

افزایش خطر بروز بیماری Multiple Sclerosis در حضور یک واریانت ژنتیک در ۱۹ نوکلئوتید پایین دست ژن کد کننده miR-148a در جمعیت اصفهان

فرزانه احمدی^۱، مریم پیمانی^۲، مجید خیراللهی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Multiple sclerosis (MS) یک بیماری شایع سیستم عصبی مرکزی می‌باشد و میزان ابتلا به این بیماری در زنان دو برابر بیشتر از مردان است. با توجه به اهمیت پلی‌مورفیسم‌های miRNAها در بیان و عملکرد mRNAها و همچنین خطر بروز بیماری‌ها، در این مطالعه برای اولین بار ارتباط پلی‌مورفیسم rs6977848 با خطر ابتلا به بیماری MS در جمعیت اصفهان بررسی شد.

روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۹۵ فرد سالم و ۹۹ فرد بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. ژنوتیپ افراد برای پلی‌مورفیسم مورد نظر به روش Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) تعیین و جهت تأیید نتایج، تعدادی از نمونه‌ها تعیین توالی شد. سپس، فراوانی ژنوتیپ‌ها به منظور به دست آوردن ارتباط این پلی‌مورفیسم با خطر ابتلا به بیماری MS، واکاوی گردید.

یافته‌ها: با در نظر گرفتن غلبه‌ی کامل آلل T مجموع ژنوتیپ‌های TT و TG در مقایسه با ژنوتیپ مرجع GG به طور معنی‌داری استعداد ابتلا به بیماری MS را افزایش می‌دهند (Odds ratio = ۲/۲۷ یا OD و P = ۰/۰۴۳). اگر چه اختلاف معنی‌داری بین فراوانی هر یک از ژنوتیپ‌ها در مقایسه با ژنوتیپ مرجع TT در دو جمعیت سالم و بیمار مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم rs6977848 در پایین‌دست ژن کد کننده miR-148a به احتمال زیاد می‌تواند بر عملکرد این miRNA و همچنین، سطح بیان آن مؤثر باشد و استعداد افراد در ابتلا به این بیماری را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اما با سن بروز بیماری در جمعیت‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری ندارد.

واژگان کلیدی: miR-148a انسانی، پلی‌مورفیسم ژنتیک، Multiple sclerosis

ارجاع: احمدی فرزانه، پیمانی مریم، خیراللهی مجید. افزایش خطر بروز بیماری Multiple Sclerosis در حضور یک واریانت ژنتیک در ۱۹ نوکلئوتید پایین دست ژن کد کننده miR-148a در جمعیت اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۴۱): ۱۰۴۶-۱۰۴۰

مقدمه

از عوامل محیطی و ژنتیک است و منجر به ایجاد اختلالات پاسخ ایمنی و در نتیجه، تخریب پوشش میلین الیگودندروسیت‌های آکسون و سلول‌های عصبی می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که نرخ شیوع این بیماری در زنان نسبت به مردان دو برابر می‌باشد (۱). این بیماری، نوعی واکنش خودکار لفسوسیت‌ها می‌باشد که سبب عبور این سلول‌ها از سد خونی- مغزی و ایجاد التهاب و اختلال در عملکرد سلول‌های عصبی می‌گردد. اشکال بالینی بیماری MS بسیار متنوع می‌باشد و می‌تواند در محدوده‌ی بسیار خفیفی از بیماری و یا با توجه به

بیماری Multiple sclerosis که به اختصار به آن MS گفته می‌شود، یک بیماری خود ایمنی مزمن می‌باشد که سبب ایجاد التهاب در سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system یا CNS) می‌شود. این بیماری با دمیلینه کردن سیستم عصبی مرکزی همراه است و باعث ایجاد آسیب کانونی به الیگودندروسیت آکسون و انحطاط عصبی و ایجاد پلاک دمیلینه کننده در CNS می‌شود. ایجاد این بیماری به علت وجود فعل و انفعالات پیچیده می‌باشد که ناشی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان پژوهشکده‌ی پیشگیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: مریم پیمانی

