Original Article

Association Study of rs13241278 and rs2693657 Polymorphisms of PTPRZ1 Gene with Multiple Sclerosis in Iranian Population

Zahra Bahadori, M.Sc.[1], Mehrdad Behmanesh, Ph.D.[1]*, Mohammad-Ali Sahraian, M.D.[2], Moones Heidari, M.Sc.[1]

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 14115-154, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran***
Email: behmanesh@modares.ac.ir

Received: 23/Feb/2010, Accepted: 13/Jun/2010

Abstract

Objective: Human multiple sclerosis (MS) is a complex disease and demyelinated lesions in central nervous system (CNS) are the pathologic hallmark of MS. Remyelination occurs in many MS lesions but becomes increasingly incomplete/inadequate. Protein tyrosine phosphatase,receptor-type z polypeptid1 (PTPRZ1) has been implicated in adult cell renewal, repair of the nervous system, oligodendrocyte development and so in Remyelination. We investigated possible association of multiple sclerosis with polymorphism of two SNPs (rs13241278 and rs2693657) located in PTPRZ1 gene.

Materials and Methods: Peripheral blood was collected from 140 subjects with MS and 165 healthy controls and DNA was extracted. For genotyping of rs13241278 and rs26936575, PCR-RFLP and mismatch PCR-RFLP techniques were used, respectively. Association of SNPrs13241278 and SNPrs26936575 with multiple sclerosis was examined by using the Chi-square test and the frequency differences of alleles and genotypes between two groups were compared. A conventional p-value of ≤ 0.05 was considered significant.

Results: Statistical analyses on two studied polymorphisms showed that both case and control group were in Hardy-Weinberg equilibrium. By using χ^2 test, the difference between frequency of SNPrs13241278 Risk allele vs. other allele in control and case groups was p=0.773 and for SNPrs26936575 was p=0.669. The difference between frequency of Homozygosity vs. other genotypes in control and case groups for SNPrs13241278 was p=0.377 and for SNPrs26936575 was p=0.64.

Conclusion: According to the χ^2 test results, the differences were not significant for studied SNPs. As a conclusion, we did not find association between SNPrs13241278 and SNPrs26936575 of PTPRZ1 and multiple sclerosis in Iranian population.

Keywords: Multiple Sclerosis, PTPRZ1 Gene, Remyelination, SNP

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 341-348

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs13241278 و rs2693657 از ژن PTPRZ1 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت ایران

زهرا بهادری .M.Sc[1]، مهرداد بهمنش .Ph.D[1]*، محمدعلی صحراییان .M.D[2]، مونس حیدری .M.Sc[1]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان سینا، گروه نورولوژی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۵۴-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
پست الکترونیک: Emai: behmanesh@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۴، پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۲۲

چکیده

* **هدف:** بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs13241278 و rs2693657 از ژن Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type z Polypeptid1 (PTPRZ1) با بیماری مالتیپل اسکلروزیس

* **مواد و روش‌ها:** جمع‌آوری نمونه‌های خون و استخراج DNA ژنومیک از ۱۶۵ فرد نرمال و ۱۴۰ فرد بیمار انجام شد. برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs13241278 از روش PCR-RFLP و برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs2693657 از روش Mismatch PCR-RLFP استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز مولکولی ژنوتیپ افراد بیمار و کنترل با استفاده از آزمون آماری Chi-Square و نرم‌افزار آماری SPSS آنالیز شد.

* **یافته‌ها:** هر دو جمعیت بیمار و کنترل برای هر دو پلی‌مورفیسم در تعادل هاردی واینبرگ بوده و اختلاف آماری معنی‌داری از نظر فراوانی بین الل‌های دو پلی‌مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه وجود نداشت.

* **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌های مذکور از ژن PTPRZ1 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت ایرانی یافت نشد.

* **کلیدواژگان:** مالتیپل اسکلروزیس، PTPRZ1، میلین‌سازی مجدد، SNP2693657، SNP13241278

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۴۸-۳۴۱

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis; MS) یک بیماری التهابی و خودایمنی است که بر سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System; CNS) اثر گذاشته و تخریب میلین و تحلیل آکسونی را به دنبال دارد (۱). به طور معمول شیوع بیماری در جوانی بوده و بیشتر در زنان رخ می‌دهد (۲). تغییرات بیماری‌زایی عمومی شامل تخریب میلین، ناکافی بودن بازسازی میلین در این محل‌ها، آسیب آکسون‌ها و تشکیل پلاک است (۳).

MS به عنوان یک بیماری پیچیده در نظر گرفته می‌شود و عوامل متعددی در استعداد ابتلا و بیماری‌زایی آن درگیر بوده و بیماری پراکنش یکسانی در دنیا ندارد. بر اساس اطلاعات اطلس جهانی MS شیوع این بیماری ۳۰ در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر است که به ترتیب اروپا، مدیترانه شرقی، آمریکا، جنوب شرقی آسیا و آفریقا بیشترین میزان شیوع را دارد (۴). با توجه به مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده، به نظر می‌رسد که علاوه بر عوامل محیطی عوامل ژنتیکی نیز در بروز MS موثر باشد. شایع بودن MS در گروه‌های مختلف نژادی از قبیل سفیدپوستان آمریکای شمالی و اروپای شمالی تأییدی این مطلب است. بعضی از خانواده‌ها استعداد ابتلای بیشتری داشته و بستگان درجه یک یا دو بیماران در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به این بیماری هستند (۵).

مطالعات متعددی به منظور تشخیص و ارزیابی اساس ژنتیکی MS و شاخص‌های ژنتیکی درگیر در بیماری انجام شده است. نتایج به دست آمده از شجره‌نامه خانواده‌هایی که چندین عضو آن مبتلا به MS هستند، حاکی از آن است که استعداد ابتلا به MS توسط چندین ژن مختلف کنترل می‌شود. با توجه به ماهیت خودایمنی بودن بیماری، و آسیب ایجاد شده در لایه میلین، تحقیقات بسیاری بر ژن‌های کد کننده پروتیین‌های درگیر در سیستم ایمنی یا ژن‌های سازنده ساختمان میلین تمرکز یافته است. کمپلکس سازگار نسجی واقع بر کروموزوم شماره ۶ یکی از عوامل ژنتیکی است که به نظر می‌رسد در بروز MS نقش دارد اما در حقیقت لوکوس Major Histocompatibility Complex (MHC) و تغییرات ژنتیکی در آن تنها بخش کوچکی از عوامل ژنتیکی مؤثر بر این بیماری را شامل می‌شود (۶).

