ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۳، شماره۵، آذر و دی ۱۳۹۷(شماره پی در پی ۱۳۰)

کاهش بیان ژن *Smurf2* Smad ubiquitin (regulatory factor 2) در بیماران مبتلا به RRMS و همراهی با افزایش میزان ناتوانی

فرشته بهداروند دهکردی[۱]، سمیه رئیسی[۱و۲*]، پریسا محمدی نژاد[۱]

[۱]گروه ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران، [۲] گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ وصول: ۱۰/۳۰/ ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس(MS)، یک بیماری التهابی مزمن در دستگاه عصبی مرکزی می‌باشد، که با تخریب غلاف میلین سلول‌های عصبی همراه است. یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌هایی که در استعداد و یا تعدیل بیماری MS نقش دارد، فاکتور تغییر دهنده‌ی رشد بتا(TGF-B) می‌باشد. ژن *smurf2* نقش مهمی‌در تعیین صلاحیت سلول در پاسخ به مسیر سیگنالینگ TGF-β دارد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر مشخص شدن نقش ژن *smurf2* در این مسیر سیگنالینگ و همراهی آن با فاکتورهای بالینی در بیماران MS می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی، ۵۰ نمونه MS و ۵۰ نمونه کنترل سالم بود. در ابتدا ۲ سی‌سی خون محیطی از تمام بیماران مورد مطالعه گرفته شد. پس از استخراج RNA تام و سنتز DNA مکمل (cDNA)، بیان نسبی ژن با استفاده از روش کمی Real Time PCR به دست آمد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تی تست و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان میانگین بیان نسبی ژن *Smurf2* در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم با کاهش بیان همراه بوده است(p=۰/۰۳). هم‌چنین این کاهش بیان در حالت ناتوانی(EDSS) شدید به صورت معنی‌داری مشاهده شد، به صورتی که با افزایش ناتوانی در بیماران مبتلا به MS میزان بیان ژن *Smurf2* کاهش یافته است (p=۰/۰۰۹).

نتیجه‌گیری: با توجه به این که *smurf2* یک پروتئین درگیر در مسیر سیگنالینگ TGF-B می‌باشد، در اینجا ممکن است کاهش بیان *smurf2* بر روی این مسیر به گونه‌ای باشد که با تأثیر بر لیگاند اصلی آغازگر مسیر، سبب ایجاد ناهنجاری در سلول شود و در نهایت ممکن است بر تمایز نورونی تأثیر گذارد.

واژه‌های کلیدی: *Smurf2*، RRMS، بیان ژن

* **نویسنده مسئول:** سمیه رئیسی، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، گروه ژنتیک

Email: s.reiisi@sci.sku.ac.ir

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس(MS)[1]، یک بیماری التهابی در سیستم عصبی مرکزی است که با التهاب و از بین رفتن غلاف چربی پوشاننده اعصاب بدن که میلین نامیده می‌شوند، همراه است(۱). علایم بیماری MS ممکن است بین ۱۰ تا ۸۸ سالگی شروع شود، اما به طور معمول بین ۲۰ تا ۴۰ سالگی و میانگین سنی ۳۲ سالگی رخ می‌دهد(۲). MS دارای علایمی هم‌چون اختلال عملکرد در مغز و ستون فقرات نیز می‌باشد که منعکس کننده تضعیف نواحی خاصی از سیستم عصبی درگیر می‌باشد. نواحی تحت تأثیر قرار گرفته بین بیماران مختلف، متنوع است و مختص یک بیمار نمی‌باشد. معیار پاتولوژیکی، دمیلینه شدن تورمی و ضایعات آکسونی می‌باشد. تورم در اصل به وسیله لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر ایجاد می‌شود که سلول‌های ایمنی از جمله ماکروفاژها را به کار می‌گیرند و منجر به آسیب بافت می‌شود(۴ و۳). در نهایت رویدادهایی از جمله، التهاب میلین و آسیب آکسون و گلیوز را شامل می‌شود(۵). سیر بیماری شامل چهار نوع مختلف می‌باشد که در این میان نوع پیش‌رونده ـ بهبودپذیر(RRMS)[2] با عود و بهبود کامل، اکثریت بیماران یعنی حدود ۸۵ درصد را شامل می‌شود. این مرحله به خصوص در فازهای اولیه، ۱ یا ۲ بار در سال رخ می‌دهد، ولی طی چند ماه بهبودی حاصل می‌شود(۷ و۶).

