مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 6 (شماره پیاپی75)، شهریور 1392، 71-65

مطالعه وابستگی بین واریاسون پروموتر ژن BAT1 با بیماری آلزایمر دیررس(تک گیر) در جمعیت ایرانی

محسن سوسن آبادی فراهانی[1]، کورش کمالی[2]، مسعود کریملو[3]، مهدی بنان[4]، حمید رضا خرم خورشید[*5]

1. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران
2. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران
3. دانشیار، گروه اپیدمیولوژی و آمار، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران
4. استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران
5. دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/10/9 تاریخ پذیرش: 92/3/29

چکیده

زمینه و هدف: پژوهش‌های گوناگونی عنوان کرده‌اند که مکانیسم‌های التهابی درون سیستم اعصاب مرکزی به دلیل کنش‌های بین نورون‌ها و سلول‌های گلیال که به واسطه سیتوکین‌ها کنترل می‌شود باعث نقایص شناختی می‌شوند. BAT1 عضوی از خانواده RNA هلیکازهای دارای DEAD-BOX Domain به نظر می‌رسد در تنظیم سیتوکین‌های التهابی وابسطه به بیماری آلزایمر نقش داشته باشد. در این مطالعه پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی پروموتری 22- *BAT1* در بیماران مبتلا به آلزایمر و افراد شاهد بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، DNA از خون محیطی 153 فرد بیمار و 153 فرد شاهد به روش Salting out استخراج شد و به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. مقدار p کمتر از 0/05 معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بعد از تعیین ژنوتیپ و آنالیزهای آماری ارتباط معنی داری بین بیماران مبتلا به آلزایمر تک گیر و پلی مورفیسم 22- *BAT1* مشاهده نشد.

نتیجه گیری: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی 22- *BAT1* در جمعیت ایرانی با بیماری آلزایمر دیر رس ارتباط ندارد و تاثیری در افزایش خطر ابتلا به آلزایمر تک گیر ندارد.

واژگان کلیدی: بیماری آلزایمر، مطالعات ارتباط ژنتیکی،BAT1، التهاب، پلی مورفیسم

[*] **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

Email: hrkk1@uswr.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری آلزایمر به عنوان شایع‌ترین عامل دمانس یا زوال عقل در دوران میان‌سالی و پیری، با نقص در فعالیت‌های شناختی از جمله عدم توانایی در سخن گفتن، عدم تشخیص افراد و اشیاء با وجود سالم بودن حواس، از دست دادن حافظه، از دست دادن توانایی انجام حرکات هدفمند و تغییرات شخصیتی همراه است(1). بیماری آلزایمر، نخستین بار در سال 1906 توسط یک عصب شناس آلمانی به نام آلوئیس آلزایمر مطرح شد(2). محققان با انجام آزمایش‌های متعدد دریافتند که سیتوکین‌های پیش التهابی و کموکین‌ها در پاتوژنز چندین نوع از نواقص نورولوژیکی و نورودژنریتیو نقش دارند که در این مطالعه ژن *BAT1* که در مسیر التهابی نقش دارد مورد مطالعه قرار گرفت(3).

ژن *BAT1* از اعضای خانواده RNA هلیکازهای دارای DEAD box Domain و از ATPaseهای وابسته به RNA می‌باشد که وظیفه هیدرولیز ATP را در طی فرایند pre-mRNA splicing بر عهده دارد(4). پروتئین کد شونده توسط این ژن یک عامل اساسی برای splicing است که برای اتصال U2 snRNA به-pre mRNA مورد نیاز است. هم‌چنین انتقال mRNA از هسته به سیتوپلاسم هم از دیگر اعمال این پروتئین می‌باشد(5). این ژن درون خوشه ژنی قرار دارد که در مجاورت ژن‌های کد کننده فاکتورهای نکروز توموری آلفا و بتا واقع شده اند(6). تمامی این ژن‌های مذکور درون کمپلکس سازگاری بافتی کلاس 3 (MHC class III) واقع شده‌اند. پیرایش متناوب این ژن رونوشت‌های مختلفی ایجاد می‌کند. ژن‌های کاذب مرتبط با این ژن نیز روی هر دو کروموزوم 6 و 11 شناسایی شده‌اند(7).