Email: peymani62_m@yahoo.com

حفاظت شده با توالی و ساختارهای مشابه به یکدیگر و جایگاه اتصال یکسان تشکیل شده است. این سه قطعه، شامل miR-148a، miR-148b و miR-152 می باشد. پیش ساز miR-148/miR-152 که دارای یک ساختار ساقه-حلقه می باشد، به وسیله یک سری از آنزیم های موجود در هسته و سیتوپلاسم برش خورده و شکاف هایی در آنها ایجاد می شود که آنها را به فرم miR-148a، miR-148b و miR-152 تبدیل می کند (۱۳).

miR-148a یکی از microRNAهای گزارش شده در ناحیه ی آسیب دیده ی مغز بیماران MS می باشد که در مقایسه با ناحیه ی سفید مغز افراد طبیعی افزایش بیان نشان می دهد. همچنین، در Treg cell های CD4+CD25high بیماران مبتلا به MS، در مقایسه با افراد طبیعی افزایش بیان این microRNA مشاهده شده است (۱۴). با توجه به پایگاه داده ی miRNA SNP پیش بینی شده است که پلی مورفیسم rs6977848 در پایین دست توالی miR-148a و به فاصله ی ۱۹ نوکلئوتید از ژن کد کننده ی آن قرار گرفته است و باعث جایگزین شدن نوکلئوتید گوانین با تیمیدین در توالی کناری miRNA نابالغ می شود. این نوکلئوتید در جایگاه ۲۵۹۸۹۵۲۰ روی کروموزوم شماره ی ۷ قرار دارد. فراوانی این پلی مورفیسم در جمعیت های مختلف در پایگاه dbSNP ۳۵-۴۶ درصد گزارش شده است. با توجه به اهمیت پلی مورفیسم های موجود در miRNAها و پلی مورفیسم های موجود در توالی های مجاور آنها و با توجه به نقش miR-148a در بیماری های خود ایمن نظیر MS، مطالعه ی حاضر با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs6977848 با خطر ابتلا به بیماری MS در جمعیت اصفهان انجام شد.

روش ها

جمع آوری نمونه: این پژوهش یک مطالعه ی مورد-شاهدی بود که در آن، ۹۹ بیمار مبتلا به MS مراجعه کننده به متخصص به عنوان گروه مورد و ۹۵ فرد سالم به عنوان گروه شاهد حضور داشتند. از شرکت کنندگان ۳ میلی لیتر خون وریدی گرفته شد و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد در لوله ی آزمایش حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) نگهداری شد. میانگین سن افراد با اختلاف ± 5 در نظر گرفته شد. مشخصات جمعیت مورد مطالعه در جدول ۱ به صورت خلاصه آمده است. همچنین، هر دو گروه شاهد و مورد از نظر شرایط تعادل Hardy-Weinberg با درجه ی آزادی یک، در حال تعادل بودند. همه ی افراد شرکت کننده در این مطالعه، فرم رضایت نامه ی آگاهانه و پرسش نامه را نیز تکمیل کردند. این مطالعه، توسط کمیته ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه ی IR.IAU.SHK.REC.1397.016 تأیید و تصویب شد. استخراج

از دست دادن ارتباط بین مغز و سایر قطعات بدن به شدت ناتوان کننده باشد. از این رو، شناسایی برخی از نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودرس و پاتوژن بودن بیماری بسیار حیاتی است (۲). علت بروز این بیماری، ترکیبی از استعداد ژنتیک و عامل غیر ژنتیک نظیر ویروس، متابولیسم یا عوامل محیطی است که با هم منجر به یک اختلال خود ایمنی و حملات مکرر به CNS می شوند (۳). عوامل خطر برای بروز بیماری MS شامل اشعه ی ماورای بنفش، ویتامین D، ویروس Epstein-Barr و مونونوکلئوز عفونی و سایر عوامل عفونی و غیر عفونی می باشد (۴).