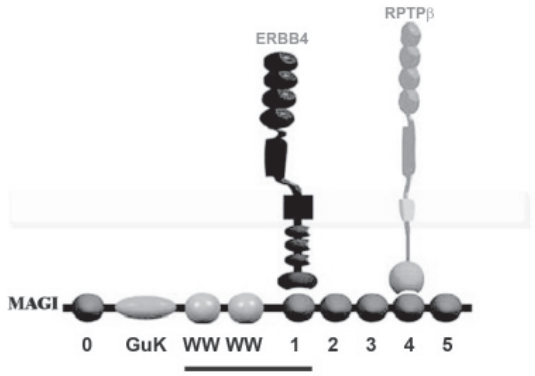
بر اساس مطالعات اخیر یکی از مسایل موجود جهت درمان بیماری، مشکل در بازسازی مجدد میلین در محل آسیب دیده می‌باشد. بنابراین بررسی نقش ژن‌های درگیر در مسیر میلین‌سازی و یا بازسازی مجدد آن می‌تواند در شناخت هر چه بیشتر مکانیسم ایجاد و نیز یافتن راه درمان برای بیماری مفید باشد.

میلین‌سازی مجدد پدیده‌ای است که به دنبال آسیب به میلین و فرایند دمیلینه شدن رخ می‌دهد و طی آن در سیستم عصبی مرکزی بالغ، صفحات جدید میلین به دور آکسون‌های فاقد میلین تولید می‌شود. میلین‌سازی مجدد در دو فاز رخ می‌دهد؛ فاز اول شامل قرار گرفتن سلول‌های نیای الیگودندروسیت (Oligodendrocyte Precursor Cell; OPC) در محل آسیب‌هاست و در فاز دوم تمایز OPCها به الیگودندروسیت‌های میلین‌ساز رخ می‌دهد. این پدیده در بسیاری از آسیب‌های ایجاد شده در

افراد مبتلا به M.S نیز رخ می‌دهد. ولی به طور قابل ملاحظه‌ای ناقص و ناکافی بوده و در نتیجه ترمیم آسیب‌ها با شکست مواجه می‌شود. برای درک علل این شکست تلاش‌های زیادی بر شناخت بیولوژی میلین‌سازی مجدد و فاکتورهای مولکولی و بین سلولی تنظیم‌کننده این فرایند، متمرکز شده است (۷).

یکی از مسیرهای مهم درگیر در میلین‌سازی مجدد، مسیر پیام‌رسانی NRG1-ERBB است. محصولات ژن NRG1 می‌توانند مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی را از طریق میان‌کنش با خانواده گیرنده تیروزین کینازی ERB(ERBB2,ERBB3,ERBB4) فعال کنند (۸، ۹) و از این طریق دو مسیر متفاوت PI3K و MAPK را در شرایط متفاوت فعال می‌کنند که به واسطه آن تمایز الیگودندروسیت‌ها تنظیم می‌شود. ملکول‌های NRG1 در نورون‌ها بیان شده و پیام‌های لازم را از آکسون‌ها به الیگودندروسیت‌ها می‌رسانند (۱۰، ۱۱). در مطالعات مختلف گزارش شده که افزایش بیان ژن NRG1 در موش ترانس‌ژنیک منجر به افزایش میلین‌سازی در CNS شده است. به علاوه، در طناب‌های عصبی جدا شده از جنین‌های اولیه‌ای که در ژن NRG1 نقص داشتند، الیگودندروسیت‌های کمی رشد می‌کنند (۱۲).

دومین سیتوپلاسمی ERBB4 با پروتئین MAGI-2 میان‌کنش دارد و با فسفریلاسیون تیروزین در پروتئین‌های MAGI، پیام را به درون سلول می‌فرستد. یکی دیگر از اعضای این مسیر پروتئین RPTP است که توسط ژن Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type z Polypeptid1 (PTPRZ1) کد می‌شود. RPTPβ از طریق پروتئین‌های MAGI روی این مسیر تاثیر می‌گذارد و با دفسفریلاسیون تیروزین آنها مسیر فعال شده NRG1-ERBB را خاموش می‌کند (۱۳). پروتئین‌های MAGI باعث تجمع دومین‌های درون غشایی تیروزین کیناز ERBB4 و تیروزین فسفاتاز RPTPβ در درون سلول می‌شود و کمپلکس کیناز (ERBB) فسفاتاز (RPTPβ) با استفاده از MAGI کنار هم قرار می‌گیرند و به این شکل توازن میان مسیرهای پیام‌رسانی پایین دست این مولکول‌ها تنظیم می‌شود (شکل ۱). در واقع RPTPβ نقش آنتاگونیستی را برای پیام‌رسانی NRG1-ERBB4 ایفا می‌کند (۱۴).



شکل ۱: تصویر شماتیکی از میان‌کنش ERBB4-MAGI-RPTPβ. ERBB4 به دومین PDZ1 متصل می‌شود، درحالی که RPTP به دومین PDZ4 متصل می‌شود (۱۳).

