



بررسی متیلاسیون جزایر CpG ناحیه پروموتور ژن FOXP3 در نمونه بیوپسی بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده (IBD)

داود جعفری^۱، کیمیا یوسفیه^۲، گلشید صنعتی^۳، ناصر ابراهیمی دریانی^۴، نیما رضایی^{۳*}

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۲. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۳. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. گروه داخلی، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی اصیل

مقدمه: اخیراً نقش تغییرات اپیژنتیکی FOXP3 به عنوان یک فاکتور رونویسی تنظیمی مهم در عملکرد سلول‌های T تنظیمی (Treg) از جمله حفظ تحمل و تنظیم پاسخ‌های ایمنی در بیماری التهابی روده (IBD) پررنگ شده است. این مطالعه به منظور بررسی وضعیت متیلاسیون جزایر CpG در ناحیه پروموتور ژن FOXP3 در پاتوژنز و پیش‌آگهی در بیماران مبتلا به IBD انجام شد.

روش: نمونه بیوپسی بافت کولورکتال از ۴۲ بیمار مبتلا به IBD فعال (۲۲ بیمار مبتلا به کولیت اولسراتیو و ۲۰ بیمار مبتلا به کرون) و ۲۰ فرد سالم (گروه کنترل) گرفته شد. DNA ژنومیک با کیت تبدیل بی‌سولفیت Methyl Edge TM مطابق پروتکل سازنده انجام شد. متیلاسیون ژن FOXP3 با استفاده از PCR اختصاصی متیلاسیون مالتی پلکس کمی در زمان واقعی (QM-MSP) بررسی شد. **یافته‌ها:** داده‌های سنجش متیلاسیون کمی نشان داد که متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 در گروه بیماران IBD شامل بیماران مبتلا به CD (میانگین DNA غیر متیله 0.218 ± 0.476) و بیماران مبتلا به UC (میانگین DNA غیر متیله 0.487 ± 0.715) نسبت به گروه کنترل (1.152 ± 1.304) به طور قابل توجهی بالاتر بود ($P < 0.0001$). همچنین هیچ تغییر معنی‌داری از نظر وضعیت متیلاسیون جایگاه‌های CpG در پروموتور ژن FOXP3 بین دو گروه بیماران مبتلا به CD و بیماران مبتلا به UC مشاهده نشد ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: متیلاسیون غیرطبیعی در ژن FOXP3 به عنوان یک عامل تنظیم‌کننده مهم در ایمنی، می‌تواند منجر به کاهش عملکرد سلول‌های Tregs و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های التهابی روده شود.

کلیدواژه‌ها: FOXP3، متیلاسیون DNA، جزایر CpG، بیماری التهابی روده، اپیژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۸

*نویسنده مسئول: نیما رضایی،
گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی،
دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۰۲۱-۶۱۴۷۹۰۰۰

پست الکترونیک:
Rezaei_nima@tums.ac.ir



مقدمه

بیماری های التهابی روده (IBDs)، از جمله بیماری کرون^۱ (CD) و کولیت اولسراتیو^۲ (UC)، گروهی از اختلالات التهابی ایدیوپاتیک، مزمن و عودکننده دستگاه گوارش هستند (۱). با وجود تفاوت در درگیری در مجرای گوارشی، این دو بیماری از بیماری های ناتوان کننده دستگاه گوارش با ویژگی های مشابه بالینی، پاتولوژی و اپیدمیولوژیک می باشند. بیماری های التهابی روده همانند سایر بیماری های خودایمنی، مولتی-فاکتوریال می باشد و در حال حاضر از علل شایع درگیری های دستگاه گوارش در کشورهای توسعه یافته هستند (۲، ۳). اگرچه پاتوژن بیماری های التهابی روده هنوز به خوبی شناخته نشده است، تعداد قابل توجهی از مطالعات در مورد ازدست دادن تحمل نسبت به میکروبیوتای طبیعی لوله گوارش گزارش شده است که منجر به پاسخ های بیش از حد ایمنولوژیک و آسیب بافتی می شود. هر دو بخش سیستم ایمنی ذاتی و سازگاری در شروع این التهاب مزمن کنترل نشده در IBD نقش دارند (۴).