در سال ۲۰۰۸ بین ۲-۲/۵ میلیون نفر در سرتاسر جهان به این بیماری مبتلا شدند. این در حالی است که نرخ ابتلا در بخش های مختلف جهان و در بین جوامع مختلف متفاوت است (۵). میزان شیوع MS در آمریکا ۷۵ نفر در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر و در ایران، نزدیک به ۴۰ نفر در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر می باشد. توزیع جغرافیایی MS با عرض جغرافیایی شمال یا جنوب خط استوا افزایش می یابد و جمعیت سفید پوست اروپایی آسیب پذیرتر از جمعیت عمومی هستند (۶). مطالعات نشان می دهد که ایتروکین-۱۷ (IL-17) که از سلول های T helper 17 (Th17) تولید می شود، در پاتوژن بودن بیماری های خود ایمنی نظیر MS و Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) نقش به سزایی دارد (۱). علاوه بر موارد پیش گفته، برخی از عوامل پیش التهابی نظیر Interferon Gamma (IFN- γ)، Tumor necrosis factor- α (TNF- α)، لفتوکسین- α و IL-12، نقش موادی در ایجاد بیماری MS دارند. همچنین، نقش IL-1، IL-2، IL-4، IL-10، IL-12 و Transforming growth factor beta (TGF- β) در مراحل مختلف بیماری اثبات شده است. TNF- α و لفتوکسین- α در تشدید بیماری و TGF- β و IL-10 در بهبود بیماری و IL-12 در شروع بیماری نقش دارند (۷-۹).

امروزه، نقش MicroRNA (miRNA) ها در بروز برخی از بیماری ها شناسایی شده است. miRNAها به آن دسته از RNAهای گفته می شود که طولی در حدود ۲۳-۲۱ نوکلئوتید دارند و به طور معمول با اتصال به بخش هدف تولید پروتئین از آن را کاهش می دهد یا متوقف می کند (۱۰-۱۱).

miRNA به عنوان یک تنظیم کننده در رشد سلول های ایمنی پیشنهاد شده است و نقش مهمی در پاسخ التهابی و همچنین، در پاتوژن بیماری های عصبی دارد (۱۲). Single-nucleotide polymorphism (SNP) های موجود در miRNA و یا مرتبط با بیوژن آن، ممکن است در پاسخ های درمانی و پیش بینی بیماری ها مؤثر باشند و گاهی SNP در نواحی کناری توالی miRNA مشاهده می شود که می تواند در مکانیسم عمل miRNA نقش تنظیمی ایفا کند.

خانواده ی miR-148/152 از سه قطعه ی miRNA به شدت

۴/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۵ میکرولیتر (10X) Buffer، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم SfaNI و ۲/۵ میکرولیتر محصول PCR با هم مخلوط شد و به مدت ۲ ساعت در بن ماری با حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس، برای تشخیص ژنوتیپ هر فرد، محصول تیمار آنزیمی بر روی ژل ۲ درصد آگارز به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید و با استفاده از دستگاه Gel doc، عکس برداری شد. بر اساس قطعات مشاهده شده در هر نمونه، پس از تیمار محصول PCR با آنزیم SfaNI ژنوتیپ‌های هر فرد مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ (version 23, IBM Corporation, Armonk, NY) و آزمون آماری χ^2 و Logistic regression انجام شد و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف مربوط به پلی مورفیسم مورد نظر با بروز بیماری MS در سطح کمتر از ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

پس از تکثیر DNA نمونه‌های جمع‌آوری شده در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد و مشاهده محصول ۲۲۴ جفت‌باز، محصولات PCR جهت تعیین ژنوتیپ هر یک از نمونه‌ها تحت واکاوی با RFLP قرار گرفتند. در نتایج به دست آمده از واکاوی با روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم SfaNI، قطعاتی با اندازه‌های ۱۴۵ و ۷۹ جفت‌باز نشان دهنده ژنوتیپ TT، قطعاتی با اندازه‌های ۲۲۴، ۱۴۵ و ۷۹ جفت‌باز نشان دهنده ژنوتیپ GT و قطعاتی با اندازه‌های ۲۲۴ جفت‌باز نشان دهنده ژنوتیپ GG بود (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از تعیین توالی، ژنوتیپ‌های تعیین شده برای نمونه‌های مورد نظر را تأیید نمود.

