دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و چهارم، شماره ۳، صفحه ۱۷۱-۱۶۰ (مرداد و شهریور ۱۴۰۰)

Iran South Med J 2021; 24(3): 160-171

بررسی بیان ژن‌های گروه SoxC (sox4، sox11 و sox12) در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس

مجتبی اسعدسامانی (MSc)[1*]، سمیه رئیسی (PhD)[2**]، نجمه ریاحی (MSc)[1]، شیوا کبیری (MSc)[1]

[1] گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

[2] گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(دریافت مقاله: ۹۹/۱۲/۲۹- پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۳/۳۱)

چکیده

زمینه: ژن‌های Sox تنظیم کننده‌های رشدی با عملکردهایی در تعیین جنسیت، توسعه تاج عصبی و نوروژنز هستند. پروتئین‌های SoxC شامل Sox4، Sox11 و Sox12 می‌باشند که سبب شده سلول‌های پیش‌ساز عصبی به نورون‌های نابالغ توسعه یابند. به عبارت دیگر یکی از عملکردهای این فاکتورها نقش در نوروژنز می‌باشد. بنابراین هدف این مطالعه بررسی تغییرات بیان، ژن‌های SoxC در بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بررسی حاضر به صورت یک مطالعه توصیفی- تحلیلی برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های گروه SoxC انجام شد. بدین منظور نمونه‌های خون ۴۰ بیمار مبتلا به MS و ۴۰ فرد کنترل سالم در این مطالعه وارد گردید. پس از آن استخراج RNA تام و سنتز DNA مکمل (cDNA) انجام شد و بعد از آن بیان نسبی سه ژن Sox4، Sox11 و Sox12 با استفاده از روش real-time PCR بدست آمد. داده‌ها با روش‌های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که بیان ژن‌های Sox4، Sox11 و Sox12 در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد کنترل کاهش قابل توجهی داشتند (p=۰/۰۰۹، p=۰/۰۱۹ و p=۰/۰۰۱). همچنین با افزایش ناتوانی در افراد مبتلا به MS، بیان ژن‌های Sox4 و Sox11 کاهش معناداری داشتند و تفاوت معناداری برای ژن Sox12 مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان داد که بیان ژن‌های گروه SOXC در مالتیپل اسکلروزیس پائین‌تر است. با توجه به نقش عملکردی ژن‌های Sox به‌عنوان پروتئین‌های درگیر در نورون‌زایی، بیان غیرطبیعی اعضای این خانواده با بیماری‌های مختلف مرتبط است.

واژگان کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، خانواده ژنی SOXC، بیان ژن، EDSS

**شهرکرد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

Email: s.reiisi@ sku.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-9514-3084
**ORCID: 0000-0001-6843-7645

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

مقدمه

ژن‌های Sox (Sry-related box) یک گروه از فاکتورهای رونویسی بوده و دارای یک دمین متصل شونده به DNA است و این ناحیه با نام گروه با تغییرپذیری بالا (HMG: High Mobility Group) خوانده می‌شود. پروتئین‌های گروه Sox که حداقل ۲۰ عضو هستند از A تا H بر اساس همسانی توالی و با توجه به یکسانی توالی ناحیه HMG در آن‌ها، تقسیم‌بندی می‌شوند (۱). اعضای یک گروه از این خانواده، دارای بیش از ۸۰ درصد شباهت در ناحیه HMG بوده و ویژگی‌های بیوشیمیایی و الگوی بیانی مشابهی را نشان می‌دهند. علاوه بر این عملکردهای آن‌ها در یک راستا می‌باشد. اما در مقابل، گروه دیگر دارای عملکردهایی متفاوت هستند که آن‌ها را از بقیه مجزا می‌کند (۲). ژن‌های گروه Sox تنظیم کننده‌های رشد با عملکردهایی در تعیین جنسیت، کندروژنز، خونسازی، توسعه تاج عصبی و نوروژنز هستند (۳). این خانواده ژنی دارای نقشی در فرایند مرگ سلولی و حفظ عملکرد اجدادی در طول جنین‌زایی هستند. آن‌ها همچنین برای نگهداری سلول‌های بنیادی مهم بوده و یک نقش مازاد در هومئوستاز و بازسازی بافت در افراد بالغ خصوصاً در سیستم عصبی مرکزی بازی می‌کنند (۴). ناحیه Sox با شیار باریک DNA برهمکنش نشان می‌دهد و خمش شدیدی را در DNA القا می‌کند. به موجب آن به پروتئین‌ها اجازه می‌دهد که یک ساختار کلیدی را در تجمع کمپلکس‌های تقویت کننده رونویسی ارائه دهند. این ناحیه همچنین با فاکتورهای رونویسی متعدد برهمکنش نشان می‌دهد تا کارایی و اختصاصیت عملکرد آن را افزایش دهد (۵).

