‌ی متیلاسیونی ۰ تا ۱۲/۵ درصد متیله قرار گرفته‌اند، لذا Cut-off در نظر گرفته شده برای این ژن ۱۲/۵ درصد بود. نمونه‌های توموری نیز اغلب الگویی مشابه نمونه‌های نرمال نشان دادند (۲۷ نمونه از ۳۰ نمونه‌ی توموری). اختلاف مشاهده شده میان سطوح متیلاسیونی نمونه‌های نرمال و توموری در بیماران مبتلا به سرطان NSCLC برای ژن ULK-1 معنادار نیست ($P > 0.05$ value). نمودارهای مرتبط با ژن ULK-1 در شکل ۲ قابل مشاهده است.

بحث

درک مکانیسم‌های مولکولی مربوط به اختلال در تنظیم پیشروی چرخه سلولی در سرطان می‌تواند دیدگاه‌های مهمی را در مورد چگونگی تبدیل سلول‌های سالم به توموری و همچنین طراحی روش‌های درمانی جدید ارائه کند. متیلاسیون DNA یکی از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی است که تاکنون مطالعات بسیاری نقش آن را در بروز سرطان‌های مختلف از جمله سرطان ریه به اثبات رسانیده‌اند (۱۲). هایپرمتیلاسیون نواحی پروموتوری ژن‌های بازدارنده توموری، مکانیسم شناخته شده‌ای است که به واسطه آن متیلاسیون DNA در ایجاد سرطان نقش مهم و تعیین کننده‌ای ایفا می‌کند. همچنین تغییرات

آنالیز آماری

در این پژوهش به منظور آنالیز آماری نتایج حاصل از بررسی وضعیت متیلاسیون ULK-1 و LC3 در نمونه‌های بافت توموری و نرمال آن از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون آماری T-test استفاده شد. همچنین $P < 0.05$ به عنوان میزان اختلاف معنادار گزارش گردید.