بررسی توزیع فراوانی آللی در دو گروه مورد و شاهد نشان داد که آلل G به عنوان آلل خطر در هر دو گروه مورد (۴۲/۱۰ درصد) و شاهد (۳۸/۸۸ درصد) دارای کمترین فراوانی می‌باشد (جدول ۲). همچنین، نتایج به دست آمده نشان داد که فراوانی آللی در دو گروه مورد و شاهد، تفاوت معنی‌داری نداشت ($P = ۰/۵۱۹$). فراوانی ژنوتیپ‌ها در دو گروه مورد و شاهد نیز در جدول ۲ آمده است. نتایج آماری نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌ها در شرایط هم‌بازری دو جمعیت مورد مطالعه وجود نداشت و هیچ یک از ژنوتیپ‌های مشاهده شده این پلی مورفیسم نسبت به ژنوتیپ TT به عنوان ژنوتیپ مرجع، در این جمعیت با خطر ابتلا به MS ارتباط معنی‌داری ندارد ($P < ۰/۰۵۰$). در حالی که در شرایط غلبه آلل T، ژنوتیپ GG نسبت به مجموع دو ژنوتیپ دیگر، خطر بروز بیماری را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ($P = ۰/۰۴۹$).

DNA از خون با استفاده از کیت GeNetBio ساخت کهری جنوبی انجام شد. کیفیت و عدم شکستگی DNA در تمام نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل ۱ درصد آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. مشخصات جمعیت مورد مطالعه

مشخصات	گروه شاهد (n = ۹۵)	گروه مورد (n = ۹۹)
مرد	۵۰	۴۰
زن	۴۵	۵۹
سن (سال)	۱۰-۵۰	۹-۴۷
میانگین \pm انحراف معیار	۳۰/۲۰ \pm ۱۰/۵۶	۲۷/۲۷ \pm ۹/۲۶
میانگین \pm EDSS انحراف معیار	-----	۱/۹۸ \pm ۱/۰۱

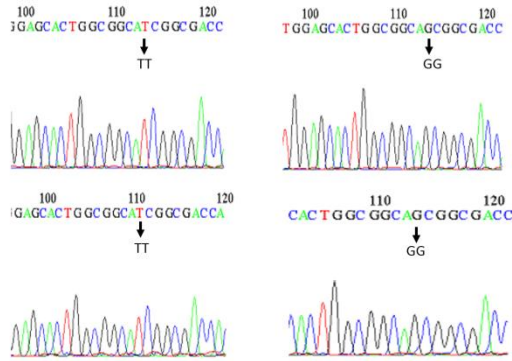
EDSS: Expanded disability status scale

تکثیر و تعیین ژنوتیپ مورد نظر برای پلی مورفیسم

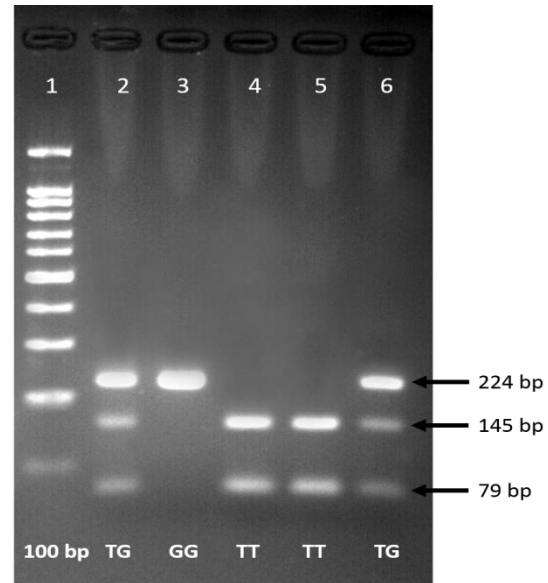
rs6977848 در نمونه‌های جمع‌آوری شده: تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) صورت گرفت. برای طراحی توالی پرایمر، ابتدا با مراجعه به سایت National Central For Biotechnology Information (NCBI) توالی ناحیه‌ی در بر گیرنده پلی مورفیسم مورد نظر به دست آمد و با استفاده از نرم‌افزار Oligo-7، یک جفت پرایمر رفت و برگشت برای منطقه‌ای که در بر گیرنده rs6977848 بود، طراحی گردید و ویژگی پرایمرهای طراحی شده در قسمت BLAST سایت NCBI ارزیابی شد. توالی پرایمر رفت 5'-TTTAACCCACCCGCTTCAAGG-3' و توالی پرایمر برگشت 5'-AAGTTCGAGACACTCCGACT-3' بود. مواد لازم جهت انجام PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر DNA ژنومی، ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix 2X (Ampliqon)، از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (۵ پیکومول) ۱ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر DNA ژنومی بود. مراحل انجام آزمایش به ترتیب زیر بر روی نمونه‌های گروه مورد و شاهد انجام شد. پس از واسرشتی (Denaturation) اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA برای پلی مورفیسم rs6977848 در ۳۵ چرخه (۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۴۰ ثانیه) تکثیر یافتند و در مرحله‌ی نهایی، طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

