مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۹، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۰
صفحه: ۵۱۰-۵۰۱

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 19, No. 4, Sep-Oct 2011
Pages: 501-510

بررسی پلی مورفیسم ژن رسپتور اینترلوکین VII در بیماران مبتلا به ام اس

مژگان احمدزاده‌راجی*[۱]، علیرضا خسروی[۲]، محمد حسین‌صنعتی[۳]، رضا حاجی‌حسینی[۴]، احمد ابراهیمی[۵]، سیدمسعود نبوی[۶]

۱- دانشجوی دکترای نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران
۲- استاد گروه قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۳- دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
۴- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران
۵- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات ژنومیک و بیوتکنولوژی انسانی کوثر
۶- دانشیارگروه نورولوژی، دانشگاه شاهد تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۵

چکیده

مقدمه: مولتیل اسکلروزیس یکی از بیماری‌های مزمن سیستم اعصاب مرکزی است، این بیماری در میان جوانان و زنان بیشتر بروز می‌کند و منجر به بروز علایمی عصبی می‌گردد. اینترلوکین-۷ گلیکوپروتئین ۲۵ کیلو دالتونی است که در تنظیم خونسازی ولنفوپواز دخالت دارد با توجه به اینکه ژن گیرنده اینترلوکین-۷ به عنوان یک ژن مرتبط با بیماری ام اس شناخته شده است، هدف این پژوهش بررسی پلی مورفیسم این ژن و مطالعه چند ریختی های تک نوکلئوتیدی آن می باشد.

روش بررسی: از ۶۰ نفر بیمار و ۶۰ نفر افراد ظاهراً نرمال که موردی از ام اس در سابقه فامیلی نداشتند(گروه کنترل)، نمونه خون تهیه گردید و پس از استخراج DNA و کیفیت سنجی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای نواحی اگزونی ۴ و ناحیه پروموتر، توسط روش PCR، تکثیر صورت گرفت و درحضور نمونه‌های کنترل، غربالگری اولیه با روش SSCP انجام گردید و الگوهای متفاوت با نمونه کنترل، جهت تعیین توالی ارسال گردیدند.

نتایج: در ناحیه اگزون ۴، نیز دو تغییر مشاهده شد. اولین تغییر در جایگاه ۱۶۵ پروتئین(P. H165H) و تغییر دیگر در ناحیه ۱۳۸ پروتئین قرار داد(P.V138I). این تغییر با شماره دسترسی FR86358 در انستیتو بیوانفورماتیک اروپا ثبت گردید.

نتیجه‌گیری: مطالعات جمعیتی و مقایسه با جمعیت‌های مرجع مشابهت‌هایی با جمعیت اروپایی و آسیایی را در بعضی از SNPها نشان داد. پس از انجام مطالعات تکمیلی بر روی گروه شاهد و مطالعه پلی مورفیسم در جمعیت بزرگتری از بیماران ایرانی، به نظر می‌رسد استفاده از آنها به عنوان یک بیومارکر، در تشخیص زود هنگام بیماری ام اس، مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: SSCP، SNP، Blast، تعیین توالی، رسپتوراینترلوکین ۷، پلی مورفیسم، مالتیپل اسکلروزیس

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۶۷۹۲۱۸، پست الکترونیکی: m_ahmadzadeh@ut.ac.ir:

مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس(Multiple Sclerosis) اولین بار در سال ۱۸۶۸ میلادی توسط J Charcot پروفسوردانشگاه پاریس که او را پدرعلم نورولوژی می‌نامند، توصیف شد(۱). پس از وی، اوگن دویس(۱۹۳۰-۱۸۵۸)، جوزف بالو(۱۹۷۹-۱۸۹۵) و پاول فردیناند شیلدر(۱۹۴۰-۱۸۸۶) نیز مواردی از بیماری را توصیف کردند. این بیماری در سال ۱۹۵۵ به نام مولتیپل اسکلروز نامگذاری شد(۲). در بیماری ام اس، سلول‌های سازنده میلین و خود میلین آسیب می بینند. آسیب دیدن میلین منجر به ایجاد آسیب در رشته عصبی زیرین گردیده که به آن آسیب آکسونی گویند. سن شروع بیماری به طور تیپیک بین ۴۰-۲۰ سالگی است. به طور نادر ممکن است بیماری حتی در سن ۲ سالگی یا در دهه هشتم زندگی نیز روی دهد. این بیماری بیشتر در جمعیت جوان دیده می‌شود(۳). در دهه آخر قرن ۱۹ پزشکان دریافتند که ام اس بیماری ویژه‌ای است که در میان زنان بیش از مردان شایع بوده و جمعیت زنان ۲ تا ۳ برابر جمعیت مردان به این بیماری مبتلا می‌شوند(۵،۴).