ژن‌های گروه SoxC شامل سه ژن Sox4، Sox11 و Sox12 هستند (۱). این دسته از ژن‌ها عمدتاً در طول مرحله جنین‌زایی بیان می‌شوند (۷-۵). فاکتورهای Sox4 و Sox11 توسط پروتئین‌های پرونئورال القا می‌شوند به طوری که سبب شده، سلول‌های پیش‌ساز عصبی به نورون‌های نابالغ توسعه یابند؛ به عبارت دیگر این فاکتورها در نوروژنز نقش دارند (۸). به همین‌ترتیب Sox12، تقریباً به همان شکل القا می‌شود، با این تفاوت که از لحاظ عملکردی دارای اهمیت کمتری است (۶). این سه پروتئین درجه بالایی از شباهت و همسانی را در ناحیه جعبه HMG و در ناحیه C-ترمینال نشان می‌دهند. در پروتئین Sox4 جعبه HMG در ناحیه N-ترمینال و دمین فعالسازی متقاطع (TAD)[1] در قسمت C-ترمینال پروتئین قرار دارد، اما هنوز به طور دقیق جایگاه آن‌ها ترسیم نشده است. Sox11 نیز دارای ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مشابهی است اما فعال کننده قوی‌تری نسبت به Sox4، در سنجش‌های ترانسفکشن موقت است. Sox12 که به‌عنوان SOX22 در انسان گزارش شده است، از لحاظ ساختاری مشابه Sox4 و Sox11 است، اما ویژگی‌های عملکردی آن تاکنون گزارش نشده‌اند. Sox4 در تیموس، قلب، شش، پانکراس و غدد جنسی موش‌های بالغ، جزایر پانکراس، کوندروسایت‌ها و بافت اسفنجی اولیه استخوان و همچنین در بافت عصبی بیان می‌شود.Sox11 به‌طور گسترده، در جنین موش در طول اندام‌زایی بیان شده و به میزان زیادی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، ریه، پانکراس، طحال، کلیه، گنادها و مزانشیم رویان موش و انسان بیان می‌شود (۵ و ۸). به‌طور مشابه Sox12 در بافت عصبی و مزانشیم در جنین انسان و در مغز، ریه، قلب، کبد، طحال، تیموس، پانکراس و کلیه افراد بالغ

[1] Trans Activation Domain

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

بیان می‌شود (۹). در سال‌های اخیر شواهد گسترده‌ای نشان داده است که جهش‌ها و نقص در فاکتورهای Sox در چندین بیماری انسانی دخیل هستند. این بیماری‌ها ناشی از هم پوشانی بافت‌ها با الگوهای بیانی آن‌ها در طول رشد جنین است (۲). از آنجایی که فاکتورهای Sox یک نقش جامع در نگهداری سلول‌های بنیادی عصبی، تشخیص و تمایز نورون‌ها، آستروسیت‌ها و اولیگودندروسایت‌ها بازی می‌کنند، از اینرو منطقی به‌نظر می‌رسد که یک بیان نابجا از عضوی از این خانواده در بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مرکزی از جمله مالتیپل اسکلروزیس (MS) دخیل باشد (۲).

MS یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی است که منجر به تخریب عصبی پیش رونده و ناتوانی‌های عصبی توسط دمیلینه شدن و نقص عملکرد نورون‌ها می‌شود (۱۰). بیماری MS به صورت متداول افراد جوان و خصوصاً زنان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از اولین سال‌های شروع علائم بیماری، تأثیر همزمان عوامل ژنتیکی و محیطی کاملاً آشکار می‌باشد (۱۱). اگرچه بیماری MS یکی از متداول‌ترین بیماری‌های نورولوژیکی است و با وجود بیش از ۳۰ سال مطالعه بر روی ژنتیک بیماری MS، هنوز بخش مهمی از علت‌شناسی این بیماری پیچیده، کاملاً مشخص نشده است. به نظر می‌رسد که ناهمگنی قابل توجهی در مکانیسم‌های بیماری وجود دارد، اما در بیشتر موارد حداقل یک مؤلفه ژنتیکی قوی در نظر گرفته می‌شود (۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد بررسی ژن‌های درگیر در سیستم عصبی و نورون‌زایی برای مشخص شدن مکانیسم بیماری و یا روش‌های تشخیصی سریع‌تر مفید باشد. در مطالعه حاضر به بررسی سطح بیان گروه ژنی SoxC پرداخته شده است. ژن‌های گروه SoxC در تمایز و بلوغ سلول‌های عصبی نقش دارند، تغییر بیان آن‌ها در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی می‌تواند به‌صورت غیرمستقیم به بیماری‌زایی آن‌ها نسبت داده شود. در این مطالعه بیان ژن‌های این گروه در بیماری MS در مقایسه با افراد کنترل سالم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جمعیت مورد مطالعه

بررسی حاضر به صورت یک مطالعه توصیفی- تحلیلی، برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های گروه SoxC انجام شد. بدین منظور نمونه‌های خون ۴۰ بیمار مبتلا به MS (نوع RRMS)[2] و ۴۰ فرد کنترل سالم در مطالعه وارد گردید. قابل ذکر است نوع بیماری RRMS که شایع‌ترین نوع بیماری MS بوده، یک حالت عودکننده- بهبودیابنده آن است و با رخداد دوره ای علائم مشخص می‌شود. این علایم شامل دو بینی، خستگی، بی‌اختیاری ادرار، سوزن سوزن شدن و بی‌حسی دست و پا، عدم تعادل در حرکت و ضعف اندام‌ها می‌باشد (۱۳). همه افراد جمعیت مورد بررسی، از یک منطقه جغرافیایی مشابه بوده و از تمامی بیماران و افراد کنترل سالم فرم رضایت‌نامه دریافت شد. با در نظر گرفتن قوانین استاندارد تعیین شده توسط ضوابط مک دونالد (McDonald) بیماران مبتلا به MS تشخیص داده شدند، همچنین ابتلا به بیماری MS توسط یک متخصص نورولوژیست تأیید گردید (۱۴ و ۱۵).

اطلاعات دموگرافیک و بالینی مورد نیاز از جمله سن، جنسیت، طول دوره بیماری و درجه ناتوانی افراد بیمار از طریق پرسشنامه‌ها و سوابق موجود در پرونده‌های پزشکی جمع‌آوری شدند. تمامی بیماران مورد بررسی در زمان نمونه‌گیری تحت هیچ‌گونه از درمان‌های

[2] relapsing–remitting multiple sclerosis

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

سرکوب کننده سیستم ایمنی یا آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان‌های ضدالتهابی یا ضدحساسیت در هفته پیش از نمونه‌گیری نبودند. نمونه‌های مورد بررسی ابتدا در کمیته اخلاق و پژوهش دانشگاه با کد ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۵۹۱۳ مورد تصویب قرار گرفتند.