در این مطالعه، برای شناسایی SNP، rs6977848 از آنزیم SfaNI استفاده شد. برای این روش، محصول PCR با استفاده از آنزیم محدودگر SfaNI تیمار گردید. در یک تیوب ۰/۵ مقدار

شد و نتایج این بررسی نشان داد که بین فراوانی ژنوتیپ‌ها با سن بروز بیماری MS در جمعیت بیمار مورد بررسی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($P < 0/050$) (جدول ۳).



شکل ۲. نتایج مربوط به توالی نمونه‌های انتخاب شده



شکل ۱. الکتروفورز محصولات Polymerase chain reaction

تیمار شده با آنزیم *Sfa*NI در چاهک‌های شماره‌ی ۲ و ۶ ژنوتیپ TG مشاهده می‌شود که قطعه‌ای با اندازه‌ی ۷۹، ۱۴۵ و ۲۲۴ جفت‌باز را دارا می‌باشد. چاهک‌های شماره‌ی ۴ و ۵ ژنوتیپ TT را نشان می‌دهند که قطعه‌ای با اندازه‌ی ۷۹ و ۱۴۵ جفت‌باز را نشان می‌دهد و چاهک شماره‌ی ۳ با قطعه‌ی ۲۲۴ جفت‌باز ژنوتیپ GG را نشان می‌دهد. چاهک شماره‌ی ۱، Ladder ۱۰۰ جفت‌باز می‌باشد.

همچنین، فراوانی ژنوتیپی در افراد بیماری که اطلاعات سن آن‌ها در دسترس می‌باشد، محاسبه و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم rs6977848 با سن بروز ابتلا به بیماری MS بررسی

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در جمعیت اصفهان، با در نظر گرفتن غلبه‌ی آلل T، ژنوتیپ GG نسبت به مجموع دو ژنوتیپ دیگر پلی مورفیسم rs6977848 خطر بروز بیماری را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. همچنین، فراوانی آلل به دست آمده در این مطالعه با دامنه‌ی فراوانی گزارش شده در پایگاه dbSNP هم‌خوانی دارد. این مطالعه، اولین بررسی بر روی ارتباط یک واریانت ژنتیک در ۱۹ نوکلئوتید پایین دست ژن کد کننده‌ی miR-148a با بیماری MS می‌باشد.

جدول ۲. ارتباط پلی مورفیسم rs6977848 T>G و خطر بروز بیماری Multiple sclerosis

مقدار P	گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	نسبت شانس فاصله اطمینان ۹۵ درصد	rs4541843
-	۳۳ (۳۳/۳۳)	۳۶ (۳۷/۸۹)	۱	هم‌بازی
۰/۱۵۴	۵۵ (۵۵/۵۵)	۳۸ (۴۰/۱۰۰)	۱/۵۷۹ (۰/۸۴۳-۲/۹۵۸)	TT
۰/۲۰۷	۱۱ (۱۱/۱۲)	۲۱ (۲۲/۱۱)	۰/۵۷۱ (۰/۲۴۰-۱/۳۶۳)	TG
-	۸۸ (۸۸/۸۸)	۷۴ (۷۸/۸۹)	۱	غلبه‌ی آلل T
۰/۰۴۳	۱۱ (۱۱/۱۲)	۲۱ (۲۲/۱۱)	۲/۲۷۰ (۱/۰۲۸-۵/۰۱۴)	TT+TG
-	۱۱ (۳۳/۳۳)	۳۶ (۳۷/۸۹)	۱	غلبه‌ی آلل G
۰/۵۰۷	۶۶ (۶۶/۶۷)	۵۹ (۶۲/۱۱)	۰/۸۱۹ (۰/۴۵۵-۱/۴۷۶)	GG
-	۱۲۱ (۶۱/۱۲)	۱۱۰ (۵۷/۹)	۱	TT
۰/۵۱۹	۷۷ (۳۸/۸)	۸۰ (۴۲/۱۰)	۸۷۵ (۰/۵۸۳-۱/۳۱۳)	TG+GG
-	۱۲۱ (۶۱/۱۲)	۱۱۰ (۵۷/۹)	۱	آلل T
۰/۵۱۹	۷۷ (۳۸/۸)	۸۰ (۴۲/۱۰)	۸۷۵ (۰/۵۸۳-۱/۳۱۳)	G