محققین با استفاده از کلونینگ و به وسیله تکنیک Chromosome walking توسط وکتورهای کاسمیدی دارای هم‌پوشانی، قطعه‌ای 435 کیلوبازی را جداسازی گردید که در سمت سانترومری HLA-B درون کمپلکس سازگاری بافتی واقع بود(8). حضور ژن‌هایی در این منطقه در نتیجه مشاهده خوشه‌ای از جزایر CpG مرتبط با ژن در این منطقه پیشنهاد شده بود. سرانجام کلون‌های cDNA از این ژن که HLA-B associated transcript 1(*BAT1*) نام گرفت جداسازی شدند(9). در سال 1995 توالی ژن‌های *BAT1* انسان و خوک شناسایی شدند و هم‌چنین مشخص شد که این ژن‌ها از اعضای خانواده DEAD box و از ATPase های وابسته به RNA می‌باشند(10) و دارای عملکردهای سلولی مختلفی از جمله شروع ترجمه، پیرایش RNA و سر هم‌بندی ماشین ریبوزومی می‌باشند. پروتئین‌های اعضای این خانواده در 9 آمینواسید حفاظت شده مشترکند ولی انتهای آمینو و کربوکسیل متفاوتی دارند. این ژن ده اگزون دارد و حدود 10kb از DNA ژنومیک را تشکیل داده است و یک پروتئین 428 آمینواسیدی کد می‌کند(11). پروتئین این ژن بسیار حفظ شده است و دارای 98 درصد همولوژی با پروتئین هسته‌ای کبد موش(p47) و 99 درصد همولوژی با همولوگ خوکی *BAT1* می‌باشد(12). در این مطالعه به بررسی ارتباط پلی مورفیسم 22- *BAT1* در ناحیه پروموتر ژن *BAT1* با بیماری آلزایمر دیررس در جمعیت ایرانی پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه مورد شاهدی است. بیماران ایرانی مبتلا به آلزایمر تک گیر به تعداد 153 نفر از انجمن آلزایمر ایران، خانه‌های سالمندان فرزانگان، مهرورزان، شایستگان، کهریزک، کهریزک هاشمی نژاد و مرکز روماتیسم ایران جمع آوری شدند. همه‌ی بیماران آلزایمر از نظر معیارهای DSM IV بررسی شدند و هیچ یک دارای سابقه خانوادگی ابتلا به آلزایمر نبودند. افراد کنترل سالم نیز به تعداد 153 نفر از افراد سالم مراکز ذکر شده در بالا به صورت داوطلبانه همراه با تایید عدم وجود هر نوع بیماری عصبی یا روان شناختی جمع آوری شدند. اهداف و اهمیت این مطالعه با جزئیات برای هر یک از بیماران یا خانواده آنها ذکر شد و از تمامی افراد فرم رضایت نامه اخذ گردید. اطلاعات پلی مورفیسم 22-*BAT1* از پایگاه داده‌های SNP (dbSNP)، منتشر شده به وسیله