عوامل محیطی و ژنتیکی مختلفی در بروز بیماری های التهابی روده تاثیر دارند. مطالعاتی که بر روی دوقلوهای همسان انجام شده است نشان می دهد که تنها کمتر از ۵۰ درصد دوقلوها به صورت همزمان به بیماری مبتلا می شوند، و این موضوع نشان دهنده تاثیر عوامل محیطی بر بیان ژن ها می باشد. فعالیت یک ژن تا حدود زیادی وابسته به این است که تا چه میزان در دسترس فاکتورهای نسخه برداری باشد و این موضوع تا حدود زیادی به ساختار دینامیکی کروماتین مرتبط می شود (۵). اپی ژنتیک در تنظیم این ساختار کروماتینی و دسترسی فاکتورهای نسخه برداری نقش دارد. فاکتورهای محیطی می توانند با تاثیر بر الگوهای اپی ژنتیکی، بر بیان ژن ها و بروز بیماری ها تاثیر بگذارند. تنظیم اپی ژنتیکی، به این صورت می باشد که

باعث تغییر در بیان ژن ها می شود، بدون آن که در توالی نوکلئوتیدی تغییری ایجاد شود (۶، ۷).
متیلاسیون DNA یکی از مهم ترین مکانیسم های اپی ژنتیکی می باشد که به طور عمده در خودایمنی نقش دارند. متیلاسیون بر روی دی نوکلئوتیدهای CpG صورت می گیرد که توالی غنی از این نوکلئوتیدها به عنوان جزایر CpG شناخته می شوند که به صورت عمده در ناحیه پروموتور ژن ها، مناطق بالادست جایگاه شروع نسخه برداری (TSS) می باشند، به دلیل این که فاکتورهای نسخه برداری به توالی غنی از CpG برای اتصال به DNA نیاز دارند. عمده جزایر CpG که در نزدیکی TSS حضور دارند هایپومتیل هستند، متیلاسیون جزایر CpG در ناحیه پروموتور یک ژن منجر به سرکوب بیان ژن می شود (۷).
پروتئین جعبه سرچنگالی P3^۳ (FOXP3) یک فاکتور رونویسی مهم است که به خانواده تنظیم کننده های رونویسی forkhead/winged-helix تعلق دارد که یک تنظیم گر مهم در عملکرد سلول های ایمنی از جمله حفظ تحمل ایمنی و تنظیم پاسخ های ایمنی از طریق سلول های T تنظیمی (Treg) است (۸-۱۰). مطالعات مولکولی نشان داده اند که میزان بیان ژن و پروتئین FOXP3 در نمونه های بیوپسی موکوسی بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده کاهش می یابد (۱۱). پروموتور و عناصر تنظیم کننده بیان Foxp3 را در سلول های Treg تنظیم می کنند. تغییرات اپی ژنتیکی ژن FOXP3 در نواحی تنظیمی آن از جمله وضعیت متیلاسیون جزایر CpG در ناحیه پروموتور، دسترسی کروماتین را برای فاکتورهای رونویسی و سایر تنظیم کننده های رونویسی به منظور تنظیم بیان ژن FOXP3 کنترل می کنند. این تنظیم بیان ژن FOXP3 در نتیجه تغییرات اپی ژنتیکی می تواند نقش بالقوه ای در القا یا شکست تولرانس ایمنولوژیک در بافت مخاطی روده و پاتوژن بیماری بیماری التهابی روده ایفا کند (۱۲). این مطالعه به منظور بررسی وضعیت متیلاسیون جزایر CpG

³ Forkhead box P3

¹ Crohn's disease

² Ulcerative colitis



در ناحیه پروموتور ژن FOXP3 در شناخت بهتری از نقش تنظیمات اپیژنتیکی در پاتوژنز بیماری التهابی روده و در پیش‌آگهی بیماران مبتلا به فرم فعال این بیماری انجام شد.

روش

جامعه مورد تحقیق و جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه گذشته‌نگر ۴۲ نمونه بیوپسی بافت کولورکتال از بیماران IBD فعال (۲۲ مورد کولیت اولسراتیو و ۲۰ مورد بیماری کرون) که بر اساس یافته‌های استاندارد بالینی، آزمایشگاهی، آندوسکوپی و پاتولوژیک (بررسی هیستوپاتولوژیک) بین اردیبهشت ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۸ در کلینیک‌های گوارش بیمارستان‌های کسری و لاله تهران تشخیص داده شدند، بررسی شدند. تعداد ۲۰ فرد سالم با شکایت درد شکمی مزمن که جهت پایش وضعیت کلی سلامت دستگاه گوارش مراجعه کرده بودند و سابقه و شواهد هیچ‌گونه خودایمنی و التهابی را نداشتند، به عنوان گروه کنترل سالم انتخاب و نمونه‌گیری شدند. در خصوص حجم نمونه، ماکزیمم حجم نمونه با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد و توان ۸۰ درصد ۲۰ بیمار برای هر گروه برآورد شد. خروجی نرم افزار stata14 جهت برآورد حجم نمونه مورد نظر همراه با فرمول مورد استفاده و اجزاء مختلف آن به صورت زیر است:

$$n = \frac{\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta} \right)^2 (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

α : احتمال خطای نوع اول؛ اگر $\alpha = 0.05$ باشد $Z_{1-\alpha/2}$ برابر ۱/۹۶ است