جدول ۳. ارتباط پلی مورفیسم rs6977848 T>G با سن بروز بیماری Multiple sclerosis

مقدار P	نسبت شانس (فاصله اطمینان ۹۵ درصد)	≤ ۳۰	> ۳۰	سن بروز (سال)	
-	۱	۲۰	۹	TT	ژنوتیپ
۰/۸۵۵	۱/۱۳۸ (۰/۲۸۶-۴/۵۲۹)	۲۹	۲۲	TG	
۰/۶۰۵	۰/۶۷۵ (۰/۱۵۲-۲/۹۹۴)	۶	۴	GG	
-	۱	۶۹	۴۰	T	آل
۰/۱۱۸	۱/۵۹۹ (۰/۸۸۷-۲/۸۸۰)	۴۱	۳۸	G	

مرکزی، یکی از علل مهم بروز بیماری عنوان شده است که با افزایش بیان miR-148a این پدیده گزارش شده است (۱۹).

پلی مورفیسم‌ها در مسیر miRNA از ابزار قدرتمند مطالعه بیولوژی در بیماری‌ها هستند و پتانسیل بالایی جهت مطالعه در بیماری‌ها دارند. ارتباط تنگاتنگی بین بروز و پیشرفت بیماری‌ها با SNP‌های موجود در ژن‌های miRNA و ژن‌های هدف آن‌ها که در عملکرد miRNA تأثیر و تغییر ایجاد می‌کنند، گزارش شده است. همچنین، تعدادی از این SNP‌ها در ساختار ژن‌های کد کننده miRNA و مناطق مجاور آن‌ها در بیوژنز و پردازش miRNA نقش به‌سزایی دارد. بیشترین تراکم SNP‌های مرتبط با miRNA، SNP‌های مناطق بالادست و پایین‌دست miRNA گزارش شده است. مشخص شده است که SNP‌های توالی‌های miRNA و نواحی اطراف آن‌ها، می‌توانند بر ترجمه ژن هدف اثر بگذارند، مراحل تولید pri-miRNA و یا pre-miRNA را تغییر دهند و حتی روی برهم‌کنش بین miRNA و mRNA اثر بگذارند. علاوه بر این، نشان داده شده است که miR-SNP به عنوان نشانگرهای مولکولی به کار می‌روند (۲۰).

Qu و همکاران، پژوهشی در زمینه نقش miRNA بر روی بیماری‌های خود ایمنی انجام و گزارش دادند که بسیاری از miRNA به طور متفاوتی در AD بیان می‌شوند و ممکن است نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و خود ایمنی داشته باشند. نقش miRNA در فرایندهای اپی ژنتیک نیز بررسی شده است. به عنوان miRNA کلیدی در SLE، miR-148a و miR-21 نقش مهمی در ایجاد DNA هیپومتیلاسیون دارند (۱۶).