سه ویژگی اصلی ام اس، التهاب، میلین زدایی و گلیوز(اسکارگذاری) است. ضایعات ام اس به طور تیپیک از نظر زمانی و موقعیت منتشر می‌باشند(۲).

چهار نوع بالینی از ام اس شرح داده شده‌اند:

۱- ام اس عودکننده- فروکش‌کننده: (RRMS: Relapsing- Remitting MS)

۲- ام اس پیشرونده ثانویه: (SPMS: Secondry Progressive MS)

۳- ام اس پیشرونده اولیه: (PPMS: Primary Progressive MS)

۴- ام اس پیشرونده عودکننده: (PRMS: Progressive Relapsing MS)(۶).

برخی از مهمترین بررسی‌های ارتباط و پیوستگی در زمینه بیماری ام اس بر کمپلکس اصلی سازگاری نسجی :(MHC Major Histocompatibility Complex) متمرکز شده است(۷). طبق بررسی‌های انجام شده توسط Sawcer و همکاران در ۱۹۹۶ مشخص شده است که ناحیه MHC با بیماری ام اس ارتباط دارد، که این ناحیه بر روی کروموزوم ۶P۲۱ قرار دارد(۷). نتایج بررسی‌هایی که توسط Hafler گروهی از پژوهشگران در سال ۲۰۰۷ انجام شده و در New England Journal به چاپ رسیده است، نشان داده است که مطالعات پیوستگی فاقد قدرت آماری جهت تشخیص لوکوس‌های موجود در خارج از ناحیه MHC است، اما مطالعات ارتباط، قدرت آماری قویتری از مطالعات پیوستگی در تشخیص نقاط پرخطر و مرتبط با این بیماری دارد. بررسی‌های ارتباط وسیع ژنوم(Genome wide association analysis)، کل ژنوم را اسکن کرده و لوکوس‌های مستعد را در خارج از ناحیه MHC تشخیص می‌دهد(۸). ناحیه دیگری بر روی ژنوم که جزء عوامل خطرزا برای این بیماری محسوب می‌شود، ناحیه HLA(Human Leukocyte Antigen) است که بر روی کروموزوم ۶P۲۱ قرار دارد. این ناحیه خارج از ناحیه MHC است(۹). طبق مطالعات هافلر و همکاران(۲۰۰۷)، به اثبات رسیده است که سایر نواحی خارج از ناحیه MHC، به خصوص ناحیه گیرنده اینترکولین ۷ و گیرنده اینترکولین ۲ نیز جزء آلل‌های خطرزا و مرتبط با بیماری ام اس می‌باشند(۸). علاوه بر MHC، شواهدی قوی بر درگیری ناحیه اطراف ژن آپولپوپروتئین E که بر روی کروموزوم ۱۹q۱۳ قرار دارد و ارتباط آن با بیماری ام اس موجود می‌باشد. پلی‌مورفیسم آپولپوپروتیئن E در بسیاری از بیماری‌های عصبی مؤثر است و اثرات متفاوت روی سیستم ایمنی و ترمیم CNS دارد(۱۱،۱۰). مطالعات ارتباط انجام شده در اروپای شمالی، آمریکا و بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز آمریکایی با نژاد سیاه یک ارتباط مثبت بین این بیماری و ژن‌های HLA-DR2 و DQ6 را نشان داده است(۱۲).

Gregory و همکاران ارتباط مشخصی بین این بیماری و چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP: Single Nucleotide Polymorphisms)، [موقعیت‌هایی در توالی DNA هستند که در گذشته جهشی در آنها رخ داده است(۱۳).] که منجر به تبدیل باز تیمین به سیتوزین می‌گردد و در دمین بین

غشایی(Trans membrane) ژن گیرنده اینترلوکین۷ قرار دارد، پیدا کردند. این چند ریختی تک نوکلئوتیدی با rs 6897932 منجر به تغییر آمینو اسیدی و جایگزینی ایزولوسین به جای ترئونین می‌گردد. این تغییر استعداد و حساسیت برای بیماری ام اس ایجاد می‌کند(۱۴). اینترلوکین ۷ گلیکوپروتئین ۲۵ کیلو دالتونی است که در تنظیم خونسازی ولنفوپواز دخالت دارد و عملکرد آن روی رده‌های سلول‌های لنفوئیدی می‌باشد(۱۵). این گلیکوپروتئین یک فاکتور ضروری بقاء برای لنفوسیت‌هاست(۱۶).