پروتئین RPTPβ توسط ژن PTPRZ1 کد می‌شود؛ این ژن عضوی از خانواده گیرنده تیروزین فسفاتاز است و روی بازوی بلند کروموزوم هفت قرار دارد و دارای سی اگزون می‌باشد. این ژن، ۴ ایزوفرم اسپلایسینگ دارد، دو ایزوفرم گیرنده‌های درون غشایی بوده که شامل فرم کوتاه و بلند RPTPβ است و دونوع دیگر فرم‌های محلول ایجاد می‌کند که فاقد منطقه درون غشایی و فعالیت تیروزین فسفاتازی هستند که فرم کوتاه و بلند Phosphocan را در بر می‌گیرد (۱۳). منطقه خارج سلولی PTPRZ1 دربردارنده چندین دومین ساختاری تنظیمی است که شامل یک دومین کربونیک انیدراز، یک تکرار نوع III فیبرونکتین، یک دومین فاصله انداز و یک منطقه حاوی حدود ۸۶۰ اسید آمینه‌ای می‌باشد که زنجیره‌های گلیکوزآمینوگلیکان به این منطقه متصل می‌شود. این دومین‌ها در هر ۴ ایزوفرم وجود دارد، ولی منطقه ۸۶۰ اسیدآمینه‌ای در فرم‌های کوتاه RPTPβ و Phosphacan وجود ندارد. مشخص شده که ایزوفرم Phos-phacan بر تکوین و بازسازی آکسونی تاثیر می‌گذارد (۱۵).

تغییرات در NRG1 و PTPRZ1 موجب ناهنجاری‌های الیگودندروسیتی، علاوه بر اثرات بالقوه اختلال نورونی می‌شود. در یک مدل موش تحریک شده به مالتیپل اسکلروزیس با استفاده انسفالومیلیتی خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE)، موش‌های دارای نقص عملکردی در ژن PTPRZ1 نتوانستند آسیب‌های ناشی از EAE را ترمیم کنند. این ضعف با افزایش آپوپتوز در الیگودندروسیت‌های بالغ در طناب‌های عصبی موش‌های جهش یافته در زمان اوج التهاب مرتبط بوده است (۱۶).

در مطالعات، دو ژن از مسیر پیام‌رسانی NRG1-ERBB به نام‌های NRG1 و PTPRZ1 با بیماری اسکیزوفرنیا، ارتباط معنی‌داری را نشان داده‌اند. اگرچه اسکیزوفرنیا همانند مالتیپل اسکلروزیس، مشخصه اختلالات وسیع در بخش سفید مغز را ندارد اما در مطالعات اخیر مشخص شده که با بیماری‌های دمیلینه شونده شباهت‌هایی دارد.این شباهت‌ها شامل: تغییرات وابسته به سن ، مقدار ماده سفید مغز، اختلال در ژن‌های مرتبط با میلین و اختلالات مورفولوژیکی در الیگودندروگلیا است که وجود بعضی یا همه آنها در مغز افراد مبتلا به اسکیزوفرنیا اثبات شده است. در مجموع، این یافته‌ها این فرضیه را تایید می‌کنند که عملکرد نادرست الیگودندروگلیا و حتی مرگ آنها و اختلالات متعاقب آن در حفظ و ترمیم میلین در بیماری‌زایی سندروم اسکیزوفرنیا شرکت دارند (۱۹-۱۷).

به دلیل اینکه در هر دو بیماری اسکیزوفرنیا و مالتیپل اسکلروزیس اختلالاتی در بخش سفید مغز به جهت آسیب به میلین و الیگودندروسیت‌ها دیده شده و در هر دوی این بیماری‌ها مسیر پیام‌رسانی NRG1-ERBB مورد توجه قرار گرفته و علاوه براین تغییرات بیان در ژن PTPRZ1 در بیماری مالتیپل اسکلروزیس مشاهده شده است، برآن شدیم که به مطالعه ارتباط دو پلی‌مورفیسم rs13241278 و rs2693657 از ژن PTPRZ1 (کدکننده پروتئین RPTPβ) با بیماری مالتیپل اسکلروزیس بپردازیم. در مطالعه قبلی این دو پلی‌مورفیسم ارتباط معنی‌داری با اختلال در میلین‌سازی در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا در جمعیت ایرلندی داشته‌اند (۱۳). در این گزارش فراوانی دو پلی‌مورفیسم فوق از ژن PTPRZ1 در جمعیتی از بیماران مبتلا به MS و افراد کنترل ایرانی به عنوان یک فاکتور احتمالی اثرگذار در قدرت ترمیم میلین، مورد سنجش قرار گرفته است. امید است که با این نوع مطالعات دیدگاه نوینی در سبب‌شناسی بیماری مالتیپل اسکلروزیس پایه‌ریزی شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌ها در فاصله زمانی سال ۱۳۸۸-۱۳۸۷ از افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مراجعه کننده به کلینیک تخصصی MS بیمارستان سینا در شهر تهران جمع‌آوری شد. تشخیص بیماری توسط پزشک متخصص

و بر اساس راهنمای تشخیص و بر اساس روش تشخیصی مک‌دونالد (McDonald) صورت گرفت. روش مک‌دونالد معیاری برای تشخیص بیماری MS است که توسط انجمن ملی مالتیپل اسکلروزیس در آمریکا ارایه شد. این روش بر مبنای تعداد حملات و آسیب‌های بالینی مشخص در Magnetic Resonance Imaging (MRI) گرفته شده از بیمار می‌باشد و با نظر پزشک متخصص MS انجام شده است. نمونه‌های کنترل از افراد داوطلبی انتخاب شد که خود یا بستگان نزدیک آنها فاقد هرگونه سابقه بیماری عصبی یا MS بوده و سابقه بستری شدن در بیمارستان به دلایل عصبی را نداشته‌اند. میانگین سنی بیماران برابر با ۶ ± ۳۱ و از افراد کنترل برابر با ۷ ±۳۰ سال بود. در مجموع ۱۴۰ فرد در گروه بیمار و ۱۶۵ فرد در گروه نرمال انتخاب شدند و برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا موضوع تحقیق برای افراد بیمار و کنترل توضیح داده شد و در صورت موافقت و پس از کسب رضایت کتبی افراد، مطالعه بررسی و از آنها نمونه‌گیری انجام شد. از هر فرد ۲ میلی لیتر خون گرفته واز اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک اسید (EDTA) با غلظت ۵/. مولار ودر pH= ۸ به عنوان ماده ضدانعقاد خون برای هر نمونه استفاده شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این طرح به تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

استخراج DNA

DNA ژنومیک از خون گرفته شده از بیماران و افراد نرمال استخراج شد. برای استخراج DNA از کیت DNG plus (سیناژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده کیت انجام شد. به طور خلاصه از بافر لیز کننده برای لیز کردن ۱۰۰ میکرولیتر از خون تام استفاده و سپس به طور اختصاصی DNA با استفاده از ایزوپروپانل رسوب داده شد. بعد از شست‌وشو با اتانل ۷۰ درصد و رسوب مجدد، DNA در بافر TE حل شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده ازژل الکتروفورز و دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد.