β : احتمال خطای نوع دوم؛ اگر $\beta = 0.2$ باشد $Z_{1-\beta}$ برابر ۰/۸۴ است

۱ σ : انحراف معیار گروه مورد

۲ σ : انحراف معیار گروه شاهد

۱۱ میانگین گروه مورد

۱۱۲: میانگین گروه شاهد

به عنوان معیارهای خروج این مطالعه، بیمارانی که تحت درمان بیولوژیکی بودند و همچنین بیماران مبتلا به سایر بیماری‌های ناشی از سیستم ایمنی را از مطالعه خارج شدند. مطالعات نشان داده‌اند که الگوی متیلاسیون DNA در نزدیکی نواحی پروموتور برای ژن‌ها بسته به شرایط التهابی محل ضایعه به‌طور قابل‌توجهی متفاوت است (۱۵)؛ بنابراین، برای بررسی تفاوت وضعیت متیلاسیون بین مخاط ملتهب و غیر ملتهب، تنها نمونه‌های بیوپسی گرفته شده از مخاط کولون نواحی درگیر ضایعات التهابی در این مطالعه گنجانده شد و جهت ادامه سنجش، بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

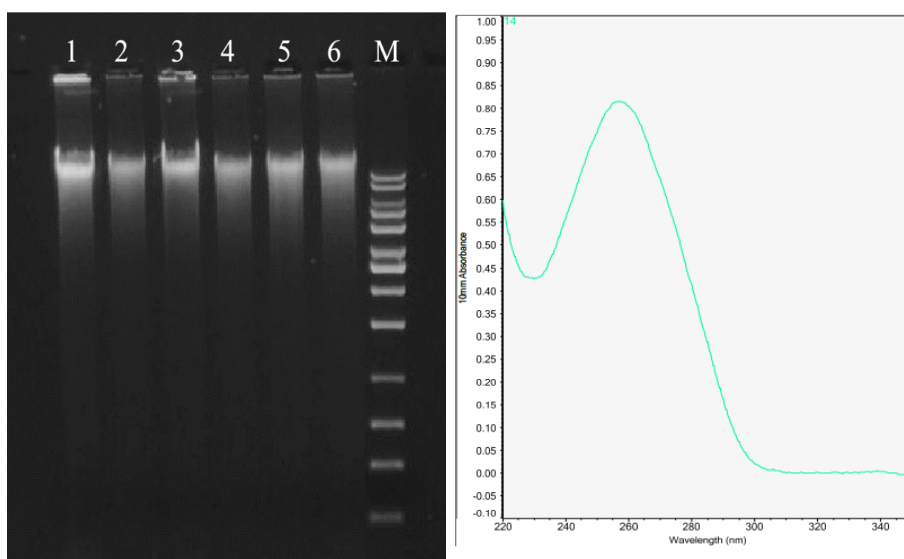
استخراج DNA و سیستم تبدیل بی‌سولفیت

DNA ژنومیک به‌طور مستقیم از نمونه‌های بافت تازه منجمد با استفاده از روش فنل کلروفرم استخراج شد. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با سنجش اسپکتروفوتومتری (Scientific Thermo, USA) NanoDrop ND-1000 و الکتروفورز ژل بررسی شد (شکل ۱) و تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از نظر شیمیایی در همه نمونه‌ها، تبدیل تمام سیتوزین متیله نشده به اوراسیل در ساختار DNA ژنومیک توسط کیت تجاری MethylEdge™ Bisulfite Conversion System (شرکت Promega) مطابق پروتکل سازنده، انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مختص متیلاسیون کمی در زمان واقعی (QM-MSP)

روش PCR اختصاصی متیلاسیون مالتی پلکس کمی^۱ (QM-MSP) برای ارزیابی متیلاسیون پروموتور FOXP3 در DNA ژنومی تیمار شده با بی‌سولفیت استفاده شد. روش MethySYBR به‌طور کلی شامل دو مرحله از واکنش‌های

^۱ Multiplex methylation-specific PCR



شکل ۱. گراف خروجی از دستگاه نانودراپ (سمت راست) و عکس الکتروفورز DNA در ژل آگارز ۱٪ با لدر نشانگر ۱۰,۰۰۰ bp (سمت چپ) جهت بررسی پارامترهای کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده

DNA پلاسمید کاملاً متیله شده با بی سولفیت به عنوان کنترل مثبت برای واکنش QM-MSP در نظر گرفته شد. هر واکنش حاوی مقدار کل ۱۰ میکرولیتر مخلوط شامل ۵ میکرولیتر SYBR® Green Master Mix، ۰.۲۵ میکرولیتر Forward Primer، ۰.۲۵ میکرولیتر Reverse Primer، ۳.۵ میکرولیتر DDW و ۱ میکرولیتر DNA تیمار شده با بی سولفیت بود. این واکنش ها با یک چرخه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و سپس ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه StepOne™ Real-Time PCR انجام شد. DNA غیر متیله با فرمول های زیر محاسبه شد (۱۳، ۱۴):