تحقیق‌های اخیر نشان داده است که MS با متغیرهای بسیاری به طور پویا در تعامل می‌باشد و بسیاری از فرآیندهای پیچیده به طور هم‌زمان در پاتوژنز بیماری دخیل می‌باشند(۸). فاکتور تغییر دهنده‌ی رشد بتا(TGF-β)[3] پروتئینی است که به عنوان سیتوکین چندمنظوره در نورون‌های عصبی شناخته شده است. ساختار TGF-β سیگنالینگ، شامل سرین کینازی می‌باشد که جزء گیرنده‌های پروتئین‌های غشایی است و در سیستم عصبی مرکزی وجود دارد. مکانیسم‌های بالقوه‌ی حفاظت عصبی به وسیله TGF-β شامل؛ اقدامات ضد التهابی، آپوپتوز، ترویج تشکیل اِسکار، آنژیوژنز، و ایجاد عصب نوترکیب می‌باشد. حالت کلی سیستم گردش خون محیطی و کاهش سطح ژن‌های تنظیم شده با TGF-β حاکی از کاهش کلی سیگنالینگ TGF-β در MS بوده است. به طور کلی تجزیه و تحلیل TGF-β در خون منجربه داده‌های بحث برانگیزی شده است به طوری‌که داده‌ها در مطالعه‌های مختلف دارای تناقض بودند(۳). یکی از ژن‌های درگیر در این مسیر سیگنالینگ ژن Smurf2 می‌باشد. E3 یوبیکوئیتن پروتئین لیگاز (Smurf2) یک آنزیم است که در انسان به وسیله ژن *Smurf2* کدگذاری می‌شود و نقش مهمی را در تعیین صلاحیت سلول در پاسخ به مسیر سیگنالینگ TGF-β دارد(۹).

بررسی‌های انجام شده در تمایز نورونی نشان داده است که *Smurf2* به واسطه تخریب EZH2 همرا با دخالت PPARg، باعث افزایش تمایز نورون از

1-Multiple Sclerosis (MS)
2-Relapsing Remitting Multiple Sclerosis
3-Transforming Growth Factor Beta

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان می‌شود(۱۰). هم‌چنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام گرفت مشخص شد که *Smurf2* با تخریب EZH2 منجر به افزایش تمایز نورون و بهبود عملکرد آن پس از سکته مغزی ایسکمیک می‌شود. از طرفی تعامل MPAR3 با یوبیکوئیتین Smurf2 برای ایجاد قطبیت عصبی مورد نیاز است(۱۱). هم‌چنین در مواردی کاهش سطوح ژن‌های تنظیم شده با TGF-β نشان‌گر کاهش کلی سیگنال دهی TGF-β در MS می‌شود(۱۲). بنابراین نقص در سیستم یوبیکوئیتین به علت تنوع عملکرد آن در چندین بیماری مانند؛ آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون، انواع مختلفی از سرطان‌ها و عفونت‌های میکروبی دخیل است(۱۳). با مطالعه بر روی سیستم پروتئازوم یوبیکوئیتین همراه با آنزیم‌های این مسیر و پروتئین‌های دخیل در آن می‌توان تا حد زیادی نقش این مسیر را در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نشان داد. بدین جهت هدف از این مطالعه بررسی شناخت دقیق‌تر نقش ژن *Smurf2* به عنوان یک پروتئین دخیل در مسیر سیگنالینگ TGF-β و همراهی آن با فاکتورهای بالینی در بیماران MS می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه‌حاضر از نوع توصیفی، تحلیلی بوده، در این مطالعه تعداد ۵۰ بیمار مبتلا به MS و ۵۰ کنترل سالم مورد بررسی قرار گرفته‌اند. معیار ورود افراد بیمار به مطالعه، بر مبنای تشخیص بیماری بر اساس معیارهای مک دونالد(McDonald)(۱۴) و تأیید دو نفر پزشک متخصص مغز و اعصاب بوده است. هم‌چنین افرادی که دارای معیارهای تشخیص هر نوع بیماری عصبی بوده‌اند از مطالعه خارج شده‌اند. در این مطالعه افرادی که هیچ گونه بیماری عصبی نداشته‌اند به عنوان افراد گروه کنترل مورد بررسی قرارگرفته‌اند. نمونه‌گیری از افراد بیمار و کنترل با روش انتخاب تصادفی به انجام شد، در کنار نمونه‌گیری پرسشنامه‌ای حاوی اطلاعات دموگرافیک(جمعیت‌شناسی) و سابقه پزشکی برای هر بیمار تکمیل گرفته شد و از کلیه بیماران رضایت‌نامه کتبی أخذ شد.

RNAتام نمونه‌های خون به کمک کیت MN آلمان(Magnary Nagel-Germany) استخراج شد. در این مرحله به دلیل حساس بودن مراحل استخراج RNA و هم‌چنین مقاومت بالای آنزیم RNase تمامی مراحل استخراج RNA در شرایط عاری از RNase انجام شد. برای بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. سپس RNAهای استخراج شده جهت انجام سایر مراحل در دمای ۷۰ ــ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد سنتز cDNA به وسیله کیت TAKARA (Clontech, Japan) طبق دستورالعمل کلی این کیت در دو مرحله انجام گرفت. که در ابتدا پرایمرهای تصادفی شش تایی و oligo-dt و آنزیم رونوشت بردار معکوس اضافه شد و سپس مواد حاصله در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵دقیقه و دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه

قرار داده شدند. در نهایت cDNAهـای بـه دسـت آمـده برای آزمایش‌های مولکولی و بررسی بیـان ژن مـورد استفاده قرار گرفتند.