طراحی پرایمرها و انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

جهت تعیین ژنوتیپ افراد در محل پلی‌مورفیسم‌های rs13241278 و rs2693657 از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی برای آنالیز توالی نوکلیوتیدی محل هدف استفاده شد. بررسی‌ها نشان داد که وجود آلل β در پلی‌مورفیسم rs13241278 با روش PCR-RLFP و با استفاده از آنزیم برشگر TaqI قابل شناسایی است. از این رو پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند. از آغازگر اختصاصی جلویی (Forward Primer) با توالی 5'-TGGAGTCAGTATTTGAACCC-3' و آغازگر اختصاصی برگشتی (Reverse Primer) با توالی 5'-GGGAAGGCACACATATAGG-3' برای تکثیر قطعه ۵۸۶ جفت بازی - که حاوی پلی‌مورفیسم مورد نظر بود - استفاده شد. واکنش تکثیر قطعات DNA با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی و به تعداد ۳۵ سیکل انجام شد. چرخه های PCR استفاده شده به ترتیب عبارت بود از: ۹۴ درجه سانتی گراد واسرشتگی (Denaturation) ابتدایی به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشتگی۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها (Annealing) ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه.

در بررسی توالی نوکلئوتیدی در محل پلی مورفیسم rs2693657 هیچ محل برش مشخصی برای آنزیم‌های رستریکشن موجود یافت نشد. از این رو، از روش Mismatch PCR-RLFP برای ایجاد محل برش آنزیم و سپس تعیین ژنوتیپ آن استفاده شد. در این روش آغازگر اختصاصی جلویی به گونه‌ای طراحی شده که در نزدیکی انتهای '3 یک Mismatch داشته باشد و در صورت وجود نوکلیوتید A در محل پلی‌مورفیسم، جایگاه برشی برای آنزیم BamHI ایجاد شود.

از آغازگر اختصاصی جلویی با توالی
5'-TAGTTGACAAACCTTCATCTGGATGTGG-3'
و آغازگر اختصاصی برگشتی با توالی
5'-TTCCCAGGTCATTGTGTCTCC-3'
برای تکثیر قطعه 226bp - حاوی پلی‌مورفیسم مورد نظر بود - استفاده شد. واکنش تکثیر قطعات DNA با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی و به تعداد ۳۵ سیکل انجام گردید. شرایط انجام واکنش مشابه شرایط PCR برای rs13241278 بود.

در پایان تکثیر به منظور تایید انجام واکنش ۲ میکرولیتر از محصول‌های PCR روی ژل آگارز۱/۲ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه مشاهده و با استفاده از دستگاه ژل داکت عکس‌برداری شد.

برش محصول PCR

واکنش برش محصول PCR پلی‌مورفیسم rs13241278 با استفاده از 1Unit از آنزیم (Taq1, Takara, Japan) در حجم ۲۰ میکرولیتر ودر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. قطعات حاصل از تکثیر در صورت وجود آلل C در محل SNP با آنزیم Taq 1 بریده شده و دو قطعه bp ۲۹۰ و bp ۲۹۶ ایجاد می‌شود. محصول برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نتیجه آن آنالیز شد.

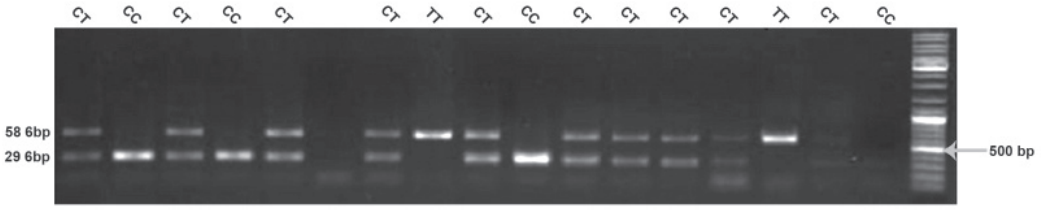
واکنش برش محصول PCR پلی‌مورفیسم rs2693657 با استفاده از 1Unit از آنزیم BamHI (Takara, Japan) در حجم ۲۰ میکرولیتردر دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد انجام می‌شد. در صورت وجود آلل A دو قطعه bp ۱۹۹ و bp ۲۷ ایجاد شد و در صورت وجود آلل G به دلیل عدم برش توسط آنزیم طول قطعه همان bp ۲۲۶ بود. محصول برش آنزیمی روی ژل آکریل‌آمید ۱۲ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نتیجه آن تحت آنالیز شد. به منظور تایید صحت عملکرد استراتژی طراحی شده برای تعیین ژنوتیپ تعدادی از نمونه‌ها برای تعیین توالی ارسال گردید.

آنالیز آماری

نتایج حاصل از آنالیز مولکولی ژنوتیپ افراد بیمار و کنترل در نرم‌افزار Excel وارد و با استفاده از آزمون آماری Chi-Square و نرم‌افزار SPSS (Version16) آنالیزهای لازم انجام گردید.

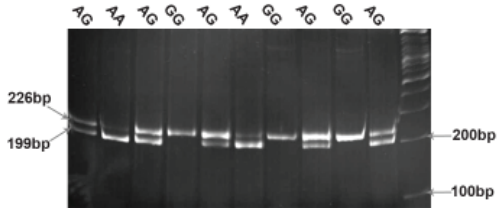
یافته ها

در این مطالعه از روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs13241278 از ژن PTPRZ1 استفاده شد (شکل ۲).