بررسی میزان بیان ژن‌های گروه SoxC

RNA از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) توسط کیت MN آلمان (NucleoSpin RNA Blood-Germany) استخراج و سپس RNA تام سلولی بر اساس دستورالعمل کیت خالص‌سازی شد. بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (Nanodrop2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) سنجیده شد و RNAهای بدست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در مرحله بعد رونویسی معکوس با استفاده از کیت رونویسی معکوس با ظرفیت بالا برای ایجاد cDNA (کیت TAKARA; Clontech, Japan) انجام گرفت. رونویسی معکوس طی دو مرحلهٔ اضافه کردن پرایمرهای هگزامر تصادفی و oligo-dt همراه با آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Prime Script RT) و سپس انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس ازآن بیان کمی ژن‌های هدف توسط روش qRT-PCR و پرایمرهای مرتبط با ژن‌های هدف، صورت گرفت. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. بتا اکتین به عنوان ژن رفرنس (کنترل داخلی) برای تأیید بیان نسبی هر رونوشت استفاده شد. qRT-PCR با استفاده از دستگاه Rotor-gene 6000 (Qiagen ،Hildn ،Germany) برای سه ژن Sox4، Sox11 و Sox12 انجام گرفت. شرایط چرخهٔ دمایی از این قرار بود: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل واکنش تکثیر شامل ۵ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه دمای اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای طویل سازی قطعات ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. مرحله ذوب (Melting) برای محصولات در دمای ۷۰-۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نهایتاً از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ به منظور ارزیابی بیان نسبی ژن‌ها استفاده شد و سپس الگوی بیانی توسط آنالیزهای آماری بررسی گردید.

بررسی ارتباط میان بیان ژن‌ها و EDSS

درجه ناتوانی مطابق با معیار Kurtzke EDSS (Expanded Disability Status Scale) که یک روش کمی‌سازی ناتوانی در بیماری MS است، توصیف شد. با توجه به این مقیاس، سه مرحله از ناتوانی به صورت ملایم (صفر تا ۴)، متوسط (۴/۵ تا ۵/۵) و ناتوانی شدید (۶ تا ۹/۵) دسته‌بندی می‌شوند (۱۶). در مطالعه اخیر بیماران مبتلا به MS به دو گروه تقسیم شدند، بدین‌ترتیب افراد با ناتوانی ملایم تا متوسط (صفر تا ۵/۵) در یک گروه که افراد دچار ناتوانی در راه رفتن و یا ناتوانی حداقل بودند و افراد با ناتوانی شدید (۶ تا ۱۰) در گروه دیگر قرار گرفتند که افراد در این حالت ناتوانی شدیدی در راه رفتن دارند به گونه‌ای که برای راه رفتن نیاز به کمک دارند و یا محدود به رختخواب می‌شوند. همچنین جهت مشخص کردن ارتباط بیان ژن و مدت زمان بیماری، طول مدت بیماری از زمان تشخیص تا زمان نمونه‌گیری در نظر گرفته شد و پس از قرار دادن افراد مبتلا به MS در ۴

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

گروه (۵-۱، ۱۰- ۵، ۱۵-۱۰ و ۲۰-۱۵ سال) ارتباط میان بیان ژن و مدت زمان بیماری ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های هدف و رفرنس از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ استفاده شد. از آزمون‌های آماری t مستقل و تحلیل واریانس یکطرفه[3] برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های مورد بررسی استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean±SD) بیان شدند. برای مشخص کردن نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلوموگروف اسمیرنف استفاده شد: همگن بودن داده‌ها بین گروه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

سطح معنی‌داری برای محاسبات آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در پایان نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graph PadPrism ویرایش ۷ ترسیم شدند.

جدول ۱) توالی‌های پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

نام ژن	توالی در جهت'3-'5	محصول
β-ACTIN	F: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	۱۸۶
	R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
Sox4	F: GAGTTCGAAGACGACCTGCT	۱۸۱
	R: CCGAGATCATCTCGCTCACC	
Sox11	F: GGTCCAAGATCGAACGCAGG	۱۷۷
	R: ACTTGTAGTCGGGGTAGTCGG	
Sox12	F: GAAGGTGAAGAGGAGACGGTG	۱۵۸
	R: CAGTAGTCCGGGAACTCGAAG	

یافته‌ها

در مطالعه حاضر ۴۰ بیمار مبتلا به MS (نوع RRMS) با میانگین سنی ۱/۱±۳۲/۶۸ و ۴۰ فرد کنترل سالم با میانگین سنی ۲/۸۱±۳۴/۲۴ مورد ارزیابی قرار گرفتند. ویژگی‌های بالینی جمعیت مورد مطالعه در جدول ۲ خلاصه شده‌اند.