در ایـن پـژوهش ابتـدا تـوالی ژن اختصاصـی *Smurf2* و *β-actin* (به عنوان کنتـرل داخلـی) از پایگـاه NCBI گرفته شـد و سـپس طراحـی پرایمـر بـه وسـیله نرم‌افزار طراحی پرایمر اولیگو نسخه۷ صورت گرفت. جهت بررسی بیان ژن *Smurf2* در بیماران مبتلا به MS نسبت به افراد کنترل از روش سایبر گـرین و دسـتگاه Rotor Gene 6000 استفاده شـد. پـس از پایـان واکـنش، تجزیه و تحلیل نتایج، بعد از تعیین سـیکل آسـتانه(Ct) صورت می‌گیرد و میزان بیان نسـبی ژن مـوردنظر از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

برای مشخص شدن میزان بیـان ژن *Smurf2* و میزان ناتوانی، مطابق معیار Kurtzke افراد بیمار بـه دو گروه تقسیم شدند، بدین ترتیب افراد با نـاتوانی ملایـم تا متوسط در یک گروه و افـراد بـا نـاتوانی شـدید در گروه دیگر قرار گرفتند. در گروه اول EDSS برابـر بـا ۵/۵ـ۰ می‌باشد که افراد دچار ناتوانی در راه رفتن و یا ناتوانی حداقل می‌باشند و گـروه دوم EDSS برابـر بـا ۱۰ـ۶ می‌باشد که افراد در این حالـت نـاتوانی شـدیدی در راه رفتن دارند به گونه‌ای که برای راه رفتن نیاز به کمک دارند و یا محدود به رختخواب می‌شوند(۱۵). بر اساس این معیار، بیماران بر اسـاس مقیـاس وضـعیت ناتوانی گسترش یافته(EDSS)[1] ارزیابی می‌شوند، کـه رتبه‌بندی آن‌هـا از ۰ تـا ۱۰ اسـت و هـر چـه بیمـاران نمرات بالاتری را نشان دهند، ناتوانی در آن‌ها شدیدتر است (۱۶). پس از تشخیص درجه‌ی ناتوانی در افـراد بیمار میزان بیان ژن بـا میـزان نـاتوانی مـورد تحلیـل قرار گرفت. همچنین جهت مشخص کردن ارتباط بیان ژن *Smurf2* و مدت زمان بیماری طول مدت بیمـاری از زمان تشخیص تا زمان نمونه‌گیری در نظر گرفته شد. و پس از قرار دادن افراد مبتلا به MS در ٤ گروه (۵-۱ سال، ۱۰- ۵ سال، ۱۵-۱۰ سال، ۲۰-۱۵ سـال) ارتبـاط میان بیان ژن و مدت زمان بیمـاری سـنجیده شـد. در بررسی میزان بیان نسبی ژن *Smurf2* نسبت به سن، با توجـــه بـــه میـــانگین ســـنی محاســـبه شـــده در افراد بیمار(۱/۱±۳۲/۶۸) بین دو گـروه سـنی زیـر ۳۲ سال و بالای ۳۲ سال سنجیده شد. هم‌چنین میـزان بیـان ژن *Smurf2* نسـبت بـه جنسـیت بـین دو گـروه زنان و مردان بیمار در جمعیت مورد مطالعـه بررسـی گردید.

داده‌هـــای جمـــع‌آوری شـــده بـــا اســـتفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Excel و آزمون‌های آمـاری تـی تست و آنـالیز واریـانس یـک طرفـه تجزیـه و تحلیـل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۵۰ فرد سالم بـا میـانگین سـنی ۲/۸۱±۳۴/۲۴ و ۵۰ فرد مبتلا به MS بـا میـانگین سـنی ۱/۱±۳۲/۶۸ مورد بررسـی قـرار گرفتنـد. بیمـاران MS همه از نوع RRMS بودنـد و بیمـاری آن‌هـا بـه وسـیله

1-Expanded Disability Status Scale

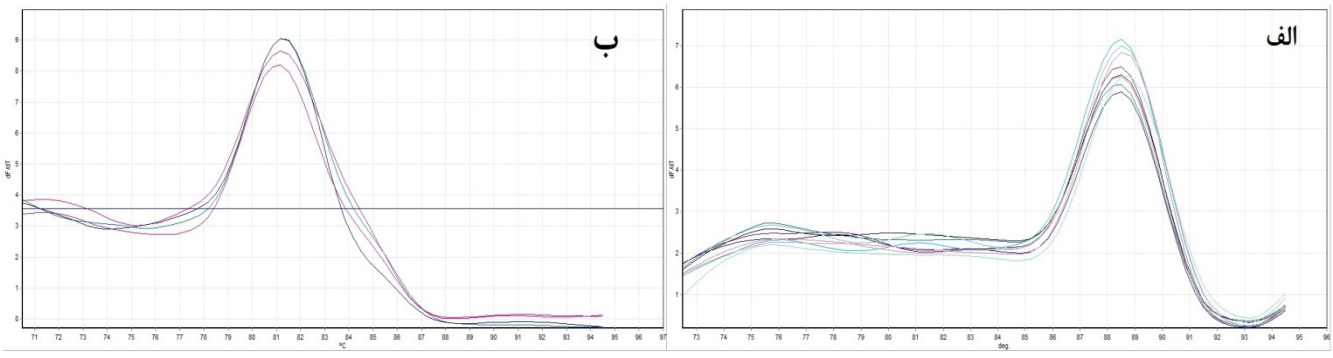
پزشک متخصص، آزمایش‌های بالینی و MRI تأیید شده بود. جهت بررسی بیان ژن *Smurf2* در بیماران مبتلا به MS نسبت به افراد کنترل از واکنش Real time PCR استفاده شد. منحنی ذوب ایجاد شده برای ژن *β-actin* و *Smurf2* قبل از آنالیز داده‌ها (شکل ۱ـ الف و ب) نشان دهنده اختصاصی بودن پرایمرها می‌باشد، که فقط یک قله در هر بار آزمایش مشاهده شد. برررسی بیان ژن *Smurf2* در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم حاکی از کاهش میانگین میزان بیان نسبی *Smurf2* در نمونه‌های بیمار نسبت به سالم، می‌باشد،سطح معنی‌دار محاسبه‌شده برابر با ۰/۰۳ می‌باشد(شکل ۲).