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ sample} - \Delta Cq \text{ plasmid},$$

$$\Delta Cq \text{ sample} = Cq \text{ MSP} - Cq \text{ BSP},$$

$$\Delta Cq \text{ plasmid} = Cq \text{ MSP} - Cq \text{ BSP},$$

PCR است: ۱) مرحله مالتی پلکس: در این مرحله پیش تقویت، جفتی پرایمرهای خارجی (پرایمر بیرونی خارجی و پرایمر معکوس خارجی) به منظور تکثیر قطعات حاوی آلل های هدف طراحی شد (جدول ۱). بر این اساس، هر واکنش حاوی مقدار کل ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA تبدیل شده و سایر مواد واکنش بود. این توالی از واکنش ها شامل یک چرخه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه بود. چرخه نهایی این مرحله C° ۷۲ به مدت ۵ دقیقه بود. ۲) در مرحله دوم از محصولات مرحله قبل برای تعیین کمیت اهداف متیله خاص استفاده شد. در این مرحله از جفت پرایمرهای تودرتو (nested methylation-specific primers) اختصاصی متیلاسیون استفاده شد که توالی پرایمرهای فوروارد و معکوس جدول ۱ آورده شده است. پایگاه داده UCSC برای تعیین وضعیت متیلاسیون جزایر CpG در پروموتور FOXP3 استفاده شد و از ابزار MethBlast برای بررسی پرایمر (primer blasting) نیز استفاده شد. علاوه بر این،



آزمایشگاهی از آماره مجذور کای استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل آماری، از ورژن SPSS 26 استفاده شد.

یافته‌ها

از آن جایی که متیلاسیون برخی از ژن‌ها احتمالاً توسط جنس و سن تعدیل می‌شود، کنترل‌های سالم همسان با متغیر جنسیت و تا حد ممکن متغیر سن گنجانده شدند. داده‌های دموگرافیک و بالینی بیماران مبتلا به IBD و افراد کنترل در جدول ۲ ارائه شده است. از نظر متغیر سن، میانگین سنی ۲۲ بیمار مبتلا به UC 10.80 ± 46.5 سال (محدوده: ۶۳-۲۶ سال)، ۲۰ بیمار CD با میانگین سنی 11.98 ± 47.7 سال (محدوده: ۷۱-۲۹ سال)، و ۲۰ داوطلب کنترل سالم با میانگین سنی 44.9 ± 13.14 سال (محدوده: ۷۶-۲۲ سال) بودند.

استفاده از رنگ سبز SYBR در طی PCR کمی، آنالیز منحنی ذوب آمپلیکون‌های هدف را برای تعیین وضعیت متیلاسیون جایگاه های CpG روی ژن FOXP3 امکان پذیر می‌کند. منحنی ذوب حاصل برای ژن FOXP3 در شکل ۲ نشان داده شده است. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 در نمونه‌های مخاط کولون گروه بیماران و کنترل با هم مقایسه شد و داده‌های سنجش متیلاسیون کمی نشان داد که متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 در گروه بیماران IBD شامل بیماران مبتلا به CD (میانگین DNA غیر متیله 0.218 ± 0.476)، بیماران مبتلا به UC (میانگین DNA غیر متیله 0.487 ± 0.715) نسبت به کنترل (میانگین DNA غیر متیله 1.152 ± 1.304) به طور قابل توجهی بالاتر بود ($P < 0.0001$) (نمودار ۱). همچنین هیچ تغییر معنی داری از نظر وضعیت متیلاسیون جایگاه‌های CpG در پروموتور ژن FOXP3 بین دو گروه بیماران مبتلا به CD و بیماران مبتلا به UC مشاهده نشد ($P > 0.05$).

که در آن: MSP (PCR اختصاصی متیلاسیون)، BSP (PCR اختصاصی بی‌سولفیت) می‌باشند. شاخص دمتیلاسیون (DI) نیز به صورت $DI = 2^{Cq_{BSP} - Cq_{MSP}}$ محاسبه شد تا کارایی آن مشخص شود (۱۵، ۱۶).

