فراوانی پلی‌مورفیسم در جایگاه‌های INT4 ، D543 و 3'UTR ژن NRAMP_۱ افراد مسلول و سالم زاهدان

دکتر تقی ناصرپور فریور * دکتر محمد نادری ** پوران جوهری***

* استاد میکروبیولوژی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** دانشیار بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
*** کارشناس پرستاری مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس نویسنده مسؤول: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تلفن ۳۳۲۴۹۷۱-۰۲۸۱
Email: t.naserpour@qums.ac.ir
تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۸

چکیده

زمینه: ژن NRAMP-1 پروتئینی را کد می‌کند که باعث مرگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌شود. وقتی موتاسیون در این ژن رخ دهد استعداد ابتلای فرد به سل می‌تواند تحت تأثیر موتاسیون‌های این ژن قرار گیرد.

هدف: مطالعه به منظورمقایسه فراوانی پلی‌مورفیسم ژن NRAMP-1 در افراد مسلول و سالم شهر زاهدان انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه همه‌گیرشناسی مولکولی در سال ۱۳۹۱ بر روی تمام بیماران مسلول تأیید شده (۸۲ نفر) و۱۵۰ نفر از افراد سالم انجام شد که به دلیلی غیر از بیماری سل به بیمارستان بوعلی زاهدان مراجعه کردند. پس از انجام PCR، محصولات حاصله با آنزیم‌های با اثر محدود AvaII , FokI , ApaI تیمار شدند و از پلی‌مورفیسم طولی قطعه‌های حاصله (RFLP) برای تعیین پلی‌مورفیسم ژن NRAMP-1 استفاده شد. برای تجزیه تحلیل آماری از آزمون‌های فیشر و آمار توصیفی استفاده شد.

یافته‌ها: الگوی هتروزیگوت در INT4، D543 و 3'UTR افراد سالم شایع‌تر از بیماران و الگوی هموزیگوت این نواحی در بیماران شایع‌تر از افراد سالم بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد افراد با موتاسیون نوع هموزیگوت نسبت به افراد هتروزیگوت، شانس بیش‌تری برای ابتلا به سل دارند.

کلیدواژه‌ها: سل، پلی‌مورفیسم ،NRAMP-1

مقدمه:

سل ریوی یکی از بیماری‌های شایع عفونی است که سالیانه باعث مرگ بیش از سه میلیون نفر در جهان می‌شود. عامل ایجادکننده این بیماری، باسیلی اسید فست به نام مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. علی‌رغم اجرای برنامه‌های کنترلی گسترده در دو دهه گذشته این بیماری، همچنان یکی از بیماری‌های عفونی پُرخطر محسوب می‌شود. از طرفی با ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به دارو، نگرانی‌های جدیدی را در سطح جهانی ایجاد کرده است.[۱] بررسی‌ها نشان داده‌اند که حساسیت به این بیماری و حتی دوره و سیر آن در میان افراد مختلف، متفاوت است و هر فردی که در معرض این باکتری قرار گیرد، لزوماً به سل مبتلا نمی‌شود. این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل عوامل میزبان به خصوص حساسیت ژنتیکی افراد مختلف به این بیماری باشد.[۲]

ایمنی سلولی یک مکانیسم دفاعی علیه میکروب‌هایی است که درون بیگانه خوارها یا دیگر سلول‌ها، بقا یافته‌اند و مکانیسم اصلی دفاعی بدن در مقابله با بیماری سل هستند.[۳] لنفوسیت‌های T از اجزای اصلی ایمنی سلولی هستند که قسمتی از نقش خود را با ترشح سایتو کاین‌ها اعمال می‌کنند.[۴] سایتو کاین‌ها در فرایند دفاع میزبان در

Archive of SID

www.SID.ir

برابر عفونت‌های مایکوباکتریایی نقش دارند.[۵] از میان ژن‌های کاندید مرتبط با بیماری سل، ارتباط ژن (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) NRAMP1 در مطالعه‌های مختلف گزارش شده است.[۶-۱۱] شناخت ژن‌هایی که موتاسیون در آن‌ها سبب حساسیت یا مقاومت در برابر سل می‌شود، می‌تواند به شناخت اجزای ضروری سیستم ایمنی در برابر مایکوباکتریوم کمک نماید.[۶]