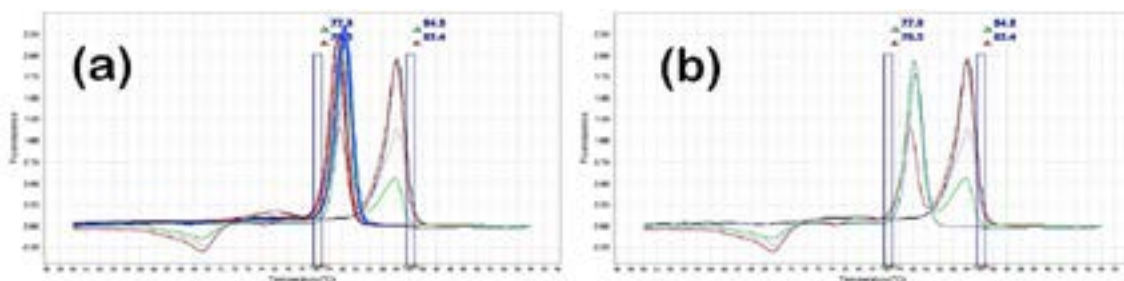
نتایج

نتایج مربوط به وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن LC3

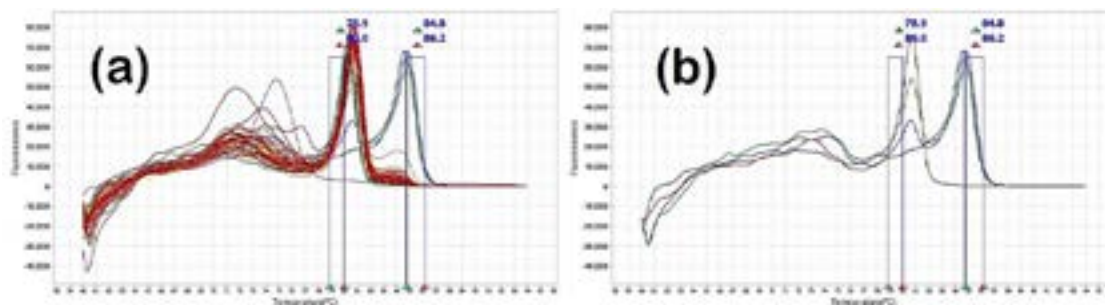
وضعیت متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن LC3 در ۳۰ نمونه‌ی توموری و غیرتوموری مجاور آن (به عنوان نمونه‌ی نرمال) مورد بررسی قرار گرفت. بیماران از نظر نوع زیرگروه بافتی ۵۷٪ مبتلا به آدنوکارسینوما و ۴۳٪ مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی بودند؛ از نظر جنسیت، ۲۷٪ زن و ۷۳٪ مرد بودند و از نظر سن ۳٪ زیر ۴۰ سال، ۳٪ بین ۴۰ تا ۵۰ سال، ۴۷٪ بین ۵۰ تا ۶۰ سال و ۴۷٪ بین ۶۰ تا ۷۰ سال و ۷۳٪ غیرسیگاری و ۲۷٪ سیگاری بودند. Cut-off در نظر گرفته شده برای این ژن، با توجه به وضعیت متیلاسیون نمونه‌های نرمال، کنترل ۲۵ درصد بود. تمامی نمونه‌های نرمال دارای درصد متیلاسیون نزدیک به کنترل صفر درصد بودند. نمونه‌های توموری NSCLC نیز الگویی مشابه نمونه‌های نرمال داشتند (شکل ۱)، لذا اختلاف معناداری میان سطوح متیلاسیون نمونه‌های نرمال و توموری برای این ژن مشاهده نشد ($P > 0.05$ value).

رگ‌زایی، در فقر شدید تغذیه و اکسیژن به سر می‌برند. این شرایط سبب القای اتوفازی در این سلول‌ها و مقاومت آنها در برابر این استرس‌ها می‌شود. غیرفعال شدن ژن‌ها که نقشی پررنگ در تنظیم اتوفازی دارد می‌تواند به عنوان دلیلی قوی و استنادپذیر در بیان نقش ضد توموری اتوفازی باشد. غیرفعال شدن این ژن‌ها، اتوفازی را کاهش می‌دهد و این روند در برخی از سرطان‌ها گزارش شده است (۱۴). در همین راستا، در این پژوهش وضعیت متیلاسیون دو ژن دخیل در اتوفازی با روش MS-HRM مورد بررسی قرار گرفت.

متیلاسیون پروموتور می‌تواند به عنوان یک نشانگر برای تشخیص سرطان به کار رود. بنابراین تشخیص متیلاسیون در ژن‌هایی که نقش مهمی در مسیرها و وقایع سلولی بازی می‌کنند، می‌تواند در تشخیص زودرس و نوع روش درمانی اتخاذ شده بسیار مفید باشد (۱۳). اتوفازی یک مسیر سلولی حفاظت شده است که به واسطه کنترل تجزیه پروتئین و اندامک‌ها، نقشی مهم در حیات، تکوین، تمایز و همئوستاز ایفا می‌کند. در ارتباط با نقش اتوفازی در ایجاد سرطان و رشد سلول‌های توموری، دلایل و مشاهدات زیادی مطرح می‌شود. سلول‌های سرطانی در مراحل اولیه و پیش از



شکل ۱ - منحنی ذوب کنترل‌ها برای پروموتور ژن LC3. (a): منحنی ذوب کنترل‌ها و تعدادی از نمونه‌ها. (b): منحنی ذوب کنترل‌ها. کنترل unmethylated (۰٪) به رنگ آبی، کنترل ۲۵٪ متیله به رنگ سبز، کنترل ۵۰٪ متیله به رنگ ارغوانی، کنترل ۷۵٪ متیله به رنگ قرمز، کنترل ۱۰۰٪ متیله به رنگ مشکی و نمونه‌ها به رنگ آبی تیره می‌باشند.