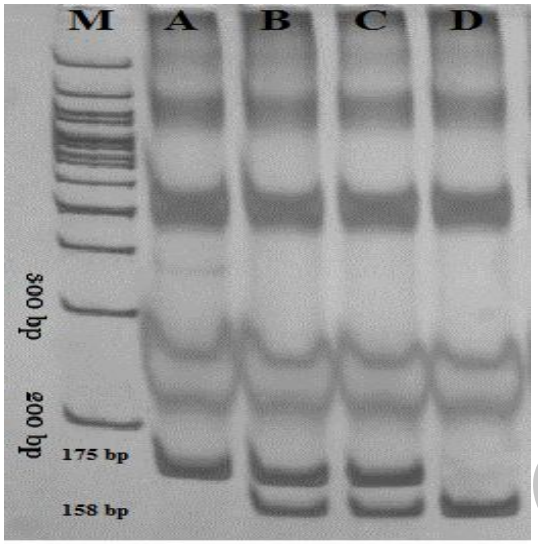
Archive of SID

www.SID.ir

مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی، گردآوری شد. سپس 5 میلی‌لیتر نمونه خون محیطی درون تیوب‌های محتوی 200 میکرولیتر از EDTA 0/5 مولار از هر فرد گرفته شد. DNA از گلبول‌های سفید خون محیطی به روش Salting out استخراج گردید. پلی مورفیسم ژن *BAT1* با استفاده از روش PCR-RFLP آنالیز شد. برای بررسی ژنوتیپ مذکور در بیماران مبتلا به آلزایمر و کنترل‌های سالم یک برنامه PCR استاندارد با حجم 16 Master mix میکرولیتر به کار رفت. قسمتی از هسته مرکزی پروموتر ژن *BAT1* با استفاده از پرایمرهای استاندارد فوروارد با توالی 5'-CTGCAACCGGAAGTGAGTGCA-3' و ریورس با توالی 5'-ACCAGACCATCGCCTGTGAAAAG-3' تکثیر گردید. محصول PCR 175 جفت بازی حاصل به وسیله آنزیم *Alw*44I (10 U/µl, Fermentas, Germany) هضم گردید و سپس قطعه تکثیر شده روی ژل الکتروفورز اکریل آمید 8 درصد الکتروفورز شد و در نهایت با روش رنگ آمیزی نیترات نقره رنگ آمیزی شد. تفاوت فرکانس ژنوتیپی با استفاده از آزمون کای دو بررسی شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. همچنین این پژوهش با کد اخلاقی 3835 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی به ثبت رسید.

یافته‌ها

در این مطالعه 153 فرد شاهد سالم و 153 فرد مبتلا به آلزایمر تک گیر مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن افراد شاهد 7/06±78/26 و میانگین سن بیماران 7/67±77/82 بود و اختلاف معنی داری بین دو گروه مورد و شاهد از نظر سن مشاهده نشد(p=0/62). اندازه قطعه تکثیر شونده 175 جفت باز می‌باشد. توالی تکثیر شونده نوع وحشی با ژنوتیپ GG هیچ جایگاه برشی برای آنزیم *Alw44*I وجود ندارد که یک قطعه 175جفت بازی تولید می‌کند. نوع واریانت با ژنوتیپ CC یک جایگاه برش برای آنزیم *Alw44*I وجود دارد و پس از انکوباسیون با آنزیم یک قطعه 17 جفت بازی و یک قطعه 158 جفت بازی تولید می‌شود که قطعه 17 جفت بازی در ژل قابل مشاهده نیست. نوع هتروزیگوت واریانت با ژنوتیپ GC یکی از الل‌ها توسط آنزیم بریده می‌شود و در نهایت سه قطعه 17، 158 و 175 جفت بازی حاصل می‌شود که قطعه 17 جفت بازی قابل مشاهده نیست.



شکل 1. قطعات حاصل از برش با آنزیم محدود کننده *ALW44* I روی ژل اکریل آمید 8 درصد، M: مارکر، A: نمونه هموزیگوت نوع وحشی با ژنوتیپ GG، B و C: نمونه‌های هتروزیگوت با ژنوتیپ GC، D: نمونه هموزیگوت واریانت با ژنوتیپ CC

نتایج حاصل از بررسی‌های همسانی توزیع الل‌ها در دو گروه بیماران و افراد سالم برای واریاسیون *BAT1*-22 به این صورت بود که پراکندگی الل G در گروه بیماران و افراد سالم به ترتیب 210 و 218 الل بود و هم‌چنین پراکندگی الل C در گروه بیماران و افراد شاهد به ترتیب 94 و 86 الل بود. لذا از نظر پراکندگی اللی، ارتباط معنی داری بین گروه بیماران و افراد سالم مشاهده نشد(p=0/44). هم‌چنین فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم *BAT1*-22 برای ژنوتیپ GG در بین بیماران و افراد سالم به ترتیب 79 و 80، فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت GC به ترتیب 62 و 58 (p=0/4) و هم‌چنین فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت واریانت CC به ترتیب 16 و 14 ژنوتیپ بود(p=0/4). همان

Archive of SID

www.SID.ir

طور که ملاحظه می‌شود بین دو گروه مورد و شاهد از نظر ژنوتیپ *BAT1*-22 اختلاف معنی داری یافت نشد.

بحث

در این مطالعه به بررسی تاثیر واریاسیون پروموتری *BAT1*-22 در ابتلا به بیماری آلزایمر دیررس در جمعیت ایرانی پرداختیم. بررسی پراکندگی ژنوتیپ‌ها در دو گروه مورد و شاهد حاکی از عدم تاثیر ژنوتیپ‌های هتروزیگوت وهموزیگوت واریانت در افزایش خطر ابتلا به بیماری آلزایمر دیررس بود. هم‌چنین بررسی پراکندگی آللی نیز تفاوت معنی داری را بین دو گروه نمایان نکرد. بیماری آلزایمر با مکانیسم‌های پاتوژنیک هتروژن و پیچیده که عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی در ایجاد آن دخیل می‌باشند به عنوان شایع‌ترین عامل زوال شناختی در افراد مسن محسوب می‌شود .