در رابطه با میانگین بیان ژن نسبت به سن در این مطالعه بین دو گروه سنی زیر ۳۲ سال و بالای ۳۲ سال نتایج نشان دهنده‌ی کاهش معنادار میزان بیان ژن *Smurf2* در افراد بالای ۳۲ سال بوده است(p=۰/۰۲۴)، (شکل ۳ـ نمودار الف). در بررسی ارتباط میزان بیان ژن *Smurf2* نسبت به جنسیت، میزان بیان ژن *Smurf2* در زنان بیمار کم‌تر از مردان بیمار بوده، ولی این کاهش بیان با بررسی آماری، معنی‌دار نبوده است(p=۰/۴۷)، بنابراین نمی‌توان در ارتباط میان جنسیت با ژن مورد نظر با قطعیت صحبت کرد(شکل ۳ـ نمودار ب). در بررسی ارتباط بیان ژن *Smurf2* و مدت زمان بیماری نتایج نشان داده است که هر چه مدت زمان بیماری افزایش یابد بیان ژن *Smurf2* کاهش می‌یابد. هم‌چنین سطح معنی‌دار محاسبه شده با آزمون آنالیز واریانس، برابر با ۰/۰۱۸ می‌باشد(شکل ۳ـ نمودار ج). در ارتباط با میزان بیان ژن *Smurf2* و میزان ناتوانی نتایج حاکی از آن است که با افزایش ناتوانی در بیماران مبتلا به MS میزان بیان ژن *Smurf2* کاهش یافته است(p= ۰/۰۰۹)(نمودار د).

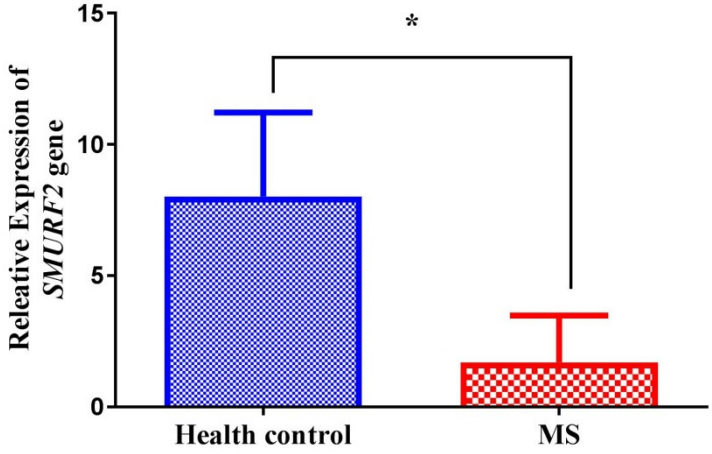
جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در روش Real Time PCR

پرایمر	توالی پرایمر (۳'-۵')	دمای ذوب(°C)*	سایز باند(bp)
Beta actin F	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	۵۸	۱۸۶
Beta actin R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG		
SMURF2-F	GGCAATGCCATTCTACAGATACT	۶۰	۱۵۴
SMURF2-R	CAACCGAGAAATCCAGCACCT		