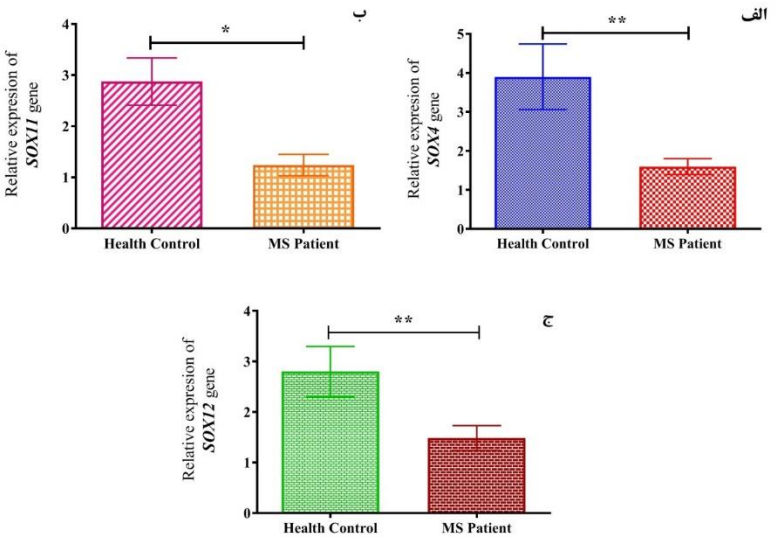
جدول ۲) اطلاعات بالینی و دموگرافیک بیماران مبتلا به MS و افراد کنترل سالم

اطلاعات بالینی بیماران		افراد مبتلا به MS	افراد کنترل سالم	P. value
میانگین سنی (mean±SD)		۳۲/۱±۶۸/۱	۳۴/۲±۲۴/۸۱	۰/۱۹۶
جنسیت	مرد ٪	۹ (۲۲/۵)	۱۲(۳۰)	
	زن ٪	۱۳(۷۷/۵)	۲۸(۷۰)	۰/۶۱۲
مدت زمان ابتلا به بیماری (سال)		۱/۲۸ ± ۶/۳۱	-	-
EDSS		۲/۱۲ ± ۵/۰۵	-	-

بررسی تغییرات بیان نسبی ژن‌ها به صورت مقایسه‌ای در بیماران مبتلا به MS و افراد کنترل سالم و همچنین ارتباط بیان نسبی ژن‌ها با میزان EDSS و مدت زمان ابتلا به بیماری (برحسب سال) توسط آزمون‌های آماری صورت گرفت. نتایج این بررسی در نمودارهای ۳-۱ نشان داده شده‌اند. با توجه به نمودار ۱، بیان نسبی هر سه ژن Sox4، Sox11 و Sox12 در بیماران مبتلا به MS با یک روند مشابه کاهش یافته است (به‌ترتیب p=۰/۰۰۹، p=۰/۰۱۷ و p=۰/۰۰۱)؛ به صورتی که این کاهش بیان از نظر آماری با درجه اطمینان ۹۵ ارتباط معناداری دارد (نمودار ۱ الف تا ج).

[3] ANOVA

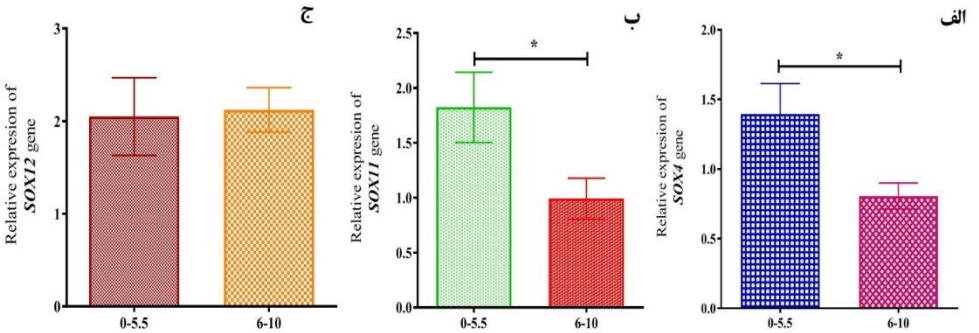
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]



نمودار ۱) مقایسه بیان نسبی ژن‌های *Sox4* (الف)، *Sox11* (ب) و *Sox12* (ج) در افراد کنترل سالم و بیماران مبتلا به MS. معناداری آماری توسط *(*p*<۰/۰۱) و **(*p*<۰/۰۰۱) نشان داده شده است.

Fig 1) Comparison of the relative genes expression of Sox4 (a), Sox11 (b) and Sox12 (c) in healthy controls and patients with MS. Statistical significance are shown by * (P <0.01) and ** (p <0.001).

برای مشخص کردن ارتباط بیان نسبی ژن‌ها و میزان EDSS، افراد به دو گروه با ناتوانی ملایم تا متوسط (EDSS=۶-۰) و ناتوانی شدید (EDSS=۱۰-۶) تقسیم‌بندی شدند. نتایج نشان دادند که بیان ژن‌های Sox4 و Sox11 در ناتوانی ملایم تا متوسط (EDSS=۶-۰) با درجه اطمینان ۹۵ به طور معناداری بیشتر بوده، ولی این ژن‌ها در درجه ناتوانی شدید به معناداری کمتر بودند (به‌ترتیب P=۰/۰۱۶ و P=۰/۰۲۹) (نمودار ۲-الف و ۲-ب). اما در رابطه با ژن Sox12 ارتباط معناداری میان بیان نسبی این ژن و درجه ناتوانی در بیماران مبتلا به MS دیده نشد (P=۰/۹۱۵).