گیرنده اینترلوکین۷ بخشی از خانواده گیرنده سایتوکاینی نوع I است، تعیین نقشه ژن IL-7R توسط Lynch و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام شد و مشخص شد این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم ۵ (۱۳ p ۵) قراردارد. Lundmark و همکاران و Sreeram و همکاران مدارکی را ارائه دادند مبنی بر اینکه این لوکوس با مولتیپل اسکلروزیس ارتباط دارد و این ژن به عنوان ژن مرتبط با این بیماری انتخاب شده است(۱۷،۱۴) که اندازه این ژن در انسان Kbp ۱۹است و واجد هشت اگزون می‌باشد(۱۸). گیرندهIL-7R شامل زنجیره آلفا(α) و زنجیره گاما(γ) مشترک سایتوکاین است(۱۶). در بررسی‌هایی که روی جمعیت‌های بیماران ام اس در اسکاندیناوی، آمریکا و انگلستان انجام شده تائید شده است که زنجیره α رسپتوراینترلوکین ۷ به عنوان دومین ژنی است که بدون هر گونه ابهام مشخصاً بعد از ژن HLA– DRB 1501 با بیماری ام اس ارتباط دارد(۱۹). در این تحقیق از دو روش SSCP و تعیین توالی برای بررسی چند ریختی‌های ژن گیرنده اینترلوکین ۷ استفاده شد.

Lundmark و همکاران در بین ۱۲۱۰ بیمار مبتلا به ام اس از کشورهای شمال اروپا، ارتباطی بین بیماری و تعدادی از چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی ژن را پیدا کردند. این چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی با rs 6897932، rs 6871748، rs 2303137 مشخص گردیدند(۱۴).

در یک بررسی وسیع ژنی در مطالعات ارتباط، جمعی از خانواده‌هایی که ۳ نفر از آنها مبتلا به بیماری بودند به همراه گروه کنترل ، توسط کنسرسیوم بین‌المللی ژنتیک ام اس به منظور مطالعات ارتباط، مورد بررسی قرار گرفتند و ارتباط rs 6897932 که در اگزون۶ قرار دارد، با این بیماری به طور مشخص تایید گردید.(۲۱،۲۰)

O' Dohery و همکاران درسال ۲۰۰۸، دو جمعیت بیمار و کنترل غیر وابسته را از ایالت‌های Olmosted، Minnesota, Belfast و ایرلند شمالی به ترتیب با ۲۰۸ بیمار و ۴۱۳ کنترل، ۴۶۳ بیمار و ۵۳۲ کنترل بررسی کردند که در این مطالعات ارتباط آلل c rs 6897932، با بیماری ام اس در ایالت Olmast مورد تایید قرار گرفت ولی در گروه مورد مطالعه در بلفاست، ارتباطی با بیماری نشان داده نشد(۲۱،۲۰،۱۴،۸). Gregory و همکاران او در تکمیل کار تحقیقاتی خود، در سال ۲۰۱۱، چند ریختی تک نوکلئوتیدی rs6897932 بر روی اگزون ۶ این ژن را در چهار خانواده غیر وابسته و گروه کنترل مورد بررسی قرار دادند و آن را به عنوان یک فاکتور خطر مهم و قابل توجه ذکر کردند که اثر عملگرا بر روی بیان ژن دارد(۲۰). همچنین Sombekke و همکاران به این نتیجه رسیدند که در جمعیت آلمانی آلل‌هایی که در این SNP به صورت هموزیگوت C نمایان می‌شوند، بیشتر در خطر ابتلا به این بیماری هستند و اثری از بیان RNA پیک، بر روی فنوتیپ بیماری پیدا نکردند(۲۲).

هدف از این مطالعه فراهم کردن بستری برای بررسی ارتباط ژن زنجیره آلفای گیرنده اینترلوکین ۷ با بیماری ام اس بود. گام اول در این هدف، بررسی وضعیت چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی این ژن است که با توجه به تعداد اگزون‌های این ژن، دو بخش از آن در این مقاله مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در گروه بیمار ۶۰ مراجعه کننده با علایم مشخص بیماری در این تحقیق شرکت کردند. گروه کنترل نیز ۶۰ نفر با جنسیت و سن مشابه افراد بیمار، بدون هیچگونه علایمی از این بیماری بودند.

خون افراد گروه بیمار و کنترل در لوله‌های Venoject کمپانی Grainer/UK که حاوی EDTA(Ethylenediaminetetraacetic Acid) بود، جمع‌آوری گردید. پس از انتقال خون حاوی EDTA به آزمایشگاه، با استفاده از کیت MBST/ Iran، DNA

بر اساس روش کار کیت استخراج گردید. میانگین غلظت DNA استخراج شده ۳۲/۶ mg/ml بود. به منظور تکثیر قطعات پروموتر و اگزون ۴، در ابتدا پرایمرهای ویژه‌ای که توسط Teutsch و همکاران استفاده شده بود(۲۳) مد نظر قرار گرفت و توسط بیوانفورماتیک و Blast(Basic Local Alignment System Tools) پرایمرها باژن IL-7Rα، از صحت عملکرد پرایمرها اطمینان حاصل شد و هر ۲ جفت پرایمر با ژن IL-7Rα، align شدند.