جدول ۱. توالی پرایمر های استفاده شده برای تعیین وضعیت متیلاسیون جزایر CpG در پروموتور FOXP3

نوع پرایمر	توالی پرایمر
External forward primer	GTAGGGAGGTGACGAGGTAG G
External reverse primer	ACAAAATAACCCCGAACAAC C
Nested methylation-specific forward	GGAGATTTTAGGTTTTCGGAA TATTTTC
Nested methylation-specific reverse	CCCGAAACTACCTAAACGCCG

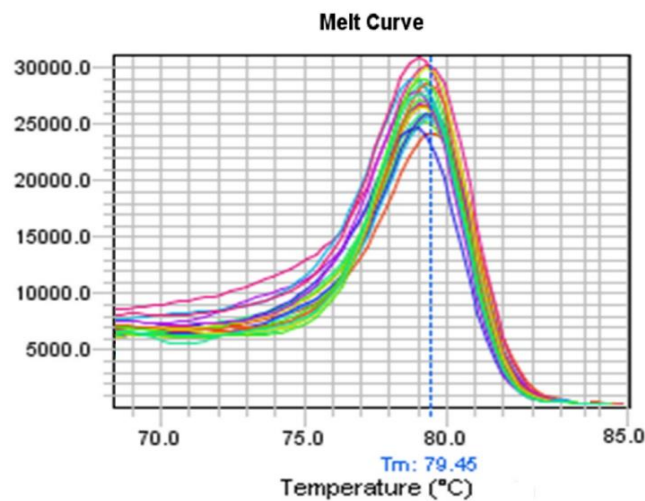
تجزیه و تحلیل آماری

داده های متیلاسیون DNA به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد. پیش از انجام آزمون های آماری مقایسه میانگین، داده‌های کمی متیلاسیون DNA به دست آمده با تست سنجش نرمال بودن داده‌ها توسط تست Shapiro-Wilk بررسی شد که نشان داد داده‌ها از نظر توزیع نرمال بودن به صورت "غیر نرمال" می‌باشند. برای بررسی تفاوت آماری احتمالی در سطوح متیلاسیون جزیره CpG بین مخاط کولون بیماران مبتلا به IBD و افراد سالم از آزمون ناپارامتریک Mann-Whitney U-test استفاده شد. برای بررسی رابطه بین دو متغیر کیفی داده‌های بالینی و

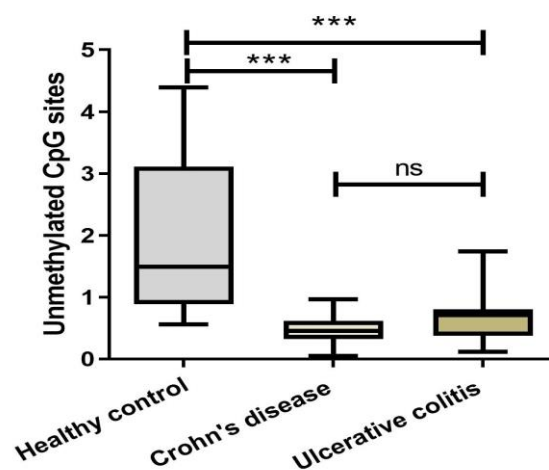


جدول ۲. داده‌های دموگرافیک و بالینی بیماران مبتلا به IBD و افراد کنترل

متغیر	بیماران مبتلا به UC (n=۲۲)	بیماران مبتلا به CD (n=۲۰)	بیماران مبتلا به UC (n=۲۰)
سن (تعداد / %)	۴۵	۴۵	۴۵
جنس (تعداد / %)	مرد	مرد	مرد
	زن	زن	زن



شکل ۲. پیک های ذوب فلورسنت بر اساس تکثیر DNA تیمار شده با بی سولفیت غیرمتیله از بیوپسی های کولورکتال برای بیماران IBD برای جزایر CPG پروموتور ژن FOXP3 نشان داده شده است.



نمودار ۱. مقایسه الگوهای متیلاسیون (میانگین DNA غیر متیله) جزایر CpG (CGIs) در ناحیه پروموتور ژن FOXP3 در نمونه های بافت کولورکتال بیماران مبتلا به بیماری کرون (n=۲۰)، کولیت اولسراتیو (n=۲۲) و افراد سالم (n=۲۰). مقدار p از طریق آزمون U Mann-Whitney به دست آمد mean $\pm$ SD (*P < 0.05).



بحث

در این مطالعه وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 در نمونه های مخاط کولون گروه بیماران و کنترل با هم مقایسه شد و داده های سنجش متیلاسیون کمی نشان داد که متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 در گروه بیماران IBD شامل بیماران مبتلا به CD، بیماران مبتلا به UC نسبت به کنترل به طور قابل توجهی بالاتر بود. همچنین هیچ تغییر معنی داری از نظر وضعیت متیلاسیون جایگاه های CpG در پروموتور ژن FOXP3 بین دو گروه بیماران مبتلا به CD و بیماران مبتلا به UC مشاهده نشد.