شکل ۲ - منحنی ذوب کنترل‌ها برای پروموتور ژن ULK-1. (a): منحنی ذوب کنترل‌ها و تعدادی از نمونه‌ها. (b): منحنی ذوب کنترل‌ها. کنترل unmethylated (۰٪) به رنگ قرمز، کنترل ۱۲٫۵٪ متیله به رنگ سبز، کنترل ۲۵٪ متیله به رنگ سبز، کنترل ۵۰٪ متیله به رنگ آبی و نمونه‌ها به رنگ قرمز می‌باشند.

بیشتری انتشار یافته است. در سال ۲۰۱۲، Jiang و همکاران میزان بیان ژن LC3 را در ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه غیرکوچک مورد بررسی قرار دادند و مشاهده شد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های توموری به میزان قابل توجهی نسبت به نمونه‌های نرمال کاهش پیدا کرده بود ($P = 0.001$) (۱۵). بر طبق

نتایج مربوط به آنالیز نواحی پروموتوری ژن LC3 نشان داد که تمامی نمونه‌ها دارای میزان متیلاسیون نزدیک به صفر بودند و اختلاف متیلاسیون معناداری میان نمونه‌های توموری و نرمال مشاهده نشد ($P < 0.05$). تاکنون مطالعات بسیاری روی این ژن صورت گرفته و نقش آن در تعدادی از سرطان‌ها با جزئیات

چنین نتیجه گرفتند که خاموشی ناشی از متیلاسیون پروموتور ULK2 و در نتیجه مهار اتوفازای برای پیشرفت گلیوبلاستوما ضروری است (۱۶). با توجه به فعالیت‌های مختلف ژن ULK-1 و افزایش و کاهش بیان در سرطان‌های مختلف و ویژگی‌های آنکوژنی آن، نقش این ژن در سرطان ریه نیاز به تحقیقات با جامعه‌ی آماری بزرگتر دارد.

در این مطالعه وضعیت متیلاسیون ژن‌های ULK-1 و LC3 در نمونه‌های NSCLC بررسی شد. سطوح متیلاسیون میان نمونه‌های تومور و نرمال همبستگی معنی‌داری نداشت. با توجه به نقش حساس و پیچیده‌ای که این ژن‌ها در فرآیند اتوفازای ایفا می‌کنند، پس برای بدست آوردن نتایج دقیق و قابل اعتماد در خصوص وضعیت متیلاسیون این ژن‌ها تحقیقات بیشتری مورد نیاز است. از آنجایی که متیلاسیون DNA معمولاً با خاموشی ژن همراه می‌باشد، لذا نقش متیلاسیون این ژن‌ها در توسعه و پیشرفت سرطان پیچیده بوده و نیازمند مطالعات بیشتر و جامعه آماری بزرگ‌تر می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله مراتب تشکر خویش را از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، ابراز می‌داریم.

مطالعه‌ی دیگری که نقش این ژن در سرطان سینه را هدف قرار داده بود، مشاهده گردید که بیان ژن LC3 در ۷۰ درصد (۱۴ از ۲۰ نمونه) تومورهای سرطانی نسبت به نمونه‌های نرمال کاهش یافته بود. داده‌ها نشان داد که متیلاسیون نابه‌جا DNA و فقدان هتروزیگوسیتی (LOH) با توجه به این که حذف‌های تک آلی ژن LC3 به‌طور فراوانی در تومورهای پستان مشاهده شد، می‌تواند دلایل کاهش بیان ژن LC3 باشد (۱۰). با توجه به کاهش بیان این ژن در سرطان ریه، افزایش متیلاسیون ژن LC3 در این پژوهش دور از انتظار نبود، اما همانطور که عنوان شد تغییر معناداری در این مورد مشاهده نشد. در توجیه این نتایج می‌توان عوامل متعددی را مطرح نمود، از جمله می‌توان به جامعه‌ی آماری محدود و ابتدایی بودن سرطان در نمونه‌های مورد بررسی اشاره کرد. همچنین متیلاسیون DNA از عوامل تنظیم کننده در سطح پیش از رونویسی می‌باشد، در صورتی که می‌توان کاهش بیان این ژن را به عوامل پس از رونویسی نسبت داد.