نتایج Blast ناحیه پروموتر نمایانگر این است که این قطعه در ناحیه ۱۶۸۱ تا ۲۱۰۱ ژن قرار دارد و یک قطعه ۴۲۰ جفت بازی تکثیر می‌شود. به دلیل زیاد بودن اندازه قطعه پروموتر، کلیه نمونه‌های این ناحیه از ژن با روش تعیین توالی بررسی شدند. قطعه حاصل از تکثیر اگزون ۴، ۲۸۳ جفت باز است که در ناحیه ۱۶۳۵۶- ۱۶۰۷۳ ژن قراردارد. این قطعات با استفاده از premix شرکت سیناژن تکثیر شدند که شامل Units/ml ۰/۲ آنزیم تک دی.ان.اِ پلیمراز در بافر PCR با Mgcl2۳mM و ۰/۴ mM dNTP در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با شرایط دمایی زیراست:

واسرشتگی اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴°C انجام شد. شرایط واسرشتگی برای ۳۰ چرخه، ۹۴°C به مدت ۲۰ ثانیه و دمای اتصال پرایمرها(برای ناحیه پروموتر۵۳°C و ناحیه اگزون ۴، ۵۸/۴°C) ۱۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه بود. تکثیر نهایی نیز در همین دما به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش PCR با استفاده از الکتروفورز آگارز از اندازه قطعه تکثیر شده در مقایسه با مارکر ۱۰۰bp شرکت Fermentas اطمینان حاصل گردید.

در مرحله بعد نمونه‌ها برای انجام Single Strand Conformation Polymorphism(SSCP) آماده شدند. بدین طریق که محصول PCR به نسبت حجمی مساوی با محلول بارگذاری شدهSSCP مخلوط شده و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد با روش تفکیک فیزیکی، دو رشته DNA از هم جدا گشته و سپس نمونه‌ها بر روی ژل آکریل آمید ۸٪(ساخته شده با روش Biorad) بارگذاری شدند.

زمان در بارگذاری نمونه‌ها اهمیت به سزایی دارد و باید سریع بارگذاری انجام شود تا از تشکیل دو رشته ای جلوگیری به عمل آید. پس از الکتروفورز، ژل با روش رنگ آمیزی نیترات نقره رنگ آمیزی گردید.

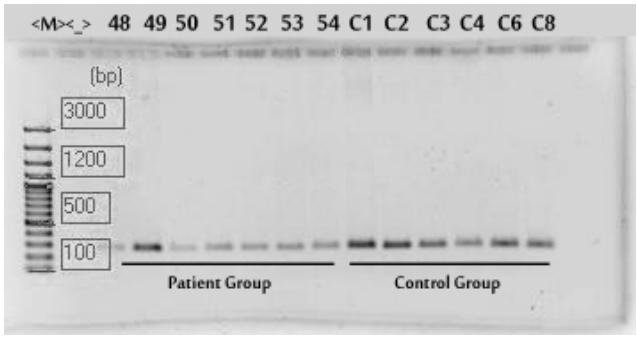
با توجه به تک رشته بودن نمونه‌ها در SSCP و حرکت متفاوت تک رشته‌ای‌ها، الگوی حرکت بعضی از نمونه‌ها مشابه با کنترل و بعضی متفاوت با کنترل در ژل بود. پس از انتخاب نمونه‌های بیمارانی که الگوی متفاوتی با نمونه کنترل در روش SSCP نشان دادند، نمونه‌های مذکور برای تعیین توالی ارسال شدند. در این مرحله تخلیص محصولات PCR به روش Clean up و تعیین توالی توسط دستگاه ABI 3730XL انجام شد.

نتایج

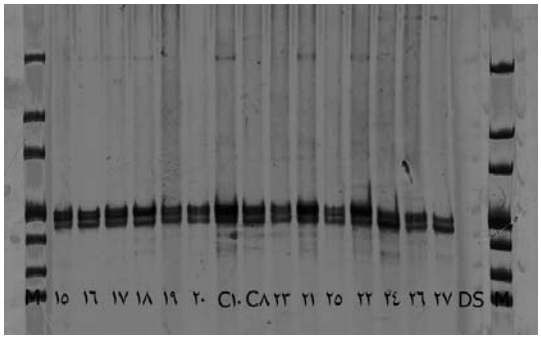
از افراد مبتلا به ام اس تعداد ۶۰ نفر با پرونده پزشکی مورد تائید نورولوژیست با رضایت کامل در این طرح پژوهشی مشارکت کردند. نمونه‌های جمع‌آوری شده ۲۳/۴٪ مرد و ۷۶/۶٪ زن می‌باشند. میانگین سنی بیماران ۳۴/۴ سال و میانگین مدت زمان ابتلا به بیماری سه سال بود. اکثر بیماران (حدود ۸۳/۳۳٪) مبتلا به ام اس نوع Relapsing/Remitting(RR) بودند. میانگین Expanded Disability Status Scale(EDSS) بیماران صفر تا شش می‌باشد. در این تحقیق گروه کنترل، در نواحی ژن مورد نظر(پروموتر و اگزون۴)، فقط در تکنیک SSCP در مقایسه الگوهای DNA تک رشته بیماران و افراد سالم مورد بررسی قرار گرفتند و تنها معدودی از نمونه‌های کنترل برای تعیین توالی ارسال گردیدند.