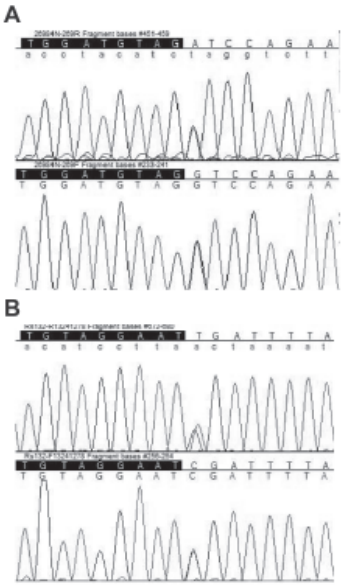


شکل ۲: برای تشخیص ژنوتیپ افراد در محل پلی‌مورفیسم نوکلیوتیدی rs13241278 از تکنیک PCR-RLFP و آنزیم محدودالاثر Taq I استفاده شد. قطعات حاصل از برش روی ژل اگاروز ۱درصد از هم جدا و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد. در صورت وجود آلل T طول قطعه ۵۸۶ جفت باز است، اما وجود آلل C باعث شکل‌گیری محل برش آنزیم می‌شود که قطعاتی به طول‌های ۲۹۶ و ۲۹۰ جفت باز ایجاد می‌شود. ژنوتیپ هر فرد در قسمت بالای ژل نشان داده شده است.

برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs2693657 از روش Mismatch PCR-RLFP استفاده شد که روی ژل آکریل‌آمید ۱۲ درصد تفاوت۳۰bp قطعات برش خورده و برش نخورده قابل تشخیص است (شکل۳).



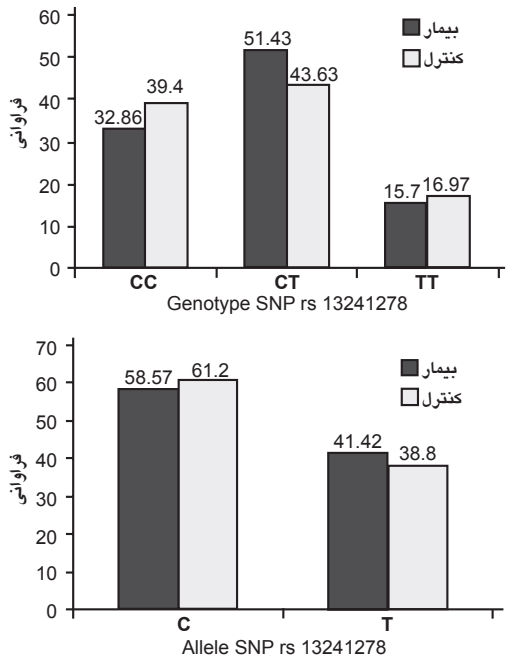
شکل ۳: برای تشخیص ژنوتیپ افراد در محل پلی‌مورفیسم نوکلیوتیدی rs2693657 از تکنیک Mismatch PCR-RLFP و آنزیم رستریکشن BamH I استفاده شد. قطعات حاصل از برش محصول Mismatch PCR در محل پلی‌مورفیسم روی ژل اکریل‌آمید ۱۲درصد از هم جدا و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد. در صورت وجود آلل G قطعه ۲۲۶ جفت بازی و وجود آلل A باعث شکل‌گیری محل برش آنزیم می‌شود که قطعاتی به طول‌های ۱۱۹و ۲۷ جفت باز ایجاد می‌شود. ژنوتیپ هر فرد در قسمت بالای ژل نشان داده شده است.



شکل ۴: نتایج تعیین توالی دو طرفه که با ژنوتیپ تعیین شده از طرق روش‌های PCR-RFLP و Mismatch PCR-RLFP مطابقت دارد. A: نتیجه تعیین توالی یک نمونه هتروزیگوت برای rs2693657. B: نتیجه تعیین توالی یک نمونه هتروزیگوت برای rs13241278.

ژنوتیپ‌های مشخص شده در تعیین توالی با ژنوتیپ‌های مشخص شده با روش PCR-RFLP و mismatch PCR-RLFP مطابقت داشت (شکل ۴). ۱۶۵ نمونه کنترل و ۱۴۰ نمونه بیمار با این دو روش تعیین ژنوتیپ شدند.

پس از تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم‌ها برای تمامی نمونه‌ها آنالیزهای لازم برای تعیین فراوانی اللی و ژنوتیپی انجام شد. آنالیزهای آماری نشان دادند که فراوانی‌های ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs13241278 در گروه کنترل (χ^2=۱/۰۸، df=۲، p>۰/۰۵)، (p=۰/۸) و بیماران (χ^2=۱/۰۸، df=۲، p>۰/۰۵)، (p=۰/۵) در تعادل هاردی و اینبرگ (Hardy Weinberg Equilibrium) قرار دارند. فراوانی‌های گروه‌های ژنوتیپی برای پلی‌مورفیسم rs13241278 در گروه کنترل به صورت: ۱۶/۹۷درصد=TT، ۴۳/۶۳درصد=CT، ۳۹/۴درصد=CC و در گروه بیمار برابر با ۱۵/۷۱درصد=TT، ۵۱/۴۳ درصد=CT، ۳۲/۸۶ درصد=CC بود (نمودار۱).



نمودار ۱: فراوانی آللی و ژنوتیپی در گروه بیمار و سالم برای پلی‌مورفیسم نوکلیوتیدی SNP rs13241278. نمودار بالا بیانگر توزیع فراوانی ژنوتیپی و نمودار پایین بیانگر توزیع فراوانی آللی بین دو گروه بیمار و کنترل می‌باشد. فراوانی ژنوتیپی و آللی بین دو گروه مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار از نظر آماری نداشت.