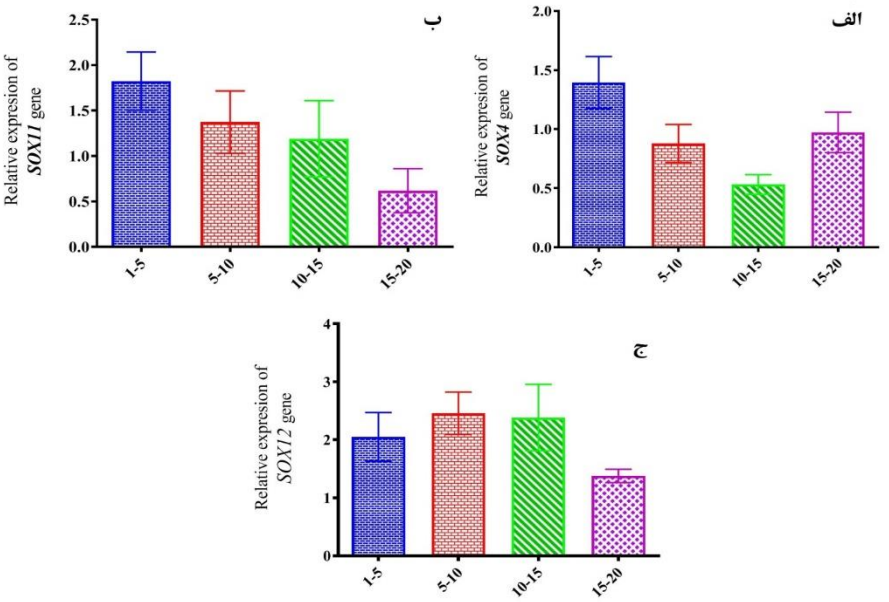
نمودار ۲) مقایسه ارتباط بیان نسبی ژن‌های Sox4 (الف)، Sox11 (ب) و Sox12 (ج) با میزان EDSS. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. از آزمون t مستقل برای مقایسه داده‌ها استفاده شد. تفاوت معناداری در هر گروه توسط*(p<۰/۰۱) نشان داده شده است.

Fig 2) Comparison of the relationship between the relative genes expression of Sox4 (a), Sox11 (b) and Sox12 (c) with EDSS. Results are reported as mean ± standard deviation. Independent t-test was used to compare data. In various groups, significant difference is indicated by * (p <0.01).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

همچنین جهت ارزیابی همراهی بیان ژن‌ها و مدت زمان بیماری در ۴ گروه (۵-۱، ۱۰- ۵، ۱۵-۱۰ و ۲۰-۱۵ سال) ارتباط میان بیان ژن‌ها و مدت زمان بیماری به صورت جداگانه ارزیابی گردید. نتایج به وضوح نشان دادند که برای ژن‌های Sox4 و Sox12 ارتباط معناداری میان بیان نسبی ژن و مدت زمان ابتلا به بیماری مشاهده نشد، به عبارت دیگر بیان نسبی ژن از یک روند خاصی تبعیت نمی کند (نمودار ۳. الف و ج).

در مورد ژن Sox11 مشاهده گردید که با افزایش مدت زمان ابتلا به بیماری، بیان نسبی ژن دارای یک روند کاهشی است، اما کاهش بیان ژن برای هیچ کدام یک از دوره‌های بیماری با درجه اطمینان ۹۵ درصد دارای ارتباط معناداری نبود (نمودار ۳- ب).



نمودار ۳) بررسی مقایسه ارتباط بیان نسبی ژن‌های Sox4 (الف)، Sox11 (ب) و Sox12 (ج) با مدت زمان ابتلاء به بیماری (برحسب سال) اعداد مرزی در محور طول‌ها مربوط به طبقه پایین هستند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. از آزمون واریانس یکطرفه برای مقایسه داده‌ها استفاده شد.

Fig 3) Comparison of the relationship between the relative genes expression of Sox4 (a), Sox11 (b) and Sox12 (c) with the duration of the disease (years), border numbers in the length axis belong to the lower group. Results are reported as mean ± standard deviation. One-way ANOVA was used to compare data.

بحث

عملکرد ژن‌های SoxC به عنوان تنظیم کننده‌های مرگ سلولی، تکثیر و بقا در فرایندهای اصلی فیزیولوژیک و پاتولوژیک در بسیاری از اندام‌ها گزارش شده است (۷). در حالی که نقش Sox12 در محیط in vivo به طور کامل گزارش نشده، چندین مطالعه بر روی مشخص شدن نقش Sox4 و Sox11 در محیط in vivo تمرکز داشته‌اند و کشف نقش‌های مهم برای این دو ژن را در فرایندهای متعدد رشدی، فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی گزارش نموده‌اند (۵). همان‌طور که اشاره شد، مطالعات پیشین حاکی از نقش Sox4 و Sox11 در بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مرکزی هستند؛ با این وجود به