در بررسی ناحیه اگزون ۴ ژن زنجیره آلفا گیرنده اینترلوکین ۷، نتایج زیر به دست آمد. در تصویر ۱ اندازه قطعه تکثیر شده ناحیه اگزون ۴ در مقایسه با مارکر نشان داده شده است. در تصویر ۲، ژل ۸ درصد SSCP ناحیه اگزون۴ و تفاوت نمونه‌ها با گروه کنترل مشخص می‌باشد.

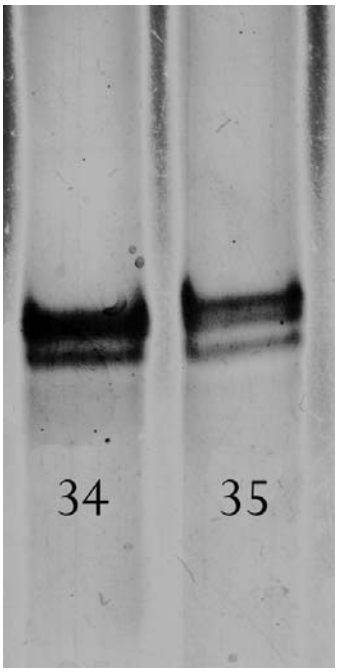
مقایسه نمونه‌های ژل، تفاوت الگوی حرکت الکتروفورتیک را نشان داد که در تصویر ۳ نشان داده شده است.



تصویر ۱: قطعه ۲۸۳ جفت بازی اگزون ۴ در نمونه‌های بیمار و کنترل



تصویر ۲: ژل SSCP ۸ ٪ الگوهای متفاوت در اگزون ۴ را نشان می دهد.



تصویر ۳: الگوی الکتروفورتیک بیمار شماره ۳۴ و ۳۵ در ناحیه اگزون ۴

با استفاده از سایت SNP Check کلیه چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی نواحی مورد نظر ژن مشخص گردید. که با شماره‌های rs71617734. در ناحیه پروموتر rs1494558 و rs149455 در ناحیه اگزون۴ مشخص شدند، سپس با استفاده از نتایج تعیین توالی فرکانس آللی و درصد ژنوتیپی هر ناحیه محاسبه شد.

به منظور بررسی درصد ژنوتیپی و فرکانس آللی rsهای موجود در نواحی مختلف ژن با توجه به نمونه‌هایی که تعیین توالی شده‌اند، جداول(۱ تا ۳) تهیه شد که با جزئیات مربوط به تعداد ژنوتیپ‌ها ارائه شده است. در ناحیه پروموتر تنها چند ریختی تک نوکلئوتیدی که در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد با rs71617734 به صورت هموزیگوت TT می‌باشد. جدول ۱، فرکانس آللی و درصد فنوتیپی را در ناحیه اگزون ۴ نشان می‌دهد. در مقایسه توالی‌ها با plot، کلیه SNPهای موجود در plot در داخل توالی‌ها نیز مشاهده شد.

برای پیدا کردن تغییرات صورت گرفته در نواحی مورد نظر ژن IL– 7Rα، هر یک از توالی‌های به دست آمده در بیماران با

ژنIL – 7Rα، Blast گردید. در این حالت جایگاهی که در آن نوکلئوتید موجود در توالی نمونه با نوکلئوتید موجود در توالی اصلی تفاوت نشان می‌داد، به صورت رنگی مشخص شد.

پس از هم ترازکردن توالی ناحیه اگزون ۴ در نمونه‌ها، با توالی ژن IL – 7Rα دو تغییر در اگزون ۴، مشاهده شد. اولین تغییر منجر به تغییر آمینو اسیدی نمی‌گردد. در این حالت باز گوانین به جای آدنین قرار گرفته است ولی همچنان آمینواسید هیستیدین را به رمز در می‌آورد و این تغییر در جایگاه ۱۶۵ پروتئین قرار دارد. P. H165H تغییر دیگر در ناحیه ۱۳۸ پروتئین است که آمینو اسید ایزولوسین به جای آمینو اسید والین قرار می‌گیرد. P.V138I(۲۴،۲۵). این تغییر با شماره دسترسی FR863588 (Homo sapiens partial IL7R gene for interleukin-7 receptor, patient Rj11, exon 4) در سایت انستیتو بیوانفورماتیک اروپا، به نام نویسنده مسئول این مقاله و همکاران ثبت گردیده است(۲۶).