جدول ۱: فراوانی آللی و ژنوتیپی برای پلی‌مورفیسم نوکلیوتیدی **rs13241278** در گروه بیمار و کنترل و بررسی تفاوت آنها

SNP Name	Subject Number	Genotype frequency %			Allele frequency %		Risk allele vs. other allele			Homozygosity vs. other genotypes		
		CC	CT	TT	C	T	χ^2	df	p	χ^2	df	p
SNPrs13241278	Case:140	46(32.86%)	72(51.43%)	22(15.71%)	58.57	41.42	0.083	1	0.773	0.781	1	0.377
	Control:165	65(39.4%)	72(43.63%)	28(16.97%)	61.2	38.8						

df: درجه آزادی

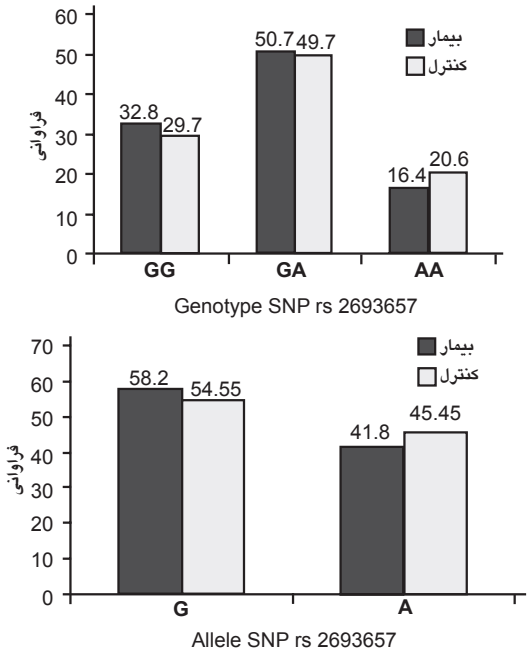
جدول ۲: فراوانی آللی و ژنوتیپی برای پلی‌مورفیسم نوکلیوتیدی **rs2693657** در گروه بیمار و کنترل و بررسی تفاوت آنها (**df**: درجه آزادی)

SNP Name	Subject Number	Genotype frequency %			Allele frequency %		Risk allele vs. other allele			Hemozygosity vs. Other genotypes		
		GG	GA	AA	G	A	χ^2	df	p	χ^2	df	p
SNPrs2693657	Case:140	46(32.86%)	71(50.71%)	23(16.43%)	58.2	41.8	0.183	1	0.669	0.209	1	0.64
	Control:165	49(29.7%)	82(49.7%)	34(20.6%)	54.55	45.45						

df: درجه آزادی

فراوانی آلل مرتبط با بیماری و ژنوتیپ هموزیگوت مرتبط با بیماری در گروه بیمار و سالم با استفاده از آزمون آماری مربع کای ($p\leq ۰/۰۵$) مقایسه شدند و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه بیمار و کنترل وجود نداشت (جدول ۱).

بررسی‌ها نشان داد که فراوانی‌های ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs2693657 در گروه کنترل ($p=۰/۹۹$)، $p>۰/۰۵$، $df=۲$، $\chi^2=۰/۰۰۱$) و بیماران ($p=۰/۸$)، $p>۰/۰۵$، $df=۲$، $\chi^2=۰/۲۳۲$) در تعادل هاردی واینبرگ بود. فراوانی‌های ژنوتیپی در گروه کنترل و بیمار در نمودار ۲ و جدول ۲ نمایش داده شده است.



نمودار ۲: فراوانی آللی و ژنوتیپی در گروه بیمار و سالم برای پلی‌مورفیسم نوکلیوتیدی rs2693657. نمودار بالا بیانگر توزیع فراوانی ژنوتیپی و نمودار پایین بیانگر توزیع فراوانی آللی بین دو گروه بیمار و کنترل می‌باشد. فراوانی ژنوتیپی و آللی بین دو گروه مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار از نظر آماری نداشت.

فراوانی آلل مرتبط با بیماری و ژنوتیپ هموزیگوت مرتبط با بیماری در گروه بیمار و سالم با استفاده از آزمون آماری مربع کای ($p\leq ۰/۰۵$) مقایسه شدند که اختلاف معنی‌داری نداشت.

بحث

مطالعات مختلف، بیانگر آن است که بیماری MS جزو بیماری‌های پیچیده التهابی و خود ایمنی بوده (۱) و مکانیسم ایجادآن هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۲۰). با توجه به فراوانی روزافزون آن در دنیا (۷ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال) (۲۱) و به ویژه در ایران، مطالعه بیماری و عوامل مستعد کننده ابتلا به آن از اولویت‌های ضروری سیستم درمانی و بهداشتی کشور محسوب می‌شود. بررسی‌های مختلف نشان داده که در ایجاد این بیماری عوامل ژنتیکی و محیطی درگیر هستند (۲۲). اما ماهیت این عوامل علی‌رغم تحقیقات گسترده هنوز به طور کامل شناسایی نشده است (۱).

یکی از مسایل اصلی در درمان بیماری MS امکان ترمیم کامل آسیب ایجاد شده در غشای میلینی نورون‌ها و از سوی دیگر یافتن دلیل پاسخ متفاوت افراد به روش‌های درمانی موجود است. به نظر می‌رسد که دلیل این تفاوت می‌تواند اختلافات ژنتیکی موجود بین افراد مختلف بیمار در ژن‌های ترمیم کننده اسیب به میلین و یا وجود اختلافات مولکولی در ساختمان میلین موجود در سیستم عصبی افراد بیمار باشد. از این رو مطالعه ژن‌های درگیر در ساخت میلین و ترمیم و بازسای آن پس از آسیب می‌تواند به عنوان یکی اهداف مطالعه به منظور یافتن دلایل وقوع بیماری و هم‌چنین یافتن درمان‌های موثر تر برای آن باشد (۸، ۱۰).

میلین‌سازی مجدد در بدن نیازمند تولید موضعی، مهاجرت و بلوغ الیگودندروسیت‌ها ویا ترکیبی از این‌ها است. ناتوانی میلین‌سازی مجدد در مالتیپل اسکلروزیس می‌تواند از نقص هر کدام از این فرایندها یا به واسطه مرگ الیگودندروسیت‌ها باشد. مطالعات قبلی بیانگر آن است که فسفریلاسیون تیروزین یکی از عناصر اصلی در تشکیل میلین، تمایز الیگودندروسیت‌ها و بهبود آسیب‌های دمیلینه شده است (۱۵). به نظر می‌رسد مسیر پیام‌رسانی NRG1-ERBB، یکی از مسیرهای درگیر در تنظیم رشد و تمایز الیگودندروسیت‌ها و در نتیجه میلین‌سازی است.