اگرچه اتیولوژی فرم تک گیر آلزایمر کاملا شناخته شده نمی‌باشد، ولی جهش در (Amyloid precursor protein- APP) و یا آنزیم‌های پردازش کننده این پروتئین (ß-Secretase & γ-Secretase) که سبب افزایش میزان پپتیدهای Aß-40 و Aß-42 می‌گردند، ضمن فعال کردن میکروگلیاها در جهت حذف پپتید Aß و ترشح سیتوکین‌های التهابی و نیز تخریب نورون‌هایی که توسط این پپتید آسیب دیده‌اند، سبب التهاب عصبی در مغز فرد بیمار می‌گردد(13). وجود پلی مورفیسم در برخی از ژن‌های مسیر التهابی باعث مستعد شدن افراد برای ابتلا به آلزایمر می‌شود که از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن *BAT1* اشاره کرد(14). از آن جایی که برخی از واریاسیون‌های پروموتری با تاثیر بر سطح بیان ژن مستقیما منجر به بروز تغییرات فنوتیپی گردیده و به عبارتی دیگر دارای نقش عملکردی می‌باشند بنابراین واریاسیون-*BAT1*-22 که در هسته مرکزی پروموتر ژن *BAT1* قرار دارد را برای مطالعه انتخاب کردیم. سطوح افزایش یافته پروتئین ژن *BAT1* ممکن است باعث ایجاد بی نظمی در انتقال و پیرایش mRNA گردد. بنابراین وجود الل‌های مختلف واریاسیون *BAT1*-22 ممکن است باعث تغییر در روند پردازش mRNA و ایجاد طیفی از مشکلات فنوتیپی متفاوت گردد(15، 16).

یکی از نقش‌های کلیدی برای ژن *BAT1* در ارتباط با پاتولوژی بیماری آلزایمر این است که پلی مورفیسم *BAT1*-22 نه تنها باعث تغییر در رونویسی ژن *BAT1* می‌شود بلکه علاوه بر نقش این واریاسیون در افزایش پایداری mRNA ژن *BAT1*، پروتئین حاصله ممکن است باعث تغییر در سطح ترجمه چندین سیتوکین التهابی وابسته به پاتولوژی بیماری آلزایمر گردد(17). این نظریه که ژن *BAT1* ممکن است در تنظیم سیتوکین‌های التهابی نقش داشته باشد قبلا مطرح گردیده است(18، 19). از آن جایی که نقش واریاسیون *BAT1*-22 در سبب شناسی ابتلا به بیماری آلزایمر مطرح گردیده است ما با انجام این مطالعه سعی کردیم نقش واریاسیون مذکور را در ابتلا به بیماری آلزایمر در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار دهیم. در پژوهشی که در سال 2004 در استرالیا انجام گرفت مشخص شد پلی مورفیسم‌ها در ناحیه ی 22- و 348- ژن *BAT1* از طریق اثر متقابلی که با عوامل رونویسی دارند می‌توانند فرایند رونویسی این ژن را تغییر دهند(20). در مطالعه‌ای دیگر که در سال 2008 بر روی پلی مورفیسم *BAT1*-22 در استرالیا انجام گرفت مشخص گردید که ژنوتیپ هتروزیگوت این واریاسیون اثری محافظت کننده در برابر ابتلا به آلزایمر در افراد دارد(17). در مطالعه جاری در بررسی میانگین سن بیماران و میانگین سن افراد سالم از لحاظ آماری اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نگردید. لذا در بررسی ارتباط این پلی مورفیسم در دو گروه بیمار و سالم اثر مخدوش کننده‌ای مشاهده نگردید. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و سالم ضمن در نظر گرفتن فاصله اطمینان 95 درصد و سطح معناداری 0/05 در ارتباط با ژن *BAT1* نشان می‌دهد که بین افراد سالم و بیمار اختلاف معنادار آماری وجود ندارد. مطالعات عملکردی و مورد-شاهدی در ارتباط با واریاسیون *BAT1* -22 در جمعیت‌های دیگر ارتباط پلی مورفیسم مذکور را با بیماری آلزایمر به خوبی نشان می دهند. نتایج حاصله در این مطالعه

Archive of SID

www.SID.ir

بیان می‌کنند که پلی مورفیسم مذکور در جمعیت ایرانی اثری روی ابتلا به بیماری آلزایمر ندارد.