پروتئین NRAMP-1 در اندوزوم تأخیری و لیزوزوم ماکروفاژها قرار دارد و در حال حاضر جزء خانواده slc11a1 طبقه‌بندی می‌شود. پروتئین SLC11A1/ - NRAMP-1 کاتیون‌های دو ظرفیتی را در فاگوزوم ارایه می‌کنند که به کاهش تکثیر DNA و زنجیره تنفسی میکروارگانیسم‌ها منجر می‌شود.[۷و۸]

پلی‌مورفیسم‌هایی در ژن NRAMP-1 گزارش شده‌اند که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تغییر در تک نوکلئوتید G/C در اینترون ۴، جای‌گزینی تک بازی در کدون ۵۴۳ که به تغییرآسپارتیک به آسپارژین منجر می‌شود و حذف سکانس TGTG در ناحیه غیر ترجمه‌ای ۳.[۹و۱۰] این ژن باعث کد کردن پروتئینی می‌شود که بر روی کانال‌های Fe^{++} اثر می‌کند. Fe باعث مهار رشد و در نهایت مرگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌شود. وقتی موتاسیون در این ژن رخ دهد، پروتئین حاصل از آن تخریب می‌شود و مایکوباکتریوم آزادانه در ماکروفاژ تکثیر می‌یابد.[۱۱] لذا با توجه به شایع بودن سل تنفسی در ایران، این مطالعه با هدف مقایسه فراوانی پلی‌مورفیسم ژن NRAMP-1 در افراد مسلول و سالم شهر زاهدان (که شیوع سل در آن بالاست) انجام شد.

❋ مواد و روش‌ها:

این مطالعه همه‌گیرشناسی مولکولی در سال ۱۳۹۱ بر روی دو گروه انجام شد: الف- تمام بیماران مسلول تأیید شده مراجعه‌کننده به بیمارستان بوعلی شهر زاهدان از سال ۱۳۸۶ تا تابستان سال ۱۳۸۷ (۸۲ نفر)، ب- ۱۵۰ نفر از افراد سالم شهر زاهدان که به دلایلی غیر از ابتلا به سل به بیمارستان بوعلی مراجعه کرده بودند و نمونه‌های آن‌ها قبلاً در طرح بررسی آپولیپو پروتئین E در افراد مسلول، جمع‌آوری شده بود. در انتخاب نمونه‌ها اصل هاردی واینبرگ رعایت شد و افراد دو گروه از نظر جنسیت یکسان‌سازی شدند.

ابتدا نمونه‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر محلول لیز بافت و ۵۰ میکرو پروتئیناز k مخلوط و یک ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا بافی کوت حل شود. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول متصل‌کننده (Binding Buffer) و ۴ میکرولیتر محلول پلی **A** و ۵۰ میکرولیترپروتیئناز K اضافه و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد.[۱۲و۱۳] سپس طبق دستورالعمل کیت شرکت رُش، DNA نمونه‌ها استخراج و با جفت پرایمرهای زیر طبق برنامه PCR شد:[۷و۱۰]

, D543: PF: 5'-GCATCTCCCCAATTCATGGT-3' , PR: 5'-AACTGTCCCCACCTATCCTG-3'
, 3'UTR; PF: 5'-GCATCTCCCCAATTCATGGT-3', PR: 5'-AACTGTCCCCACCTATCCTG-3'
INT-4; PF: 5'-CTCTGGCTGAAGGCTCTCC-3' , PR: 5'-CTCTGGCTGAAGGCTCTCC-3'

پلی مورفیسم ناحیه D543 ، قطعه تکثیر یافته‌ای که طولی در حدود ۲۴۴ جفت باز داشت، تحت اثر آنزیم Ava II قرار گرفت (جای‌گزینی تک بازی در کدون ۵۴۳ که به تغییر آسپارتیک به آسپارژین منجر می‌شود). پلی مورفیسم ناحیه 3'UTR ، قطعه تکثیر یافته‌ای که طولی در حدود ۲۴۴ جفت باز داشت، تحت اثر آنزیم Fok I قرار گرفت. پلی مورفیسم INT-4 قطعه تکثیر یافته‌ای که طولی در حدود ۶۲۳ جفت باز داشت تحت اثر آنزیم ApaI قرار گرفت (تغییر در تک نوکلوتید G/C در اینترون ۴ انجام می‌گیرد). برای تأیید حضور باندهای۶۲۳ جفت باز در INT4، ۲۴۴ جفت باز در D543 و ۲۴۴جفت باز در 3'UTR پس از انجام PCR ، الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد انجام شد.