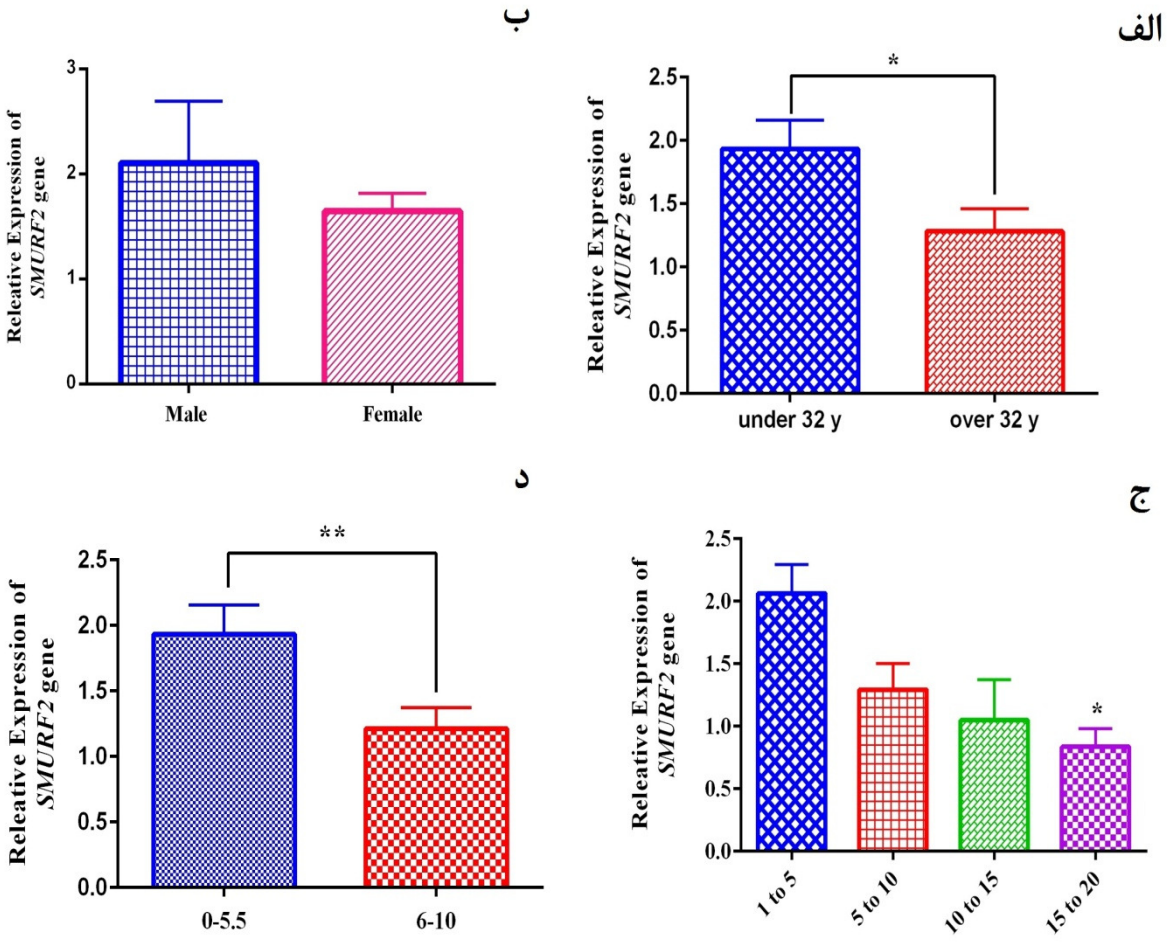
**دمای اشاره شده با توجه به نوع پرایمرها می‌باشد.



شکل ۱: الف) نمودار ذوب ژن *β-actin* ب) نمودار ذوب ژن *Smurf2*



شکل ۲: نمودار مقایسه میانگین میزان بیان ژن *Smurf2* در نمونه‌های بیمار و سالم



شکل ۳: نمودار ستونی مقایسه میزان بیان ژن *Smurf2* در الف) گروه‌های سنی زیر ۳۲ سال و بالای ۳۲ سال در افراد بیمار ب) گروه‌های زن و مرد بیمار ج) طول مدت بیماری از ۱ تا ۲۰ سال د) گروه‌های EDSS ملایم و شدید

بحث

بیماری‌های عصبی مانند آلزایمر(AD)[1] و پارکینسون(PD)[2] و MS در افراد رو به افزایش است. این بیماری‌ها با از دست دادن تعداد خاصی از عصب‌ها، انباشته شدن پروتئین‌ها در داخل و خارج از نورون‌ها و فعال سازی پاسخ‌های ایمنی در مغز مشخص می‌شوند. TGF-β عامل عصبی محافظت کننده و سازمان دهنده پاسخ‌های ایمنی در برابر آسیب‌ها هستند و به همین ترتیب می‌توانند نقش مهمی را در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی داشته باشند. مطالعه‌های آینده باید تعیین کند که آیا اختلال در مسیر سیگنالینگ TGF-β در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی دخالت دارد؟ و آیا این مسیر سیگنالینگ ممکن است به عنوان یک هدف برای درمان این بیماری‌ها باشد؟ مطالعه‌های ژنتیکی بر روی موش‌ها و بی‌مهره‌ها نشان دهنده نقش این مسیر در نگهداری و بقاء عصبی می‌باشد. بنابراین مطالعه‌ها به گونه‌ای که در بی‌مهره‌ها سیگنالینگ TGF-β دارای نقش کلیدی‌تری در عملکرد عضلانی و تنظیم سیناپس‌ها و احتمالاً شکل‌گیری و بازسازی سیناپس می‌باشد، لذا لازم است تا در کنار این مطالعه‌های حیوانی، تحقیق‌های بیش‌تری جهت ایجاد ارتباط وضعیت بیماری در انسان با بیان و توزیع مولکول‌های سیگنالینگ TGF-β صورت گیرد(۱۷). طبق مطالعه‌های موش‌هایی که *Smurf2* در آنها از کار انداخته شده بود آمادگی بیشتری برای مستعد شدن به گونه‌های زیادی از سرطان‌ها، مانند؛ سرطان‌های خوش‌خیم لنف و سلول‌های کبد، سرطان ریه و پستان و دیگر گونه‌های سرطانی داشتند. از طرفی پژوهش بلانک نشان داد کاهش بیان *Smurf2* در موش‌ها موجب شده که ۴۴ درصد از این موش‌ها تا سن ۲/۵ سالگی به گونه‌های بسیار مختلفی از سرطان دچار شوند(۱۸).