متیلاسیون DNA نقش حیاتی در تنظیم بیان ژن بازی می کند (۱۷، ۱۸). درواقع DNA متیله منجر به جذب پروتئین هایی می شود که دارای مناطق متصل شونده به DNA متیله (MBD) هستند، پروتئین های حاوی MBD بین DNA متیله و تغییرات کووالان و غیر کووالان هیستون ارتباط برقرار می کنند و منجر به تغییر شکل کروماتین می شوند و از این طریق بیان ژن را سرکوب می کنند (۱۹، ۲۰). بنابراین، متیلاسیون DNA در ناحیه پروموتور ژن FOXP3 می تواند اثرات معکوسی بر بیان این ژن داشته باشد. در بسیاری از مطالعات، نشان داده شده که متیلاسیون بیش از حد جزایر CpG در ناحیه پروموتور ژن FOXP3، بیان آن را کاهش می دهد و در نتیجه عملکرد سلول های Tregs مختل می شود (۱۱). مطالعه تجربی توسط پولانسکی و همکاران در مدل موش نشان داد که متیلاسیون DNA در سلول های تنظیم کننده T ناحیه دی متیله، نه تنها رونویسی ژن FOXP3 را تنظیم می کند، بلکه نقش مهمی در حفظ بیان FOXP3 پایدار دارد (۲۱). کیم و همکاران نیز اشاره کردند که متیلاسیون DNA احتمالاً یک مکانیسم کنترلی حیاتی در بیان FOXP3 است. بیان FOXP3 یک همبستگی معکوس با وضعیت متیلاسیون جزیره CpG درونی نشان می دهد. علاوه بر این، آن ها نشان دادند که متیلاسیون DNA می تواند بر تغییرات طولانی مدت در بیان FOXP3 در طول توسعه سلول Treg تأثیر

بگذارد. همچنین دی متیلاسیون کل ناحیه پروموتور FOXP3 حفظ شده به بیان طولانی مدت FOXP3 و فنوتیپ Treg متعهد در انسان کمک می کند (۹، ۲۲). این امر می تواند منجر به افزایش پاسخ ایمنی غیرقابل کنترل در روده و تشدید التهاب در بیماران مبتلا به IBD شود.

در مطالعه همسوی قبلی، بررسی وضعیت متیلاسیون ژن FOXP3 در لوپوس اریتماتوز سیستمیک کودکان نشان داد که متیلاسیون ژن FOXP3 در کودکان مبتلا به SLE به طور قابل توجهی بالاتر از افراد سالم بود که احتمالاً می تواند بر سطح بیان ژن تأثیر بگذارد. بنابراین، یکی از علل افزایش پاسخ ایمنی در SLE می تواند بیان کمتر FOXP3 توسط هیپرمتیلاسیون این ژن باشد (۱۶). مطالعات قبلی کاهش سلول های Treg+ FOXP3+ CD4+ را در خون محیطی و تجمع سلول های Treg در مخاط ملتهب نشان می دهند. بنابراین، با در نظر گرفتن نتایج مطالعه حاضر و داده های مطالعات ذکر شده به نظر می رسد که عملکرد سرکوب کننده سلول های Treg ممکن است تا حدی مهار شود و به دلیل کاهش آستانه تحمل به آنتی ژن های خودی و شکست تولرانس ایمونولوژیک این روند می تواند عامل مهمی در بروز، شدت و عود بیماری های التهابی مزمن باشد (۲۳).

در بیماران مبتلا به IBD، تغییرات در متیلاسیون یا جهش های ژنی در FOXP3 می تواند منجر به کاهش کارایی سلول های Tregs شود. این کاهش کارایی، پاسخ های ایمنی نادرست و بیش از حد را در روده تحریک می کند و به التهاب مزمن منجر می شود. بنابراین، اختلال در تنظیم ایمنی که ناشی از تغییرات در FOXP3 است، می تواند به عنوان یکی از عوامل اصلی در ایجاد و پیشرفت IBD به شمار رود. از آنجایی که در مطالعات اخیر در خصوص آنالیز وضعیت متیلاسیون ژن FOXP3 در بیماران مبتلا به بیماری های خودایمن مشخص شد متیلاسیون ژنی تحت تأثیر فاکتورهایی نظیر جنسیت است (۲۴)، در مطالعه حاضر کنترل های سالم همسان از نظر جنس مورد مطالعه