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

نظر می‌رسد که نقش Sox12 در انسان کم رنگ‌تر از دو ژن دیگر است. دای (Dy) و همکاران، با استفاده از نورترن بلات و هیبریداسیون درجا تأیید کردند که، Sox11 ترانس اکتیویتور قوی‌تری نسبت به Sox4 است و همچنین ثابت کردند که Sox12 نیز یک ترانس اکتیویتور است اما نسبت به Sox4 و Sox11 ضعیف‌تر است (۵). آن‌ها نشان دادند که سه ژن خانواده SoxC به‌صورت هم زمان در سطوح بالا در بافت‌های عصبی و مزانشیمی در موش و در سطوح متغییر نسبی در بسیاری از بافت‌های دیگر از جمله قلب، تیموس، طحال و فولیکول‌های مو بیان می‌شوند (۵). همچنین مشخص شده است که ژن‌های SoxC در لنفوسیت‌های T و B بیان می‌شوند (۱۷). در این میان طی مطالعات مختلف نشان داده شد که Sox4 با غیرفعال شدن یا بیان نادرست در موش یا جوجه دارای نقش‌های ضروری در توسعه دریچه‌های قلب، تمایز لنفوسیت‌های T و B، توسعه اوستئوبلاست و توسعه سلول‌های گلیال و عصبی است (۵، ۱۸ و ۱۹). از طرفی مشخص شده است که زمانی که Sox4 و Sox11 بیش از اندازه بیان شوند، گلیکوژنز را مهار کرده در حالی که سبب توسعه دادن نوروژنز می‌شوند (۲۰). طی بررسی‌های انجام شده توسط مطالعات الکتروپروتئین بر روی لوله عصبی جوجه نشان داده شده است که افزایش بیان Sox4 و یا Sox11 منجر به القا زودرس مارکرهای عصبی می‌شوند (۶). ثابت شده است که پروتئین‌های SoxC به میزان زیادی در فرایند نوروژنز کار می‌کنند. با توجه به این فرض، حذف همزمان دو فاکتور Sox4 و Sox11 در موش منجر به آپوپتوز گسترده از طریق توسعه سیستم عصبی مرکزی می‌شود که غالباً نورون‌های نابالغ را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸ و ۲۱). بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده، این نتیجه مشخص می‌شود که در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی مانند MS، احتمالاً بیان چنین فاکتورهایی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. مطالعه حاضر کاهش در ژن‌های گروه SoxC در افراد با بیماری MS در مقایسه با افراد کنترل سالم نشان داد. بنابراین این احتمال وجود دارد که ژن‌های مورد مطالعه به صورت غیرمستقیم در بیماری‌زایی MS نقشی داشته باشند. نکته قابل توجه در مطالعه حاضر این است که بررسی بیان ژن‌های ذکر شده، بر روی نمونه خون محیطی صورت گرفته است. با توجه به اینکه در مطالعات قبل و همچنین مطالعه ما نشان داده شد که ژن‌های گروه SoxC دارای بیان مشابهی هستند. بنابراین تأثیر آن‌ها در مکانیسم بیماری می‌تواند مشابه باشد. ژن Sox4 می‌تواند تمایز لنفوسیت‌های B را تسهیل و آن‌ها را به سمت بلوغ هدایت کند (۲۲). اما نقش ژن‌های Sox11 و Sox12 در این زمینه تاکنون مشخص نشده است. با این وجود به دلیل همپوشانی و شباهت بیان و عملکرد ژن‌های SoxC می‌توان این چنین نقشی را برای ژن‌های Sox11 و Sox12 نیز پیش‌بینی کرد. کاهش بیان در هر سه ژن، کاهش در تمایز سلول‌های Pro-B Cell را به دنبال دارد. از طرفی کاهش معنادار ژن‌های Sox4 و Sox11 در ناتوانی شدید مشاهده شد. در این حالت بازسازی میلین و یا تخریب بیشتر آن رخ داده است. پتانسیل رشد ذاتی نورون‌های آسیب دیده، که تاحدی توسط فعال‌سازی کمپلکس‌های مرتبط به رونویسی منعکس شده، به‌عنوان یک عنصر مرکزی در ترمیم موفقیت‌آمیز عصب‌ها شناخته شده است (۲۳ و ۲۴). بیان فاکتورهای رونویسی القا شده توسط آسیب، به صورت بحرانی مهم است، زیرا آن‌ها بیان چندین ژن را تنظیم می‌کنند که به میزان زیادی بقا و رشد بالقوه نورون‌های آسیب دیده را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵ و ۲۶). در یک مطالعه بر روی Sox4 اثبات شد که این

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

فاکتور توسط TGF-β القاء می‌شود و تمایز سلول‌های Th2 را با تنظیم منفی بر روی GATA3 (فاکتور رونویسی مؤثر در تمایز Th2) کاهش می‌دهد. Sox4 سبب مهار اتصال GATA3 به جایگاه اتصالی بر روی DNA می شود و این عملکرد را هم از طریق اتصال به GATA3 و هم اتصال به جایگاه پروموتری آن انجام می‌دهد (۲۷). در زمان شروع تمایز Th2، تحریک رسپتورهای T، به نظر می‌رسد بیان Sox4 را کاهش داده و عملکرد GATA3 را برای القاء تمایز Th2 تسهیل می‌کند. اما در حضور TGF-β و القاء بیان Sox4 تمایز سلول‌های Th2 مهار می‌شود (۲۷). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کاهش عمده در پیام‌رسانی TGF-β در بیماری MS سبب کاهش عمده فاکتورهای پایین دست آن در سیستم گردش خون محیطی و کاهش سطح بیان ژن‌هایی است که توسط TGF-β تنظیم می‌شوند (۲۸).

TGF-β یک سیتوکین پلیوتروپیک می باشد که سبب همئوستازی ایمنی می‌شود و این عملکرد را با مهار تکثیر، تمایز و فعال‌سازی سلول‌های افکتور در سیستم ایمنی انجام می‌دهد (۲۹). موش‌هایی که در سیگنالینگ TGF-β دچار نقص هستند، در نتیجه فعال شدن مداوم سلول‌های T به میزان زیادی التهاب ایجاد می‌کند (۳۰). در بیماری MS، سیگنالینگ TGF-β دچار تغییرات قابل توجهی می‌شود و کاهش در سیگنالینگ این فاکتور در بیماری MS اثبات شده است (۳۱). بنابراین فاکتورهای پایین دست TGF-β و از جمله Sox4 نیز دچار کاهش قابل توجهی خواهند شد. نتیجه این کاهش بیان، افزایش در تولید سلول‌های T افکتور و تکوین بیماری می‌باشد. از طرف دیگر پروتئین‌های گروه SoxC در تمایز سلول‌های B نیز نقش دارند. کاهش در بیان این پروتئین‌ها می‌تواند نقص در تمایز سلول‌های B را سبب شوند (۳۲). یکی از اثرات این مورد به هم خوردن تعادل سیتوکین‌های پیش‌التهابی و یا ضدالتهابی تولید شده توسط این سلول‌ها می‌باشد. برای مثال اینترلوکین ۱۰ یکی از سیتوکین‌های ضدالتهابی توسط سلول‌های B تولید می‌شود. مشخص شده است در موش‌های EAEبا نقص در سلول‌های B و عدم تولید IL-10، بیماری به صورت شدیدتری خود را نشان می‌دهد (۳۳). همچنین میزان سیتوکین هایی مانند IL-6 در بیماران مبتلا به MS افزایش قابل توجهی دارد (۳۴). علاوه براین نقص در تمایز سلول‌های B عدم تولید فاکتور TGF-β تولید شده توسط این سلول‌ها را سبب می‌شود که نتیجه آن تولید سلول‌های T افکتور و تکوین بیماری MS می‌باشد (۲۹).