در این مطالعه تغییر معنادار و قابل توجهی در میزان متیلاسیون پروموتور ژن ULK1 بین نمونه‌های توموری و نرمال مشاهده نشد. Shukla و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی تومورهای گلیوبلاستوما، هایپرمتیلاسیون پروموتور ULK2 (هومولوگ ULK1) را به وسیله توالی‌یابی بی‌سولفیت مشاهده کردند. این گروه

منابع مورد استفاده

1. Ettinger, D. S., Akerley, W., Borghaei, H., Chang, A. C., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., D'amico, T. A., Demmy, T. L., Govindan, R., Grannis, F. W., 2013. Non-small cell lung cancer, version 2. Journal of the National Comprehensive Cancer Network 11(6): 645-653.
2. Patel, V., Ramasundarahettige, C., Vijayakumar, L., Thakur, J., Gajalakshmi, V., Gururaj, G., Suraweera, W., Jha, P., Collaborators M. D. S., 2012. Suicide mortality in India: a nationally representative survey. The Lancet 379(9834): 2343-235.
3. Smith, S. A., Blumenthal, D. S., 2012. Community health workers support community-based participatory research ethics: lessons learned along the research-to-practice-to-community continuum. Journal of Health Care for the Poor and Underserved 23(Suppl 4): 77.
4. Wynants, J., Stroobants, S., Dooms, C., Vansteenkiste, J., 2007. Staging of lung cancer. Radiologic Clinics of North America 45(4): 609-625.
5. Lewis, D. R., Check, D. P., Caporaso, N. E., Travis, W. D., Devesa, S. S., 2014. US lung cancer trends by histologic type. Cancer 120(18): 2883-2892.
6. Ansari, J., Shackelford, R. E., El-Osta, H., 2016. Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. Translational lung cancer research 5(2): 155-158.
7. Pras, E. I., Aksentijevich, L., Gruberg, J. E., Balow, J., Prosen, L., Dean, M., Steinberg, A. D., Pras, M., Kastner, D. L., 1992. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. New England Journal of Medicine 3(23): 26.

3. Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16(1): 6-21.
9. Gozuacik, D., Kimchi, A., 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23(16): 2891-2906.
10. Li, Z., Chen, B., Wu, Y., Jin, F., Xia, Y., Liu, X., 2010. Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer* 10(1): 98-102.
11. Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., Thompson, C. B., 2011. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(27): 11121-11126.
12. Sekido, Y., Fong, K. M., Minna, J. D., 1998. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1378(1): 21-59.
13. Risch, A., Plass, C., 2008. Lung cancer epigenetics and genetics. *International Journal of Cancer* 123(1): 1-7.
14. Moretti, L., Yang, E. S., Kim K. W., Lu B., 2007. Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resistance Updates* 10: 135-143.
15. Jiang, Z. F., Shao, L. J., Wang, W. M., Yan X. B., Liu, R. Y., 2012. Decreased expression of LC3 and LC3 in human lung cancer. *Molecular Biology Reports* 39(1): 259-267.
16. Shukla, S. I., Patric, R. P., Patil, V., Shwetha, S. D., Hegde, A. S., Chandramouli, B. A., Arivazhagan, A., Santosh, V., Somasundaram, K., 2014. Methylation silencing of ULK2, an autophagy gene, is essential for astrocyte transformation and tumor growth. *Journal of Biological Chemistry* 289(32): 22306-22318.