در این مسیر پروتئین RPTPβ و ERBB4 از طریق پروتئین مرتبط کننده MAGI، یک کمپلکس فسفوتیروزین کیناز/فسفوتیروزین فسفاتاز تشکیل می‌دهند که با تنظیم فسفریلاسیون MAGI در مسیرهای پیام‌رسانی پایین دست آن هماهنگی ایجاد می‌کنند (۱۳، ۱۴). به بیان دیگر پروتئین RPTPβ در مسیر پیام‌رسانی NRG1-ERBB4 به عنوان آنتاگونیست عمل می‌کند.

محصولات ژن PTPRZ1، در سلول‌های گلیایی و جمعیت‌های خاصی از نورون‌ها از تکوین اولیه تا بزرگسالی بیان می‌شوند و در میانکنش‌های سلولی نورون گلیا در پیام‌رسانی دو جهته درگیرهستند که شامل میلین‌سازی و تشکیل گره رانویه از طریق میان‌کنش‌هایی با ملکول‌های چسبنده سلول نورونی است (۲۳). به علاوه این پروتئین‌ها در سلول‌های نیایی گلیال بالغ بیان می‌شوند که نشان می‌دهد PTPRZ1 در این سلول‌ها نیز دارای عملکرد است. مهار بیان PTPRZ1 یا مهار فعالیت RPTPβ در سلول‌های نیایی گلیال بالغ منجر به تمایز این سلول‌ها به الیگودندردوسیت‌های بالغ می‌شود و می‌توان چنین تصور کرد که RPTPβ در حفظ اجداد سلول‌های گلیا در یک وضعیت تمایز نیافته نقش دارد (۱۳). هم‌چنین در مطالعات، مشخص شده است که بیان این ژن در آسیب‌های مالتیپل اسکلروزیس تحریک شده و به صورت ویژه‌ای در الیگودندروسیت‌های میلین‌ساز موجود در اطراف این آسیب‌ها بیان می‌شود. در مطالعه‌ای که روی موش‌های EAE دارای نقص در عملکرد ژن PTPRZ1 صورت گرفت، این موش‌ها نتوانستند آسیب‌های EAE را ترمیم کنند. بنابراین به نظر می‌رسد که عملکرد ژن PTPRZ1 نقشی کلیدی در حیات الیگودندروسیت و بازسازی لایه میلینی توسط این سلول‌ها در نواحی آسیب دیده مغز افراد مبتلا به MSو هم‌چنین در بهبود بیماری دمیلین شونده بر عهده داشته باشد (۱۵).

مطالعات مختلف نشان داده است که برای شناسایی سهم عوامل ژنتیکی در ایجاد بیماری‌های پیچیده و یا به عبارتی برای کشف و شناسایی ژن‌ها یا آلل‌های مستعد کننده ابتلا به یک بیماری پیچیده، روش مطالعه همبستگی یا مطالعه مورد – کنترل (۲۴) نتایج مطمئن‌تر و کامل‌تری را نسبت به مطالعات خانواده‌های مستعد بیماری در پی دارد (۲۵) و به طور عمده بیماری‌های پیچیده از مدل ساده توارث مندلی تبعیت (۲۶، ۲۷)نمی‌کنند.

مسیر پیام‌رسانی NRG1-ERBB در بیماری ناتوانی مغزی اسکیزوفرنیا نیز مورد توجه قرار گرفته است. در واقع میلین‌سازی ناقص می‌تواند به عنوان یکی از عوامل مؤثر در اختلالات ارتباطات نورونی و پایداری نقص در عملکرد سلول‌های عصبی در بیماری اسکیزوفرنیا دخیل باشد (۱۷). به علاوه تغییرات وابسته به سن در بخش سفید مغز، کاهش تعداد الیگودندروسیت‌ها و تغییر بیان ژن‌های میلین‌ساز در افراد مبتلا به اسکیزوفرنیا مشاهده شده است (۱۸، ۱۹). اگرچه اختلالات بخش سفید مغز در این بیماری مانند مالتیپل اسکلروزیس وسیع نیست اما از جهات ذکر شده مشابهاتی را با بیماری‌های دمیلین شونده نشان می‌دهد. پلی‌مورفیسم‌هایی از دو ژن NRG1 و PTPRZ1 ارتباط معنی‌داری را با این بیماری نشان داده‌اند.

به دلیل اینکه بیان ژن PTPRZ1 در آسیب‌های مالتیپل اسکلروزیس تحریک شده و افزایش می‌یابد و با توجه به اینکه موش‌های فاقد این ژن نمی‌توانند آسیب‌های EAE را ترمیم کنند، به نظر می‌رسد که PTPRZ1 در حیات الیگودندروسیت‌ها و بهبود از بیماری‌های دمیلینه شونده نقش داشته باشد (۱۵). به همین دلیل برای انتخاب پلی‌مورفیسم‌های مناسب جهت مطالعه در بیماری MS، از مطالعه‌ای که بیوس‌بایوم و همکارانش برای وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن PTPRZ1 و بیماری اسکیزوفرنیا انجام داده بودند، استفاده شد (۱۳). در این مطالعه SNP 45 از dbSNP و Hap Map انتخاب و در دو فاز بررسی شد. از میان این SNP 45، 7 SNP که روی اینترون قرار دارشتند، ارتباط معنی‌داری با بیماری نشان دادند. برای این مطالعه دو SNP که ارتباط قوی‌تری با این بیماری نشان داده بودند، انتخاب شد. یکی از این SNP ها rs13241278 است که روی اینترون ۶ قرار دارد و SNP دیگر rs2693657 است که روی اینترون ۹ واقع شده است.

در بررسی تفاوت فراوانی آلل مرتبط با بیماری در گروه بیمار و سالم با استفاده از آزمون آماری مربع کای برای rs13241278 (p=۰/۶۴۱) و برای rs2693657 (p=۰/۶۶۹) بود و در بررسی تفاوت فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت مرتبط با بیماری در گروه بیمار و سالم با استفاده از این آزمون برای rs13241278 (p=۰/۳۷) و برای rs2693657 (p=۰/۶۴) بود و این دو پلی‌مورفیسم در جمعیت ایرانی ارتباطی با بیماری مالتیپل اسکلروزیس ندارند.