نتیجه‌گیری

در مجموع در بیماران مبتلا به MS بیان هر سه ژن به صورت کاملاً مشابه کاهش یافته است. از اینرو این داده‌های حاصل از بیان نسبی، شواهدی را ایجاد می‌کنند که سه ژن متعلق به خانواده ژنی SoxC ممکن است از لحاظ عملکردی در بسیاری از فرایندها با یکدیگر برهمکنش داشته باشند (۵). این اطلاعات همچنین به این نکته اشاره دارند که، سه ژن ممکن است به دلیل بیان مشابه دارای شباهت در عناصر پروموتری و یا در سایر مناطق تنظیمی باشند. با اثبات نقش ژن‌های SoxC در مراحل مختلف نورون‌زایی، تخریب و آسیب‌های عصبی وارد شده به بافت و سلول‌های عصبی سبب ایجاد تغییرات بیان این سه ژن می‌شود. به طوری که به نظر می‌رسد تغییرات بیان این سه ژن می‌تواند تا حدودی مکانیسم درگیر در بیماری را مشخص کرده و یا مسیری به سمت تشخیص برای بیماران مبتلا به MS باشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

سپاس و قدردانی

نویسندگان قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که حامی معنوی این مطالعه بودند، اعلام می‌دارند. همچنین بدین‌وسیله از کلیه افرادی که در این مطالعه ما را یاری کردند سپاسگزاری می‌کنیم. گرنت شماره 98GRD30M32855 دریافت شده توسط نویسنده مسئول برای کمک به تکمیل مطالعه استفاده شده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

References:

1.Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty Pairs Of Sox: Extent, Homology, And Nomenclature Of The Mouse And Human Sox Transcription Factor Gene Families. Dev Cell 2002; 3(2): 167-70.
2.De La Rocha AMA, Sampron N, Alonso MM, et al. Role Of Sox Family Of Transcription Factors In Central Nervous System Tumors. Am J Cancer Res 2014; 4(4): 312-24.
3.Sarkar A, Hochedlinger K. The Sox Family Of Transcription Factors: Versatile Regulators Of Stem And Progenitor Cell Fate. Cell Stem Cell 2013; 12(1): 15-30.
4.Pevny L, Placzek M. Sox Genes And Neural Progenitor Identity. Curr Opin Neurobiol 2005; 15(1): 7-13.
5.Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, et al. The Three Soxc Proteins—Sox4, Sox11 And Sox12—Exhibit Overlapping Expression Patterns And Molecular Properties. Nucleic Acids Res 2008; 36(9): 3101-17.
6.Hoser M, Potzner MR, Koch JM, et al. Sox12 Deletion In The Mouse Reveals Nonreciprocal Redundancy With The Related Sox4 And Sox11 Transcription Factors. Mol Cell Biol 2008; 28(15): 4675-87.
7.Bhattaram P, Penzo-Méndez A, Sock E, et al. Organogenesis Relies On Soxc Transcription Factors For The Survival Of Neural And Mesenchymal Progenitors. Nat Commun 2010; 1(1): 1-12.
8.Bergsland M, Werme M, Malewicz M, et al. The Establishment Of Neuronal Properties Is Controlled By Sox4 And Sox11. Genes Dev 2006; 20(24): 3475-86.
9.Huang W, Chen Z, Shang X, et al. Sox12, A Direct Target Of FoxQ1, Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis Through Up-Regulating Twist1 And FGFBP1. Hepatology 2015; 61(6): 1920-33.
10.Bansil S, Cook SD, Rohowsky-Kochan C. Multiple Sclerosis: Immune Mechanism And Update On Current Therapies. Ann Neurol 1995; 37(Suppl 1): S87-101.
11.Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple Sclerosis Genetics. Lancet Neurol 2014; 13(7): 700-9.
12.Patsopoulos NA. Genetics Of Multiple Sclerosis: An Overview And New Directions. Cold Spring Harb Perspect Med 2018; 8(7): a028951.
13.Goldenberg MM. Multiple Sclerosis Review. Pharm Therapeut 2012; 37(3): 175-84.
14.Thompson AJ, Reingold SC, Cohen JA. Applying The 2017 Mcdonald Diagnostic Criteria For Multiple Sclerosis–Authors' Reply. Lancet Neurol 2018; 17(6): 499-500.
15.Petzold A. Applying The 2017 Mcdonald Diagnostic Criteria For Multiple Sclerosis. Lancet Neurol 2018; 17(6): 496-7.
16.Kurtzke JF. On The Origin Of EDSS. Mult Scler Relat Disord 2015; 4(2): 95-103.
17.Smith E, Sigvardsson M. The Roles Of Transcription Factors In B Lymphocyte Commitment, Development, And Transformation. J Leukoc Biol 2004; 75(6): 973-81.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