Chen و همکاران، مطالعه‌ای بر روی دخالت miRNA در بیماران مبتلا به MS با القای تمایز سلولی به سلول T helper 17 انجام دادند. در این تحقیق، نشان داده شد که miRNA، تنظیم کننده‌های کلیدی در تمایز سلول CD4 + T به سلول‌های Th17 هستند که اغلب از طریق مسیر سیگنال‌دهی Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) صورت می‌گیرد. برخی از miRNA، ممکن است نشانگرهای زیستی و اهداف درمانی در تشخیص و پیش‌آگهی و

در مطالعه‌ای که Gonzalez-Martin و همکاران، با استفاده از روش RT-PCR بر روی نقش miR-148a در بیماری خودایمنی لوپوس و همچنین، موش‌های مستعد لوپوس انجام دادند، دریافتند که با افزایش بیان miR-148a در قدرت تحمل (Tolerance) سلول‌های B اختلال به وجود خواهد آمد و آن را به عنوان یک تنظیم کننده قوی برای سلول‌های B و خود ایمنی از طریق هدف قرار دادن Gadd45، (PTEN) Phosphatase and tensin homolog پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bim معرفی کردند (۱۵).

Qu و همکاران، بر روی نقش miRNA بر روی بیماری‌های خود ایمنی پژوهش‌هایی را انجام و گزارش دادند که بسیاری از miRNA به طور متفاوتی در Alzheimer's disease (AD) بیان می‌شوند و ممکن است نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و خود ایمنی داشته باشند. نقش miRNA در فرایندهای اپی ژنتیک نیز بررسی شده است. به عنوان miRNA کلیدی در Systemic lupus erythematosus (SLE)، miR-148a و miR-21 نقش مهمی در ایجاد DNA هیپومتیلاسیون دارند (۱۶). Pan و همکاران، طی مطالعه‌ای بیان کردند که miR-148a در SLE دخالت دارد که بیان DNA-methyltransferase 1 (DNMT1) را مهار می‌کند و در عوض DNA هیپومتیلاسیون درون لوپوس را ترویج می‌کند (۱۷).

Otaegui و همکاران، بیان ۳۶۴ عدد از miRNA‌ها در Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) را در بیماران مبتلا به MS در وضعیت Relapse، وضعیت Remission و کنترل به وسیله روش Quantitative PCR (qPCR) مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. در این تحقیق، بیان کردند که miR-148a می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مرحله Remission بیماری باشد (۱۸). با توجه به مطالعه‌ی پیش‌گفته و مطالعه‌ی حاضر، می‌توان چنین استنباط کرد که miR-148a یک عامل کلیدی برای تشخیص بیماری MS است که در این مطالعه نیز ثابت شد.

در مطالعه‌ی دیگری، miR-148a به عنوان تنظیم‌گر مهم قدرت تحمل B cell با معرفی شد. در بیماری‌های خود ایمنی نظیر MS و آرتریت روماتوئید، بر هم خوردن قدرت تحمل B cell‌های محیطی و

درمان و پیشرفت بیماری باشند (۲۱).

این مطالعه گزارشی برای قبول و یا رد ارتباط بین پلی مورفیسم rs6977848 و خطر بروز MS در جمعیت اصفهان و کاربرد آن در علم پزشکی برای تعیین ژنوتیپ افراد و بررسی پرخاطر بودن آنها برای ابتلا به این بیماری است. از این رو، با توجه به مشاهده ارتباط معنی دار ژنوتیپ GG با خطر بروز بیماری در جمعیت اصفهان، می توان از این نشانگر مولکولی در جهت غربالگری جمعیت مستعد این بیماری استفاده نمود. نتیجه گیری نهایی این که پلی مورفیسم rs6977848 در پایین دست ژن کد کننده miR-148a، به احتمال زیاد می تواند با اثرگذاری بر عملکرد این miRNA و همچنین، سطح بیان آن مؤثر باشد و استعداد افراد در ابتلا به این بیماری را تحت تأثیر قرار می دهد، اما با سن بروز

بیماری در جمعیت های مورد مطالعه ارتباط معنی داری ندارد. البته، با توجه به نقش گسترده ی miR-148a در بیماری های مختلف، توصیه می شود که پلی مورفیسم های آن نظیر پلی مورفیسم مورد نظر در این مطالعه در سایر بیماری ها نیز مطالعه گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان نامه ی کارشناسی ارشد است که توسط کمیته ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه ی IR.IAU.SHK.REC.1397.016 تأیید و تصویب شد و تحت حمایت معاونت پژوهشی این دانشگاه اجرا گردید. از تمامی افرادی که در جمع آوری نمونه های خون در این پژوهش یاری رساندند، سپاسگزاری می گردد.