در مطالعه‌هایی مشخص شد، از کار انداختن *Smurf2* در جنین‌های موش منجربه تعداد زیادی تغییر مکان در ژن‌ها شد(۱۹). با توجه به این‌که *Smurf2* دارای چندین مولکول هدف می‌باشد، می‌توانیم این پرسش را مطرح کنیم که آیا کنترل سیگنال‌دهی TGF-β و میزان قطبیت الکتریکی سلول به وسیله *Smurf2* نیز به عنوان ویژگی‌های کلیدی در کارکرد آن به عنوان سرکوب کننده تومور می‌باشند یا خیر. با توجه به آن که بیشتر از ۱۰ تا ۱۵ درصد از مولکول‌های H2 با یوبیکوئیتین پیوند دارند و گونه‌های مختلف سرطان در نتیجه از کار افتادن Smurf2 ایجاد می‌شوند، با بررسی پاسخ این پرسش به طور بالقوه می‌توانیم شناخت‌های بهتری از سازوکارهای بیماری‌زایی به دست آوریم(۲۱ و ۲۰).

نکته قابل توجه در این مطالعه درجه ناتوانی بود که به وسیله‌ی معیار Kurtzke، حالت ناتوانی گسترده ارزیابی شد(۲۳ و ۲۲، ۱۵). پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهند، افزایش بیان *Smurf2* در فیبروبلاست، باعث تمایز و القای نورون‌های عصبی

1- Alzheimer
2- Parkinson

می‌شود(۱۰). بدین سبب احتمالاً در این‌جا کاهش *Smurf2* سبب اختلال در القاء نورونی شده و ناتوانی را بالا برده است. از طرفی مطالعه‌های نشان داده موش‌هایی که *Smurf2* در آنها جهش یافته، دچار آسیب‌هایی می‌شوند که در نهایت منجربه ایجاد نقص در بسته شدن لوله عصبی می‌شود(۲۴).

هم‌چنین لزی و آتیسانو دریافتند که *Smurf2* مربوط به E3 یوبیکوئیتین می‌باشد که نقش کلیدی آن در تنظیم پیام‌رسانی، قطبیت و جنبش‌های سلولی می‌باشد(۱۸). در این‌جا نیز ممکن است کاهش *Smurf2* پیام‌رسانی سلولی را تضعیف کرده و در نتیجه در مسیر پیام عصبی اختلال، ایجاد شده و میزان ناتوانی بالا رفته است.

مطالعه‌ها در سال ۲۰۱۳ نشان داد که برهمکنش *Smurf2* با smadهای فسفریله شده سبب تخریب سریع آن‌ها می‌شود(۲۵). از طرفی تحقیق‌های انجام شده در سال ۲۰۱۱ در افراد سالم، نشان داده است که پاسخ ایمنی *Smurf2* در سلول‌های عصبی و گلیال قابل اثبات نمی‌باشد، ولی برای smadهای فسفریله شده در نورون و گلیال مشاهده و اثبات شده است. یافته‌ها نشان می‌دهد که *Smurf2* نقش مهمی در پاتوژنز فلج متعارف پیشرفته[1] با توزیع غیر طبیعی مجدد هسته عصبی psmad2/3 به سیتوپلاسم ایفا می‌کند، که این مورد نه تنها ممکن است سبب ایجاد اختلال در مسیر سیگنالینگ TGF-B شود، بلکه فعالیت E3 را نیز کاهش دهد، بنابراین احتمال دارد با افزایش غلظت سیتوپلاسمی، متابولیسم سلولی را مختل کند و منجربه اختلالات عصبی شود(۲۷ و۲۶). این اختلالات عصبی ممکن است دلیل دیگری در افزایش ناتوانی در بیماران MS باشند که با کاهش بیان ژن *Smurf2* ایجاد می‌شود.