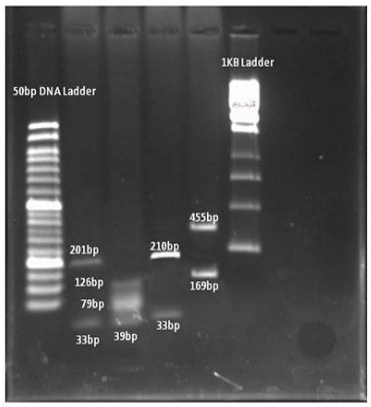
❋ یافته‌ها:

دو گروه مورد مطالعه از نظر جنسیت تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

در شکل شماره ۱ نمونه‌های هضم شده و ژنوتایپ هر ناحیه مشخص شده است.



ژنوتایپینگ ژن NRAMP1:خط ۱ بردبان DNA 50bp . خط ۲ : قطعات حاصل از برش محصول PCR ژن D543توسط آنزیم AvaII برای بررسی موتاسیون در نوکلئوتید آدنین(D543ΔA).خط ۳ : قطعات حاصل از برش محصول PCR ژن D543توسط آنزیم AvaII برای بررسی موتاسیون در نوکلئوتید گوانین (D543ΔG) . خط ۴: قطعات حاصل از برش محصول PCR ژن 3UTRتوسط آنزیم FokI . خط ۵: قطعات حاصل از برش محصول PCR ژن INT4توسط آنزیم ApaI .

شکل ۱- ژنوتایپینگ ژن NRAMP-1

هیچ الگوی هموزیگوتی برای موتاسیون D543 در گروه سالم مشاهده نشد. این در حالی است که در ۰/۷ درصد افراد واجد موتاسیون در INT-4 و ۳/۱ درصد افراد واجد موتاسیون در 3'UTR الگوی هموزیگوتی دیده شد. همچنین ارتباط معنی‌داری بین بیماران مسلول و افراد سالم در 3'UTR دیده نشد، ولی این ارتباط در D543 و INT 4 قابل مشاهده بود (جدول شماره ۱).

جدول۱- فراوانی آلل‌های ژن Nramp-1 در افراد مسلول و سالم

ژنوتایپ / گروه	مسلول (۸۲ نفر)	سالم (۱۵۰ نفر)	سطح معنی‌داری
INT4 G/G (Uncut) G/C (هتروزیگوت) C/C (هموزیگوت)	۵۳ (٪۶۴/۶) ۲۱ (٪۲۵/۶) ۸ (٪۹/۸)	۹۶ (٪۶۴/۶) ۵۳ (٪۳۵/۳) ۱ (٪۰/۷)	۰/۵
D543 G/G (Wild) G/C (هتروزیگوت) A/A (هموزیگوت)	۴۲ (٪۵۱/۲) ۳۸ (٪۴۶/۳) ۲ (٪۲/۵)	۲۲ (٪۱۴/۷) ۱۲۸ (٪۸۵/۳) ۰ (٪۰)	۰/۰۰۱
3'UTR TGTG +/+(Wild) TGTG+/del (هتروزیگوت) TGTG del/del (هموزیگوت)	۷۷ (٪۹۳/۹) ۲ (٪۲/۴) ۳ (٪۳/۷)	۱۳۸ (٪۹۲) ۱۰ (٪۶/۷) ۲ (٪۱/۳)	۰/۵۶

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

این بررسی نشان داد که الگوی هتروزیگوت در INT4 ، D543 و 3'UTR ژن NRAMP-1 افراد سالم شایع‌تر از بیماران بود و در بیماران، الگوی هوموزیگوت این نواحی شیوع بیش‌تری داشت.