جداول مربوط به مطالعات جمعیتی چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی مشاهده شده در نواحی مورد بررسی و مقایسه فرکانس آللی و درصد هتروزیگوتی آنها با سایر جمعیت‌هایی که در NCBI(National Centre of Biotechnology Information) موجود هستند و در مطالعات جمعیتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، به شرح زیر است(جداول ۱-۳).

جدول ۱: فرکانس آللی و درصد هتروزیگوسیتی ناحیه اگزون ۴ گروه بیمار

IL7-R	**rs1494555**			**فرکانس آللی**	
اگزون۴	GG	AG	AA	G	A
تعداد	۱۶	۲۴	۲۰	۵۶	۶۴
٪	۲۷	۴۰	۳۳	۴۶/۶۶	۵۳/۳۳
IL7-R		rs2228141		فرکانس آللی	
اگزون۴	CC	CT	TT	C	T
تعداد	44	۱۳	۳	۱۰۱	۱۹
٪	۷۳/۳۳	۲۲	۵	۸۴/۱۶	۱۵/۸۳

جدول ۲: مطالعه جمعیتی rs2228141 و مقایسه فرکانس آللی جمعیت‌های مختلف در ناحیه اگزون۴ ژن گیرنده اینترلوکین ۷(۲۳)

				ژنوتیپ			**آلل‌ها**	
جمعیت مورد مطالعه	شاخص گروه مورد بررسی	تعداد کروموزوم نمونه ها	C/C	C/T	T/T	HWP	C	T
جمعیت ایرانی مورد بررسی در این پژوهش	گروه بیمار	۱۲۰	۰/۷۳۳	۰/۲۲۰	۰/۵۰۰		۰/۸۴۱	۰/۱۵۸
PGA-EUROPEAN-PANEL	نژاد اروپایی	۴۶	۰/۷۸۳	۰/۱۳۰	۰/۰۸۷	۰/۰۲۰	۰/۸۴۸	۰/۱۵۲
جمعیت اروپایی مورد مطالعه								
HSP_GENO_PANEL		۱۱۴	۰/۶۸۴	۰/۳۱۶		۰/۲۰۰	۰/۸۴۲	۰/۱۵۸
کلکسیون جمعیتی در NCBI								

جدول ۳: مطالعه جمعیتی rs1494555 و مقایسه فرکانس آللی جمعیت‌های مختلف(۲۵)

جمعیت مورد مطالعه	شاخص گروه مورد بررسی	تعداد کروموزوم نمونه ها	ژنوتیپ C/C	C/T	T/T	HWP	آلل‌ها C	T
جمعیت ایرانی مورد بررسی در این پژوهش	گروه بیمار	۱۲۰	۰/۲۷۰	۰/۴۰۰	۰/۳۳۰		۰/۴۶۶	۰/۵۳۳
جمعیت بررسی شده ساکن در اطراف اقیانوس آرام		۴۸	۰/۲۵۰	۰/۴۱۷	۰/۳۳۳	۰/۴۳۹	۰/۴۵۸	۰/۵۴۲
HapMap-HCB	نژاد آسیایی	۹۰	۰/۲۲۲	۰/۴۶۷	۰/۳۱۱		۰/۴۵۶	۰/۵۴۴
اطلاعات موجود در پروژه ژنوم انسان								
HapMap-HCB	نژاد آسایی	۹۰	۰/۲۲۲	۰/۴۶۷	۰/۳۱۱	۰/۷۵۲	۰/۴۵۶	۰/۵۴۴

نتیجه‌گیری

با توجه به وجود چند ریختی در جمعیت مورد مطالعه و تحقیقات محققین متفاوت، به نظر می‌رسد این چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی در اگزون‌های مختلف این ژن، می‌توانند به عنوان عوامل خطرزای مهم در جمعیت‌ها تلقی گردند و دانستن نحوه ارتباط آنها با بیماری ام اس، گامی در تشخیص زود هنگام بیماری محسوب می‌گردد. Gregory و همکاران(۲۰) نشان دادند که هموزیگوت بودن SNP rs6897932 در اگزون ۶ می‌تواند خطر ابتلا به این بیماری را بالا ببرد. بر این اساس دانستن هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن آلل‌ها در خانواده‌های وابسته و غیر وابسته مبتلا به این بیماری، امری ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، الگوی الکتروفورتیک SSCP در بعضی از بیماران با یکدیگر تفاوت دارد، به عنوان مثال در ناحیه اگزون ۴ تفاوتی بین بیماران مشاهده گردید. در نمونه شماره ۳۴ در SNP 1494555، آلل‌ها به صورت هتروزیگوت AG و در نمونه شماره ۳۵ با ژنوتیپ GG و هموزیگوت با یکدیگر اختلاف داشتند(شکل ۳).