غیر فعال شدن ژن *Smurf2* در سلول‌های بنیادی موش‌های مهندسی شده، سبب شده تا سلول‌های فیبروبلاست[2] در حد بیش‌تری تکثیر و به صورت توده درآمده و سبب ایجاد تومور در موش شوند. *Smurf2* به صورت غیر مستقیم فرآیند پیوند هیستونی و یوبیکوئیتینه شدن و پایداری ژنومی را تنظیم می‌کند(۱۹). از طرفی در پژوهش بلانک، پژوهشگران پیوند H2B با یوبیکوئیتین را به عنوان یک ماده اولیه تازه برای *Smurf2* شناسایی کرده‌اند. زمانی که *Smurf2* در موش‌ها و یا در سلول‌های انسانی وجود نداشته باشد، RNF20 که در یوبیکوئیتینه شدن هیستون H2B و متیلاسیون هیستون‌ها نقش دارد، دیگر برای تجزیه شدن نشانه‌گذاری نمی‌شود، ولی شدیداً در محل انباشته شده و باعث پیوند بیش از حد H2B با یوبیکوئیتین می‌گردد. که در این صورت از فشرده شدن و بسته‌بندی کروماتین[3] جلوگیری می‌شود. پیش از این نشان داده شد که RNF20 در مکان‌هایی که DNA دو رشته‌ای شکستگی دارد، انباشته شده و در آن‌جا موجب پیوند یافتن هیستون H2B با یوبیکوئیتین و بازسازی DNA می‌شود(۲۹ و

1-Progressive Supranclear Palsy
2-Fibroblasts
2-Chromatin

۲۸). بنابراین هر چه مدت زمان بیماری افزایش یابد از فشردگی و بسته‌بندی صحیح کروماتین کاسته شده و احتمالاً در این‌جا آسیب وارد شده به DNA می‌تواند منجر به کاهش بیان ژن *Smurf2* شده باشد.

پیشنهاد می‌شود برای مشخص شدن اثر دقیق ژن و مکانیسم آن در بیماری، سایر ژن های موجود در مسیر سیگالینگ TGF-B نیز بررسی شوند. بررسی پروتئین بیان شده توسط ژن هم می تواند در روشن شدن دقیقتر نقش این فاکتور کمک کننده باشد.در صورت امکان چنین بررسی هایی مقدمه ای برای شناخت بیشتر بیماری و یا مسیرهای درمانی باشد.

نتیجه گیری

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن *Smurf2* در بیماران مبتلا به MS نسبت به افراد سالم دچار کاهش بیان مشخصی شده و بنابراین می‌تواند روی مسیر سیگنالینگ TGF-β تأثیرگذارد. از آن‌جا که این مسیر نقش مهمی در سرکوب پاسخ‌های ایمنی و التهابی متغیر ایفا می‌کند و بیماری MS نیز یک بیماری التهابی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد، می‌تواند فاکتور مهمی در این بیماری محسوب شود. با توجه به این که افزایش میزان *Smurf2* در فیبروبلاست باعث تمایز و القای نورون عصبی می‌شود، پس کاهش آن می‌تواند تأثیرات بالقوه‌ای روی سیستم عصبی ایجاد کند. از آن‌جایی که نقش این مولکول در مورد بیماری MS مشخص نشده است امید است با این مطالعه قدم کوچکی در جهت تشخیص و یا درمان بیماری برداشته شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در به انجام رساندن این مطالعه، حمایت و کمک خود را دریغ نکردند، ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1.Kemppinen A. Studies on causes of multiple sclerosis: From genes to transcriptome. Research/National Institute for Health and Welfare (THL)= Tutkimus/Terveyden ja hyvinvoinnin laitos: 65/2011, ACADEMIC DISSERTATION.
2.Harbo HF, Gold R, Tintoré M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. Therapeutic Advances in Neurological Disorders 2013; 6(4): 237-48.
3.Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. International Journal of Molecular Sciences 2012; 13(7): 8219-58.
4.Vercellino M, Trebini C, Capello E, Mancardi G, Giordana M, Cavalla P. Inflammatory responses in Multiple Sclerosis normal-appearing white matter and in non-immune mediated neurological conditions with wallerian axonal degeneration: A comparative study. Journal of Neuroimmunology 2017; 312: 49-58 .
5.Pantzaris MC, Loukaides GN, Ntzani EE, Patrikios IS. A novel oral nutraceutical formula of omega-3 and omega-6 fatty acids with vitamins (PLP10) in relapsing remitting multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept clinical trial. BMJ Open 2013; 3(4): e002170.
6.Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. The Lancet Neurology 2007; 6(10): 903-12.
7.Esmael A, El-Sherif M, Elazzouny AA. Effects of vitamin D deficiency on the relapse, severity, and disability of multiple sclerosis. The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery 2016; 53(3): 174.
8.Charalambidou E, Pantzaris M, Patrikios I. Multiple Sclerosis in Cyprus: A Fourteen Year (2000-2014)Epidemiological Study. American Journal of Epidemiology and Infectious Disease 2016; 4(1): 1-9.
9.Chandhoke A, Karve K, Dadakhujaev S, Netherton S, Deng L, Bonni S. The ubiquitin ligase Smurf2 suppresses TGFβ-induced epithelial–mesenchymal transition in a sumoylation-regulated manner. Cell Death & Differentiation 2016; 23(5): 876-88.
10.Yu YL, Chou RH, Shyu WC, Hsieh SC, Wu CS, Chiang SY, et al. Smurf2-mediated degradation of EZH2 enhances neuron differentiation and improves functional recovery after ischaemic stroke. EMBO Molecular Medicine 2013; 5(4): 531-47.
11.Khazaei M, Schwamborn J, Puschel A. The interaction of mpar3 with the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. The Febs Journal 2008; 275: 183.
12.Meoli EM, Oh U, Grant CW, Jacobson S. TGF-β signaling is altered in the peripheral blood of subjects with multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology 2011; 230(1): 164-8.
13.Yadav P, Doshi A, Yoo YJ, Prabha CR. The ubiquitin proteasome system with its checks and balances. Proteases in Physiology and Pathology: Springer; 2017; 549-77.
14.Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Annals of Neurology 2011; 69(2): 292-302.
15.Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis an expanded disability status scale (EDSS). Neurology 1983; 33(11): 1444.
16.Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. Neurology 2014; 83(11): 1022-4.
17.Tesseur I, Wyss-Coray T. A role for TGF-β signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. Current Alzheimer Research 2006; 3(5): 505-13.
18.Blank M, Tang Y, Yamashita M, Burkett SS, Cheng SY, Zhang YE. A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20. Nature Medicine 2012; 18(2): 227-34.
19.Wang X, Roberts CW. Cancer-fighting smurf. Nature Medicine 2012; 18(2): 204-5.
20.Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGFβ receptor for degradation .Molecular Cell 2000; 6(6): 1365-75.
21.Narimatsu M, Bose R, Pye M, Zhang L, Miller B, Ching P, et al. Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. Cell 2009;137(2): 295-307.
22.Kurtzke JF. Further to the origin of EDSS (Response to: L .Kappos et al:“On the origin of Neurostatus” Multiple Sclerosis and Related Disorders 2015; 4: 186). Multiple Sclerosis and Related Disorders 2015; 4(3): 186.