در سال ۲۰۰۷، مطالعه مشابهی جهت بررسی وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن PTPRZ1 و بیماری اسکیزوفرنیا در جمعیت ژاپنی انجام شد که نتایج ارتباطی بین این ژن و بیماری اسکیزوفرنیا را نشان نداده‌اند (۲۸). با توجه به اینکه در جمعیت‌های متفاوت عوامل ایجاد بیماری‌های پیچیده می‌تواند متفاوت باشد، چنین نتیجه‌ای تعجب برانگیز نیست.

بررسی امکان وجود ارتباط ژن PTPRZ1 و پلی‌مورفیسم‌های آن با بیماری MS برای اولین بار در این مطالعه انجام شده است.

نتیجه‌گیری

تفاوت فراوانی‌های دیده شده در دو گروه، معنی‌دار نبوده و تقریبا فراوانی‌های یکنواختی دارند. بنابراین برای پلی‌مورفیسم‌های مطالعه شده در این گزارش با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت ایران، ارتباطی پیدا نکردیم. البته در خصوص رد یا تایید نقش ژن PTPRZ1 در روند بیماری‌زایی مالتیپل اسکلروزیس به تحقیقات بیشتری نیاز است.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از بیماران و افراد سالم که با اهدای خون خود زمینه انجام این تحقیق را فراهم کردن اعلام می نمایند. این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

References

1. Hafler DA. Multiple sclerosis. J Clin Invest. 2004; 113: 788-794.
2. Debouverie M, Pittion-Vouyovitch S, Louis S, Guillemin F; LORSEP Group. Natural history of multiple sclerosis in a population-based cohort. Eur J Neurol. 2008; 15(9): 916-921.
3. Piaton G, Williams A, Seilhean D, Lubetzki C. Remyelination in multiple sclerosis. Prog Brain Res. 2009; 175: 453-464.
4. World Health Organization, Atlas multiple sclerosis resources in the world, 2008; 53.

5. Bashir K, whitaker JN. Hand book of Multiple Sclerosis. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001; 191-207.
6. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2004; 3(2): 104-110.
7. Chari DM. Remyelination in multiple sclerosis. Int Rev Neurobiol. 2007; 79: 589-620.
8. Taveggia C, Feltri ML, Wrabetz L. Signals to promote myelin formation and repair. Nat Rev Neurol. 2010; 6: 276-287.
9. Buonanno A, Fischbach GD. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. Curr Opin Neurobiol. 2001; 11: 287-296.
10. Fancy SP, Kotter MR, Harrington EP, Huang JK, Zhao C, Rowitch DH, et al. Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders. Exp Neurol. 2010; 225(1): 18-23.
11. Bozzali M, Wrabetz L. Axonal Signals and Oligodendrocyte Differentiation. Neurochem Res. 2004; 29(5): 979-988.
12. Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Brinkmann C, et al. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath tickness. Science. 2004; 304(5671): 700-703.
13. Buxbaum JD, Georgieva L, Young JJ, Plescia C, Kajiwara Y, Jiang Y, et al. Molecular dissection of NRG1-ERBB4 signaling implicates PTPRZ1 as a potential schizophrenia susceptibility gene. Mol Psychiatry. 2008; 13: 162-172.
14. Adamsky K, Arnold K, Sabanay H, Peles E. Junctional protein MAGI-3 interacts with receptor tyrosine phosphatase beta (RPTP beta) and tyrosine-phosphorylated proteins. J Cell Sci. 2003; 116(Pt 7): 1279-1289.
15. Faissner A, Heck N, Dobbertin A, Garwood J. DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. Adv Exp Med Biol. 2006; 557: 25-53.
16. Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J ,Lafaille J, Chao M, et al. A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. Nat Genet 2002; 32: 411-414.
17. Flynn SW, Lang DJ, Mackay AL, Goghari V, Vavasour IM, Whittall KP, et al. Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and postmortem with analysis of oligodendrocyte proteins. Mol Psychiatry. 2003; 8: 811-820.
18. Davis KL, Stewart DG, Friedman JI, Buchsbaum M, Harvey PD, Hof PR, et al. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. Arch Gen Psychiatry. 2003; 60(5): 443-456.
19. Haroutunian V, Davis KL. Introduction to the special section: Myelin and oligodendrocyte abnormalities in schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol. 2007; 10(4): 499-502.
20. Hosseini Salekdeh Gh, Sanati M H, Shahzadeh Fazeli A, Nasrabadi D, Pouya A, Baharvand H. Central nervous system proteomics in animal model of multiple sclerosis revealed down-regulation of mithochondrial proteins. Yakhteh. 2009; 11(2): 236-243.
21. Kremenchutzky M, Rice GP, Baskerville J, Wingerchuk DM, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. Brain. 2006; 129(Pt 3): 584-594.
22. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. Ann Neurol. 2007; 61(4): 288-299.
23. Revest JM, Faivre-Sarrailh C, Maeda N, Noda M, Schachner M, Rougon G. The interaction between F3 immunoglobulin domains, and protein tyrosine phosphatases zeta/beta triggers bidirectional signaling between neurons and glial cells. Eur J Neurosci. 1999; 11(4): 1134-1147.
24. Potter JD. At the interfaces of epidemiology, genetics and genomics. Nat Rev Genet. 2001; 2(2): 142-147.
25. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. Science. 1996; 273(5281): 1516-1517.
26. Risch NJ. Searching for genetic determinants on the new millennium. Nature. 2000; 405(6788): 847-856.
27. Rothman N, Wacholder S, Caporaso NE, Garcia-Closas M, Buetow K, Fraumeni JF Jr. The use of common genetic polymorphisms to enhance the epidemiologic study of environmental carcinogens. Biochim Biophys Acta. 2001; 1471(2): C1-10.
28. Ito Y, Yamada S, Takahashi N, Saito S, Yoshimi A, Inada T, et al. No association between the protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1 (PTPRZ1) Gene and schizophrenia in the Japanese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008; 147B(7): 1013-1018.