مشخص شده است جهش طبیعی که در ژن NRAMP-1 اتفاق می‌افتد، سبب معیوب شدن سیستم ایمنی بر علیه تعداد زیادی از پاتوژن های داخل سلولی مثل مایکوباکتریوم می‌شود.[۱۴-۱۶] عملکرد ژن NRAMP-1 در سطح ماکروفاژ است، یعنی توانایی کنترل عملکرد پرایمینگ در ماکروفاژ را دارد. مطالعه‌های زیادی نشان داده‌اند که جهش ژن NRAMP-1 در میان بیماران مسلول زیاد است.[۱۷-۱۹] اختلاف فردی در بروز یا عدم بروز بیماری فعال سل موجب شده است مطالعه‌های فراوانی در خصوص علل زمینه‌ای و ژنتیک ابتلا به این بیماری انجام شود. از جمله مطالعه بر روی آنتی‌ژن لکوسیتی انسان، HLA گیرنده ویتامین D (VDR)، پروتئین ماکروفاژی مرتبط با مقاومت طبیعی از نوع NRAMP-1 ، لکتین متصل شونده به مانوز (MBL) و نیز عامل نکروز توموری(TNF).[۲۰]

نینو و همکاران در سال ۲۰۰۷ ژن NRAMP-1/Slc11a1 را به عنوان یکی از عوامل ژنتیکی میزبان برای افزایش خطر ابتلا به بیماری سل و جزام مورد مطالعه قرار دادند.[۲۱] آب و همکاران در سال ۲۰۰۳ تأثیر پلی مورفیسم 3'UTR را در استعداد ابتلای میزبان به اسمیر مثبت توبرکلوزیس مطالعه کردند.[۱۹] نیشیمورا و همکاران در سال ۲۰۰۳ به حضور هتروزیگوت D543 در مسلولین در ژاپن پی بردند.[۲۲] در حالی که ریو و همکاران ارتباطی بین پلی مورفیسم INT4 و افراد با اسمیر مثبت در کره نیافتند.[۱۰] بغدادی و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مراکش ارتباطی بین INT4 ، 3'UTR و D543N با بیماری سل نیافتند.[۷] اما مطالعه‌ای در ژاپن و چین نشان داد که D543 ارتباط شدیدی با بیماری سل دارد.[۲۳]

Archive of SID

www.SID.ir

فرنیا و همکاران در سال ۲۰۰۸ دریافتند ارتباطی میان 3'UTR و حساسیت به توبرکلوزیس وجود ندارد.[۲۴]

در مطالعه حاضر 3'UTR و D543 در بیماران مسلول نسبت به افراد سالم، گوناگونی کم‌تری داشتند. سایر مطالعه‌ها نشان داده‌اند که میزان موتاسیون در 3'UTR بیش‌تر است. در آفریقایی‌ها این رقم ۴۳ درصد و در آسیایی‌ها ۱۱ درصد ذکر شده است.[۹و۲۵و۲۶] فرنیا و همکاران طی مطالعه‌ای مشاهده کردند که موتاسیون در D543(G\A) افراد سالم ۸۲ درصد و افراد بیمار ۴۹ درصد بود و هیچ ارتباطی میان پلی مورفیسم D543 و 3'UTR و روند بیماری وجود نداشت.[۲۷]

به طور کلی در این بررسی هیچ ارتباطی بین 3'UTR و INT4 در ژن NRAMP-1 و احتمال ایجاد بیماری سل مشاهده نشد. در حالی که پلی مورفیسم‌های D543 با بیماری سل و توسعه آن در ارتباط بودند.

❋ سپاس‌گزاری:

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انجام شده است.

❋ مراجع:

1. World Health Organization Tuberculosis Fast Sheet. Available at: http://www.who.int/tb/publications/factsheets/en/Accessed in: 2012 Mar

2. Desalu OO, Adeoti AO, Fadeyi A, et al. Awareness of the warning signs, risk factors, and treatment for tuberculosis among urban Nigerians. Tuberc Res Treat 2013; 2013: 369717

3. Abbas AK, Lichtman H, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th ed. NewYork, Saunders; 2010. 210-15

4. Bikmaeva AR, Sibiriak SV, Valiakhmetova DKh, Khusnutdinova EK. Polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene in patients with infiltrative tuberculosis and from the Bashkortostan population. Mol Biol (Mosk) 2002 Sep-Oct; 36 (5): 784-7