23.Kurtzke JF. On the origin of EDSS. Multiple Sclerosis and Related Disorders 2015; 4(2): 95-103.
24.Li Y-H, Werner H, Püschel AW. Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. Journal of Biological Chemistry 2008; 283(48): 33784-92.
25.Cao S, Xiao L, Rao JN, Zou T, Liu L, Zhang D, et al. Inhibition of Smurf2 translation by miR-322/503 modulates TGF-β/Smad2 signaling and intestinal epithelial homeostasis. Molecular Biology of the Cell 2014; 25(8): 1234-43.
26.Nakamura M, Ito H, Nakamura Y, Wate R, Kaneko S, Nakano S, et al. Smad ubiquitination regulatory factor-2 in progressive supranuclear palsy. Neuropathology and Applied Neurobiology 2011; 37(3): 307-14.
27.Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF-β Family Signaling by Inhibitory Smads. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2017; 9(3): a022095.
28.Fierz B, Chatterjee C, McGinty RK, Bar-Dagan M, Raleigh DP, Muir TW. Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. Nature Chemical Biology 2011; 7(2): 113-9.
29.Tarcic O, Granit RZ, Pateras IS, Masury H, Maly B, Zwang Y, et al. RNF20 and histone H2B ubiquitylation exert opposing effects in Basal-Like versus luminal breast cancer. Cell Death & Differentiation 2017; 24(4): 694-704.

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

Original Article

Down-Regulation *Smurf2 (*Smad ubiquitin Regulatory Factor 2) Gene in Patients With RRMS and Association With High Disability

Behdarvand Dehkordi F[1], Reiisi S[1,2*], Mohamadi Nejad P[2]

[1]Department of Genetic, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, [2]Department of Genetic, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 20 Jan 2018 Accepted: 3 Nov 2018

Abstract

Background & aim: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease in the central nervous system that is associated with degeneration of the myelin of neural system. One of the most important cytokines that are involved in the susceptibility to MS disease is beta-stimulating factor (TGF-β).The *smurf2* gene plays an important role in determining the competence of the cell in response to the signaling pathway of TGF- β. Therefore, the aim of this study was to determine the role of the smurf2 gene in this signaling pathway and its association with clinical factors in MS patients.

Methods: Blood samples obtained from 50 MS patients and 50 normal. First, 2ml of peripheral blood sample were taken from all patients. Then complementary DNA synthesis (cDNA), relative gene expression was obtained using Real Time PCR method and the data were analyzed by statistical methods.

Results: The present study indicated that the relative expression of *Smurf2* gene was significantly decreased in MS patients compared with control group (P value= 0.03).

Conclusion: Since *smurf2* is a protein involved in the signaling pathway of TGF- β, here the reduction of the expression of *smurf2* on this pathway may be such that it affected the pathway initiator primary ligand causing abnormalities in the cell and ultimately may affect neuronal differentiation.

Keywords: *Smurf2,* RRMS, Gene Expression

[*]**Corresponding author**: Reiisi S**,** Department of Genetic, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
Email: s.reiisi@sci.sku.ac.ir

Please cite this article as follows:
Behdarvand Dehkordi F, Reiisi S, Mohamadi Nejad P. Down-Regulation *Smurf2 (*Smad ubiquitin Regulatory Factor 2) Gene in Patients With RRMS and Association With High Disability. Armaghane-danesh 2018; 23(5): 631-642