در ناحیه پروموتر چند ریختی تک نوکلئوتیدی شماره rs71617734 تغییری نشان نداد و در نتیجه هتروزیگوتی و تنوع آللی ندارد و برای مطالعه جمعیتی مناسب نیستند. هر چند ریختی تک نوکلئوتیدی که هتروزیگوسیتی بالاتر و فرکانس آللی بالاتری دارد برای مطالعه جمعیتی اهمیت بیشتری دارد. با توجه به اینکه آلل اجدادی این چند ریختی تک نوکلئوتیدی مشخص نشده و مطالعه جمعیتی صورت نگرفته، در جمعیت بیمار مورد بررسی ما هموزیگوت بود و فرکانس آللی ژنوتیپ TT، ۱۰۰ می‌باشد. در صورت تغییر یا مشاهده هتروزیگوسیتی در جمعیت کنترل، احتمال دارد این چند ریختی تک نوکلئوتیدی به عنوان یک مارکر مناسب مولکولی که با بیماری ام اس ارتباط نشان می‌دهد، در بررسی‌های جمعیتی مورد استفاده قرار گیرد. قابل توجه است که تا ۱۰۰ جفت باز در هر دو طرف این چند ریختی تک نوکلئوتیدی نیز، چند ریختی تک نوکلئوتیدی دیگری گزارش نشده است.

در مورد تغییرات مشاهده شده در ناحیه اگزون ۴، موجود در بانک EMBL(FR863588)(۲۶) از نظر بیماری‌زایی چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی، اطلاعی در دست نیست. بررسی تغییرات مشاهده شده در این ناحیه از ژن در مقایسه با ژن مرجع در NCBI تفاوت نشان می‌دهد. در اگزون ۴، فرکانس آللی و درصد فنوتیپی جمعیت مورد مطالعه در این بررسی، با

سایر جمعیت‌های مطالعه شده که اطلاعات آنها موجود است، مقایسه گردید و مطابق جدول ۲، با جمعیت HSP GENO PANEL و جمعیت اروپایی PGA-EUROPEAN PANEL مشابهت کامل داشت. در جدول ۳ مربوط به rs1494555 اگزون ۴، در گروه بیمار، فرکانس آللی جمعیت ما با جمعیت PAC1 و جمعیت آسیایی Hap Map-HCB مشابهت نشان داد(۲۴،۲۵).

منابع:

1- Charcot J. ***Histologie de la sclerose en plaques***. Paris: Imprimerie L. Poupart- davyl; 1868.p. 554-5.

2- Compston A, Coles A. ***Multiple sclerosis***. Lancet 2008; 372(9648): 1502-17.

3- Hammond SR, English DR, McLeod JG. ***The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia***. Brain 2000; 123(Pt 5): 968-74.

4- Murray TJ. ***Multiple sclerosis: the history of a disease***. Demos Health; 2005.p. 6-24.

5- Stuve O, Oksenberg J. ***Multiple sclerosis overview.*** In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephans K, editors. Gene reviews[Internet]. Seattle(WA). University of Washington, Seattle; 1993-2006.

6- Multiple Sclerosis Society of Canada. ***Types of MS***[document on the Internet]; [cited 2010]. Available from: http://mssociety.ca/en/information/types. htm

7- Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, et al. ***A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome6p21 and 17q22.*** Nat Genet 1996; 13(4): 464-8.

8- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander E, Daly MJ. ***Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study.*** N Engl J Med 2007; 357(9): 851-62.

9- Kantarcia O, Wingerchuk D. ***Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights.*** Curr Opin Neurol 2006; 19(3): 248-54.

10- Hadavi V, Sanati MH, Farhod DD, Hushmand M, Hashemzadeh Chaleshtori M, et al. ***Association of apolipoprotein e polymorphism of multiple sclerosis.*** Iranian J Biotech 2004; 2: 49-54.

11- Hadavi V, Farhud DD, Sanati MH, Hushmand M, Nabavi SM, Seyedian M, et al. ***Polymorphism of apolipoprotein E: association with susceptibility and severity of multiple sclerosis.*** The American Society of Human Genetics 54th Annual Meeting 2004. Oct 26-30; Toronto, Canada.

12- Ghabaee M, Bayati A, Amri Saroukolaei Sh, Sahraian MA, Sanaati MH, Karimi P, et al. ***Analysis of HLA DR2&DQ6(DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602) haplotypes in iranian patients with multiple sclerosis***. Cell Mol Neurobiol 2009 29(1): 109-14.

13- Mahdor GH, Ahrabian H, Sadeghi M, Nozari A. ***Selection of specific SNPs with genetic algorithm.*** The 5th National Biotechnology Congress of Iran 2007. Nov; Tehran; Iran.

14- Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M, et al. ***Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis.*** Nature Genet 2007; 39(9): 1108-13.

15- Fry TJ, Mackall CL. ***The many faces of il-7: from lymphopoiesis to peripheral t cell maintenance.*** J Immunol 2005; 174(11): 6571-6.