قرارگرفتند. در این مطالعه نشان داده شد که در بیماران مبتلا به IBD، متیلاسیون ژن FOXP3 در مقایسه با افراد سالم، افزایش یافته و این تغییرات می توانند به عنوان یک نشانگر بیولوژیکی برای پیش بینی یا ارزیابی شدت بیماری در نظر گرفته شوند. به نظر می رسد در IBD هایی مانند کولیت اولسراتیو (UC) و بیماری کرون (CD)، تغییرات متیلاسیون در ژن FOXP3 می تواند به تشدید التهاب و افزایش خطر آسیب روده ای منجر شود. محدودیت اصلی مطالعه ما این بود که ما در این مطالعه برای بیماران مبتلا به IBD فقط متیلاسیون DNA FOXP3 را تجزیه و تحلیل کردیم. یکی از محدودیت های اصلی در ارتباط با انجام این مطالعه به دست آوردن نمونه های بیوپسی از بیماران مبتلا به این بیماری بود که برای رفع این محدودیت با مسئول بخش داخلی بیمارستان های دولتی و خصوصی جهت اخذ نمونه هماهنگی صورت گرفت. یکی از محدودیت های دیگر در تفسیر نتایج و اثرات جامع اپی ژنتیکی ژن FOXP3، عدم سنجش همزمان سایر مکانیسم های اپی ژنتیکی دخیل در ژن FOXP3 به دلیل محدودیت های مالی بود. بنابراین، به عنوان پیشنهاد، انجام مطالعات در سطح بیان ژن و سایر ژن های دخیل در مکانیسم های اپی ژنتیکی که ممکن است در بیان پایین تر FOXP3 در IBD نقش داشته باشند می تواند دید بهتری از اثرات جامع بیولوژیک ژن FOXP3 را فراهم آورد. با این حال داده های ارائه شده بینش مهمی در مورد تأثیر ناهنجاری های اپی ژنتیکی در ژن FOXP3 ارائه می دهد که ممکن است عامل خطری برای شروع فرآیند التهابی و توسعه مخاط ملتهب در بیماران مبتلا به IBD باشد.

نتیجه گیری

ژن FOXP3 به عنوان یک عامل تنظیم کننده مهم در سیستم ایمنی، نقش حیاتی در جلوگیری از التهاب مزمن و خودایمنی در بافت روده ایفا می کند. نتایج این مطالعه نشان داد که متیلاسیون پرموتر ژن FOXP3 در گروه بیماران IBD شامل بیماران مبتلا به CD و بیماران مبتلا به UC نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی بالاتر بود که این افزایش میزان متیلاسیون در این ناحیه می تواند منجر به کاهش بیان ژن FOXP3 شود. بنابراین، متیلاسیون غیرطبیعی در این ژن می تواند باعث کاهش عملکرد سلول های مهم تنظیم گر سیستم ایمنی به نام Tregs و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به بیماری های التهابی روده شود. پژوهش های بیشتر در این زمینه می تواند به توسعه روش های درمانی هدفمند برای تنظیم مجدد FOXP3 و بهبود روند درمان IBD کمک کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته شده از طرح پژوهشی می باشد که با تصویب و حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است (شماره گزنت: ۳۴۵۸۴). لذا نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت مذکور اعلام می دارند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

ملاحظات اخلاقی و کد اخلاق

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران تایید شد (IR.TUMS.VCR.REC.1396.4455) و فرم رضایت آگاهانه از هر شرکت کننده اخذ شد.

References:

- Gilliland A, Chan JJ, De Wolfe TJ, Yang H, Vallance BA. Pathobionts in inflammatory bowel disease: origins, underlying mechanisms, and implications for clinical care. *Gastroenterology*. 2024;166(1):44-58.
- Li L, Cheng R, Wu Y, Lin H, Gan H, Zhang H. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Journal of Evidence-Based Medicine*. 2024;17(2):409-33.
- Borowitz SM. The epidemiology of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis? *Frontiers in Pediatrics*. 2023;10:1103713.



4. Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Sánchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: innate immune system. *International journal of molecular sciences*. 2023;24(2):1526.
5. Knudsen LA, Zachariassen LS, Strube ML, Havelund JF, Pilecki B, Nexoe AB, et al. Assessment of the Inflammatory Effects of Gut Microbiota from Human Twins Discordant for Ulcerative Colitis on Germ-free Mice. *Comparative Medicine*. 2024;74(2):55-69.
6. Xu J, Xu H-m, Yang M-f, Liang Y-j, Peng Q-z, Zhang Y, et al. New insights into the epigenetic regulation of inflammatory bowel disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:68.
7. Sanati G, Jafari D, Noruzinia M, Daryani NE, Ahmadvand M, Teimourian S, Rezaei N. Association of aberrant promoter methylation changes in the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) gene with susceptibility to crohn's disease. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2022;14(2):165.
8. Devaud C, Darcy PK, Kershaw MH. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2014;63:869-76.
9. Kosinsky RL, Gonzalez MM, Saul D, Barros LL, Sagstetter MR, Fedyshyn Y, et al. The FOXP3+ Pro-Inflammatory T Cell: A Potential Therapeutic Target in Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2024;166(4):631-44. e17.
10. Narula M, Lakshmanan U, Borna S, Schulze JJ, Holmes TH, Harre N, et al. Epigenetic and immunological indicators of IPEX disease in subjects with FOXP3 gene mutation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2023;151(1):233-46. e10.
11. Bellanti JA, Li D. Treg cells and epigenetic regulation. *T Regulatory Cells in Human Health and Diseases*. 2021:95-114.
12. Colamatteo A, Carbone F, Bruzzaniti S, Galgani M, Fusco C, Maniscalco GT, et al. Molecular mechanisms controlling Foxp3 expression in health and autoimmunity: from epigenetic to post-translational regulation. *Frontiers in immunology*. 2020;10:3136.
13. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
14. Hussein MI, Kuroda A, Kaye AN, Nair I, Kandeel F, Ferreri K. Development of a quantitative methylation-specific polymerase chain reaction method for monitoring beta cell death in type 1 diabetes. *PloS one*. 2012;7(10):e47942.
15. Akirav EM, Lebastchi J, Galvan EM, Henegariu O, Akirav M, Ablamunits V, et al. Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(47):19018-23.
16. Hanaei S, Sanati G, Zoghi S, Gharibzadeh S, Ziaee V, Rezaei N. The status of FOXP3 gene methylation in pediatric systemic lupus erythematosus. *Allergologia et Immunopathologia*. 2020;48(4):332-8.
17. Li Z, Arijs I, De Hertogh G, Vermeire S, Noman M, Bullens D, et al. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(8):1299-310.
18. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(2):83-9.
19. Törüner M, Ünal NG. Epigenetics of inflammatory bowel diseases. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2023;34(5):437.
20. Liu H, Lu N, Cui M, Zhang M. Role of epigenetic modifications mediated by vitamins and trace elements in inflammatory bowel disease. *Taylor & Francis*; 2023. p. 839-43.
21. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European journal of immunology*. 2008;38(6):1654-63.
22. Bastida G, Mínguez A, Nos P, Moret-Tatay I. Immunoepigenetic regulation of inflammatory bowel disease: current insights into novel epigenetic modulations of the systemic immune response. *Genes*. 2023;14(3):554.
23. Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(8):1772-88.
24. Farhadi J, Nouri M, Khabbazi A, Samadi N, Babaloo Z, Azad M, et al. Analysis of methylation and expression profile of Foxp3 gene in patients with Behçet's syndrome. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2020:1-8.



Investigation of CpG Island Methylation in the Promoter Region of the FOXP3 Gene in Biopsy Samples from Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Davood Jafari¹, Kimia Yousefiyeh², Golshid Sanati³, Nasser Ebrahimi Daryani⁴, Nima Rezaei^{*3}

1. Department of Immunology, School of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran
2. School of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran
3. Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Internal Medicine, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Type of Article Original Research

Received: 2024/12/05

Accepted: 2025/03/08

***Corresponding Author:**
Nima Rezaei, Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

TEL: 021-61479000

Email:
(Rezaei_nima@tums.ac.ir)

Abstract

Introduction: Recently, the role of epigenetic alterations in the FOXP3 gene as an essential regulatory transcription factor in the function of regulatory T cells (Tregs), including immune tolerance maintenance and response regulation in Inflammatory Bowel Disease (IBD), has gained significant attention. This study aimed to investigate the CpG island methylation status in the promoter region of the FOXP3 gene in the pathogenesis and prognosis of patients with IBD.

Methods: Colorectal biopsy samples were obtained from 42 patients with active IBD (22 with ulcerative colitis (UC) and 20 with Crohn's disease (CD)) and 20 healthy controls. Genomic DNA was bisulfite-treated using the MethylEdge™ Methylation Kit according to the manufacturer's protocol. FOXP3 gene methylation status was assessed using quantitative real-time methylation-specific PCR (QM-MSP).

Results: Quantitative methylation assessment data revealed that the FOXP3 promoter methylation in the IBD patient groups, including CD patients (mean unmethylated DNA 0.476 ± 0.218) and UC patients (mean unmethylated DNA 0.715 ± 0.487), was significantly higher compared to the control group (mean 1.304 ± 1.152) ($P < 0.0001$). No significant difference was found in the methylation status of CpG sites in the FOXP3 promoter between CD and UC patients ($P > 0.05$).

Conclusion: Abnormal methylation in the FOXP3 gene, a critical immune regulator, can lead to impaired Treg function and consequently increase the risk of inflammatory bowel diseases.

Keywords: FOXP3, DNA Methylation, CpG Islands, Inflammatory Bowel Diseases, Epigenetics

► **Please cite this article as:** Jafari D, Yousefiyeh K, Sanati G, Ebrahimi Daryani N, Rezaei N. Investigation of CpG Island Methylation in the Promoter Region of the FOXP3 Gene in Biopsy Samples from Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). J Neyshabur Univ Med Sci 2024;11(4):48-57.