5. Jo EK. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. Curr Opin Infect Dis 2008 Jun; 21 (3): 279-86

6. Bellamy R, Hill AV. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. Curr Opin Immunol 1998 Aug; 10 (4); 483-7

7. Hatta M, Ratnawati, Tanaka M, et al. NRAMP1 / SLC11A1 gene polymorphisms and host susceptibility to Mycobacterium tuberculosis and M. leprae in South Sulawesi, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2010 Mar; 41 (2): 386-94

8. Takahashi K, Hasegawa Y, Abe T, et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) polymorphisms associated with multidrug-resistant tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2008 Jan; 88 (1): 52-7

9. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al. Variations in the NRAMP 1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. N Engl J Med 1998 Mar 5; 338 (10): 640-4

10. Ryu S, Park YK, Bai GH, et al. 3'UTR polymorphisms in the NRAMP1 gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. Int J Tuberc Lung Dis 2000Jun; 4 (6): 577-80

11. Nugraha J, Anggraini R. NRAMP1 polymorphism and susceptibility to lung tuberculosis in Surabaya, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2011 Mar; 42 (2): 338-41

12. Richardson LJ, Kaestli M, Mayo M, et al. Towards a rapid molecular diagnostic for melioidosis: Comparison of DNA extraction

Archive of SID

www.SID.ir

methods from clinical specimens. J Microbiol Methods 2012 Jan; 88 (1): 179-81
13. Hebron HR, Yang Y, Hang J. Purification of genomic DNA with minimal contamination of proteins J Biomol Tech 2009 Dec; 20 (5): 278-81
14. Brown DH, Miles BA, Zwilling BS. Growth of Mycobacterium tuberculosis in BCG-resistant and - susceptible mice: Establishment of latency and reactivation. Infect Immun 1995 Jun; 63 (6): 2243-7
15. Awomoyi AA, Marchant A, Howson JM, et al. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. J Infect Dis 2002 Dec; 186 (12): 1808-14
16. Medina E, North RJ. Evidence inconsistent with a role for the Bcg gene (Nramp1) in resistance of mice to infection with virulent Mycobacterium tuberculosis. J Exp Med 1996 Mar 1; 183 (3): 1045-51
17. Soborg C, Andersen AB, Madsen HO, et al. Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy - positive tuberculosis. J Infect Dis 2002 Aug 15; 186 (4): 517-21
18. Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. Cell Microbiol 2001 Dec; 3 (12): 773-84
19. Abe T, Iinuma Y, Ando M, et al. NRAMP1 polymorphisms, susceptibility and clinical features of tuberculosis. J Infect 2003 May; 46 (4): 215-20
20. Stienstra Y, van der Graaf WT, te Meerman GJ, et al. Susceptibility to development of Mycobacterium ulcerans disease: Review of possible risk factors. Trop Med Int Health 2001 Jul; 6 (7): 554-62
21. Nino-Moreno P, Portales-Pérez D, Hernández-Castro B, et al. P2X7 and NRAMP1 / SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. Clin Exp Immunol 2007 Jun; 148 (3): 469-77
22. Nishimura M, Obayashi H, Mizuta I, et al. TNF, TNF receptor type 1, and allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in Japanese patients with type 1 diabetes. Hum Immunol 2003 Feb; 64 (2): 302-9
23. Kim JH, Lee SY, Lee SH, et al. NRAMP1 genetic polymorphisms as a risk factor of tuberculosis pleurisy. Int J Tuberc Lung Dis 2003 Apr; 7 (4): 370-5
24. Farnia F, Pajand O, Anoosh S, et al. Comparison of NRAMP1 gene polymorphism among TB health care workers and recently infect cases; assessment of host susceptibility. Tanaffos 2008; 7 (1): 19-24 [In Persian]
25. Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool P, et al. NRAMP1 and TNF-alpha polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. Respirology 2007 Mar; 12 (2): 202-6
26. Ates O, Dalyan L, Hatemi G, et al. Genetic susceptibility to Behçet's syndrome is associated with NRAMP1 (SLC11A1) polymorphism in Turkish patients. Rheumatol Int 2009 May; 29 (7): 787-91
27. Farnia P, Masjedi MR, Mirsaeidi M, et al. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of Mycobacterium tuberculosis strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. J Infect 2006 Nov; 53 (5): 331-6

Archive of SID

www.SID.ir