جهت بالا بردن دقت مطالعه پیشنهاد می‌شود از تعداد بیشتری نمونه استفاده شود و هم‌چنین چنان چه بتوان از وجود یک مطالعه عملکردی برای بررسی تغییر در سطح بیان ژن *BAT1* تحت تاثیر این جایگاه پلی مورف بهره جست نتایج کامل‌تری حاصل خواهد شد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که وجود واریاسیون *BAT1*-22 در جمعیت ایران خطر ابتلا به بیماری آلزایمر را افزایش نمی‌دهد و در واقع بین دو گروه از نظر پراکنش ژنوتیپی در این جایگاه اختلاف معنی دار وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از کلیه افراد شرکت کننده در این مطالعه که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند صمیمانه قدردانی می‌کنیم. این مطالعه از پایان نامه تحقیقاتی کارشناسی ارشد شماره 171-1000 استخراج گردیده است و در مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران انجام شد.

منابع

1- Kaida K-i, Takeda K, Nagata N, Kamakura K. Alzheimer's disease with asymmetric parietal lobe atrophy: a case report. Journal of the neurological sciences. 1998;160(1):96-9.
2- Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. Journal of neuroimmunology. 2007;184(1):69-91.
3- Steinman L. Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. The Journal of clinical investigation. 2008;118(11):3557-63.
4- Fleckner J, Zhang M, Valcarcel J, Green MR. U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. Genes & development. 1997;11(14):1864-72.
5- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. Science. 1989;243(4888):214-7.
6- Peelman LJ, Chardon P, Nunes M, Renard C, Geffrotin C, Vaiman M, et al. The BAT1 gene in the MHC encodes an evolutionarily conserved putative nuclear RNA helicase of the DEAD family. Genomics. 1995;26(2):210-8.
7- Sträßer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, et al. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. Nature. 2002;417(6886):304-8.
8- Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. Cellular signaling. 2010;22(7):977-83.
9- Safranow K, Dziedziejko V, Rzeuski R, Czyżycka E, Wojtarowicz A, Bińczak-Kuleta A, et al. Plasma concentrations of TNF-α and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. Tissue Antigens. 2009;74(5):386-92.
10- Hasegawa Y, Sawada M, Ozaki N, Inagaki T, Suzumura A. Increased soluble tumor necrosis factor receptor levels in the serum of elderly people. Gerontology. 2000;46(4):185-8.
11- Cacabelos R, Alvarez X, Franco-Maside A, Fernandez-Novoa L, Caamano J. Serum tumor necrosis factor (TNF) in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. Methods and findings in experimental and clinical pharmacology. 1994;16(1):29.
12- Weisman D, Hakimian E, Ho GJ. Interleukins, inflammation, and

Archive of SID

www.SID.ir

mechanisms of Alzheimer's disease. Vitamins & Hormones. 2006;74:505-30.
13- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends in pharmacological sciences. 1991;12:383-8.
14- Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2005;37(2):289-305.
15- Gatfield D, Le Hir H, Schmitt C, Braun IC, Köcher T, Wilm M, et al. The DExH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in Drosophila. Current biology. 2001;11(21):1716-21.
16- Luo M-J, Zhou Z, Magni K, Christoforides C, Rappsilber J, Mann M, et al. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. Nature. 2001;413(6856):644-7.
17- Gnjec A, D'Costa KJ, Laws SM, Hedley R, Balakrishnan K, Taddei K, et al. Association of alleles carried at TNFA-850 and BAT1-22 with Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2008;5(36):1-10.
18- Allcock RJ, Williams JH, Price P. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. Genes to Cells. 2001;6(5):487-94.
19- Wong AML, Allcock RJ, Cheong KY, Christiansen FT, Price P. Alleles of the proximal promoter of BAT1, a putative anti-inflammatory gene adjacent to the TNF cluster, reduce transcription on a disease-associated MHC haplotype. Genes to Cells. 2003;8(4):403-12.
20- Price P, Wong AM, Williamson D, Voon D, Baltic S, Allcock RJ, et al. Polymorphisms at positions -22 and -348 in the promoter of the BAT1 gene affect transcription and the binding of nuclear factors. Hum Mol Genet. 2004;13(9):967-74.

Archive of SID

www.SID.ir