18.Cheung M, Abu-Elmagd M, Clevers H, et al. Roles Of Sox4 In Central Nervous System Development. Brain Res Mol Brain Res 2000; 79(1-2): 180-91.
19.Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, et al. Differential Expression Of Sox4 And Sox11 In Medulloblastoma. J Neurooncol 2002; 57(3): 201-14.
20.Usui A, Mochizuki Y, Iida A, et al. The Early Retinal Progenitor-Expressed Gene Sox11 Regulates The Timing Of The Differentiation Of Retinal Cells. Development 2013; 140(4): 740-50.
21.Sock E, Rettig SD, Enderich J, et al. Gene Targeting Reveals A Widespread Role For The High-Mobility-Group Transcription Factor Sox11 In Tissue Remodeling. Mol Cell Biol 2004; 24(15): 6635-44.
22.Penzo-Méndez AI. Critical Roles For Soxc Transcription Factors In Development And Cancer. Int J Biochem Cell Biol 2010; 42(3): 425-8.
23.Snider WD, Zhou FQ, Zhong J, et al. Signaling The Pathway To Regeneration. Neuron 2002; 35(1): 13-6.
24.Sun F, He Z. Neuronal Intrinsic Barriers For Axon Regeneration In The Adult CNS. Curr Opin Neurobiol 2010; 20(4): 510-8.
25.Abe N, Cavalli V. Nerve Injury Signaling. Curr Opin Neurobiol 2008; 18(3): 276-83.
26.Jenkins R, Hunt SP. Long-Term Increase In The Levels Of C-Jun Mrna And Jun Protein-Like Immunoreactivity In Motor And Sensory Neurons Following Axon Damage. Neurosci Lett 1991; 129(1): 107-10.
27.Kuwahara M, Yamashita M, Shinoda K, et al. The Transcription Factor Sox4 Is A Downstream Target Of Signaling By The Cytokine TGF-B And Suppresses T(H)2 Differentiation. Nat Immunol 2012; 13(8): 778-86.
28.Dobolyi A, Vincze C, Pál G, et al. The Neuroprotective Functions Of Transforming Growth Factor Beta Proteins. Int J Mol Sci 2012; 13(7): 8219-58.
29.Li MO, Wan YY, Sanjabi S, et al. Transforming Growth Factor-B Regulation Of Immune Responses. Annu Rev Immunol 2006; 24: 99-146.
30.Gorelik L, Flavell RA. Abrogation Of Tgfβ Signaling In T Cells Leads To Spontaneous T Cell Differentiation And Autoimmune Disease. Immunity 2000; 12(2): 171-81.
31.Meoli EM, Oh U, Grant CW, et al. TGF-B Signaling Is Altered In The Peripheral Blood Of Subjects With Multiple Sclerosis. J Neuroimmunol 2011; 230(1-2): 164-8.
32.Li R, Bar-Or A. The Multiple Roles Of B Cells In Multiple Sclerosis And Their Implications In Multiple Sclerosis Therapies. Cold Spring Harb Perspect Med 2019; 9(4): 1-16.
33.Fillatreau S, Sweenie CH, Mcgeachy MJ, et al. B Cells Regulate Autoimmunity By Provision Of Il-10. Nat Immunol 2002; 3(10): 944-50.
34.Moghadasi M, Edalatmanesh M, Moeini A, et al. Effect Of 8 Weeks Resistance Training On Plasma Levels Of Nerve Growth Factor And Interlukin-6 In Female Patients With Multiple Sclerosis. Iran South Med J 2015; 18(3): 527-37. (Persian)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]

Iran South Med J 2021; 24(3): 160-171

Original Article

SoxC (sox4, sox11, sox12) Gene Expression in MS Patients

***M. Asad Samani** (MSc)[1*], **S. Reiisi** (PhD)[2**], **N. Riahi** (MSc)[1], **Sh. Kabiri** (MSc)[1]*

[1] *Department of Genetic, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran*

[2] *Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*

(Received 19 Mar, 2021 Accepted 21 Jun, 2021)

Abstract

Background: Sox genes are growth regulators that serve functions in sex determination, neural crest development, and neurogenesis. SoxC proteins include Sox4, Sox11, and Sox12, which cause the development of neural progenitor cells to immature neurons. In other words, one of the functions of these factors is the role they play in neurogenesis. Therefore, the aim of this study was to investigate the changes in the expression of SoxC genes in Multiple Sclerosis (MS).

Materials and Methods: This descriptive-analytical study seeks to evaluate the relative expression of SoxC genes. For this purpose, blood samples from 40 patients with MS and 40 healthy controls were examined. Total RNA extraction and complementary DNA synthesis (cDNA) were then performed, and the relative expression of the three genes Sox4, Sox11 and Sox12 was then obtained by real-time PCR. The data collected were analyzed using statistical methods.

Results: The results showed that the expression of Sox4, Sox11 and Sox12 genes were significantly downregulated in the patients with MS compared to the controls (P=0.009, P=0.019, and P=0.001). Also, with increasing disability in individuals with MS, gene expression decreased significantly for Sox4 and Sox11, but the change was not significant for Sox12.

Conclusion: The present study revealed that the expression of SoxC genes is lower in MS. Considering the functional role of Sox genes as proteins involved in neurogenesis, the abnormal expression of members of this gene family is implicated in various diseases.

Keywords: Multiple Sclerosis, SoxC gene family, gene expression, EDSS

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Asad Samani M, Reiisi S, Riahi N, Kabiri Sh. SoxC (sox4, sox11, sox12) Gene Expression in MS Patients. Iran South Med J 2021; 24(3): 160-171

Copyright © 2021 Asad Samani, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence*: Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: s.reiisi@ sku.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-9514-3084
**ORCID: 0000-0001-6843-7645

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2022-01-27]