16- Morrone G, Bond HM, Cuomo C, Agosti V, Petrella A, Pagnano AM, et al. ***Differential regulation of the expression of interleukin-2 receptor y-chain during the in vitro differentiation of human myeloid cells.*** Biochem J 1995; 308(Pt 3): 909-14.

17- Sreeram V, Ramagopalan MA, Carl A, Dessa Sadovnick A, Ebers GC. ***Genomewide study of multiple sclerosis***. N Engl J Med 2007; 357: 21.

18- Pleiman CM, Gimpel SD, Park LS, Harada H, Taniguchi T, Ziegler SF. ***Organization of the Murine and Interferon-Inducible Promoter.*** Mol Cell Biol 1991; 11(6): 3052-59.

19- McKay FC, Swain LI, Schibeci SD, Rubio JP, Kilpatrick TJ, Heard RN, et al. ***Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis.*** Genes Immun 2008; 9(11): 1-6.

20- Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, ***Interleukin 7 receptor alpha chain(IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis.*** Nature Genet 2007; 39(9): 1083-91.

21- O'Doherty C, Kantarci O, Vandenbroeck K. ***IL-7Rα polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. N*** Engl J Med 2008; 358: 753-4.

22- Sombekke MH, van der Voort LF, Kragt KJ, Nielsen JM, GuzelH, Visser A, et al. ***Relevance of IL7R genotype and mRNA expression in Dutch patients with multiple sclerosis.*** Mult Scler 2011; 17(8): 922-30.

23- Teutsch SM, Booth DR, Bennetts BH, Heard RNS, Stewart GJ. ***Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor gene and their association with multiple sclerosis.*** Eur J Hum Genet 2003;11(7): 509-15.

24- Single Nucleotide Polymorphism. ***National Center for Biotechnology Information***. U.S. National Library of Medicine, Accession Number: 2228141. Available from: ncbi.nlm.nih.gov/snp.

25- Single Nucleotide Polymorphism. ***National Center for Biotechnology Information***. U.S. National Library of Medicine, Accession Number: 1494555. Available from: ncbi.nlm.nih.gov/snp.

26- Ahmadzadeh Raji M, Khosravi A, Sanati MH, Hajihoseini R, Ebrahimi A, Nabavi SM. ***Variation in Exon 4 of IL7-R gene***. European Bioinformatics Institute, Accession Number: FR863588. Available from: www.ebi.ac.uk/ena/data/view/fr863588.

Interleukin VII Receptor Gene Polymorphism in Multiple Sclerosis Patients

*Ahmadzadeh Raji M(MSc)[*1], Khosravi A(PhD)[2], Sanati M(PhD)[3], Hajihoseini R(PhD)[4], Ebrahimi A(PhD)[5], Nabavi M(MD)[6]*

[1]*Department of Nanobiotechnology, University of Tehran, Iran*
[2]*Department of Mycology, University of Tehran, Iran*
[3]*National Institutes of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran*
[4]*Department of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran*
[5]*Kosar Research Centre, Tehran, Iran*
[6]*Department of Neurology, Shahed University, Tehran, Iran*

Received: 1 Dec 2010 ***Accepted:*** 26 May 2011

Abstract

Introduction: Multiple Sclerosis is a chronic disease of central nervous system. Disease is more common in young adults and females and causes neurologic symptoms and signs. Cytokine IL-7 is a 25– kDa glycoprotein that has an important role in Lymphopoiesis. Interleukin VII receptor gene has been identified to be associated with multiple sclerosis, so its assessment is important.

Methods: We investigated 60 Iranian patients with clinically definite MS and 60 normal healthy controls with negative family history for MS. After blood sampling, DNA was extracted from the whole blood, then we used 2 sets of primers for promoter and exon 4 of IL-VII gene. These fragments were amplified by PCR technique and early screening was performed by SSCP technic in the presence of control samples. Then different patterns with control samples were sent for DNA sequencing.

Results: We observed one SNP in promoter. Most of the alleles of the patients were homozygote. There were two 2 SNPs and two sequence variations in exon 4 as P.H165H and P.V138I, which has been submitted in European Bioinformatics Institute under the access number of FR863587.

Conclusion: Further studies on control group will be required to reveal the effects of these SNPs on the ILVII-R α protein and they can probably be useed as a biomarker for early diagnosis of MS.

Keywords: Polymorphism, Singl-Stranded Conformational; Sequence Analysis, DNA; Polymorphism, Genetic

This paper should be cited as:
Ahmadzadeh Raji M, Khosravi A, Sanati M, Hajihoseini R, Ebrahimi A, Nabavi M. ***Interleukin VII receptor gene polymorphism in multiple sclerosis patients***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(4):501-10.

Corresponding author: Tel: +98 09123679218, Email: m_ahmadzadeh@ut.ac.ir