References

- Kacperska MJ, Jastrzebski K, Tomasik B, Walenczak J, Konarska-Krol M, Glabinski A. Selected extracellular microRNA as potential biomarkers of multiple sclerosis activity--preliminary study. *J Mol Neurosci* 2015; 56(1): 154-63.
- Guan H, Singh UP, Rao R, Mrelashvili D, Sen S, Hao H, et al. Inverse correlation of expression of microRNA-140-5p with progression of multiple sclerosis and differentiation of encephalitogenic T helper type 1 cells. *Immunology* 2016; 147(4): 488-98.
- Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *P T* 2012; 37(3): 175-84.
- Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 2010; 9(5): A387-A394.
- World Health Organization. Atlas: Multiple sclerosis resources in the world 2008. Geneva, Switzerland: WHO; 2008.
- Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2008; 9(7): 516-26.
- Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995; 37(4): 424-35.
- Navikas V, Link H. Review: Cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996; 45(4): 322-33.
- Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroffe MN, Cuzner ML, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1995; 182(6): 1985-96.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 862-4.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543): 853-8.
- Otaegui D, Baranzini SE, Armananzas R, Calvo B, Munoz-Culla M, Khankhanian P, et al. Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2009; 4(7): e6309.
- Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The role of Mir-148a in Cancer. *J Cancer* 2016; 7(10): 1233-41.
- Junker A. Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011; 585(23): 3738-46.
- Gonzalez-Martin A, Adams BD, Lai M, Shepherd J, Salvador-Bernaldez M, Salvador JM, et al. The microRNA miR-148a functions as a critical regulator of B cell tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2016; 17(4): 433-40.
- Qu Z, Li W, Fu B. MicroRNAs in autoimmune diseases. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 527895.
- Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, et al. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 2010; 184(12): 6773-81.
- Otaegui D, Baranzini SE, Armananzas R, Calvo B, Munoz-Culla M, Khankhanian P, et al. Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2009; 4(7): e6309.
- Shi H, Chen X, Jiang H, Wang X, Yu H, Sun P, et al. miR-148a suppresses cell invasion and migration in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase 1. *Oncol Lett* 2018; 15(4): 4944-50.
- Nguyen-Dien GT, Smith RA, Haupt LM, Griffiths LR, Nguyen HT. Genetic polymorphisms in miRNAs targeting the estrogen receptor and their effect on breast cancer risk. *Meta Gene* 2014; 2: 226-36.
- Chen C, Zhou Y, Wang J, Yan Y, Peng L, Qiu W. Dysregulated MicroRNA Involvement in Multiple Sclerosis by Induction of T Helper 17 Cell Differentiation. *Front Immunol* 2018; 9: 1256.

Increased Risk of Multiple Sclerosis in the Presence of a Genetic Variant in 19-Nucleotide Downstream of miR-148a Coding Gene in Isfahan City Population in Iran

Farzaneh Ahmadi¹, Maryam Peymani², Majid Kheirollahi³

Original Article

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a common disease of the central nervous system, and the incidence of this disease in women is twice that of men. Considering the importance of miRNA polymorphisms in the expression and function of mRNAs as well as the risk of disease, this study investigated the association of rs6977848 polymorphism (a genetic variant in 19-nucleotide downstream of miR-148a coding gene) with the risk of MS disease in Isfahan City population in Iran, for the first time.

Methods: In this case-control study, a population of 95 healthy individuals and 99 patients were assayed. The genotype of the individuals for the polymorphism was determined using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). To confirm the results, a number of samples were sequenced. Then, the frequency of genotypes and alleles were evaluated.

Findings: Considering the total dominance of T allele, the total TT and TG genotypes significantly increased the susceptibility to MS disease compared with the GG reference genotype [odds ratio (OR) = 2.27, P = 0.043]; while considering the genotype GG as reference genotype, there was a significant difference between the TG and the reference genotypes in this population with a risk of disease (P < 0.050). However, no significant difference was observed between genotype TT and GG genotype as reference genotype.

Conclusion: Findings indicate that rs6977848 polymorphism in miR-148a coding gene downstream may be effective in influencing the performance of this miRNA as well as its expression level. Moreover, the incidence of the ability of individuals to affect this disease is not significantly related to the incidence of disease in the studied populations.

Keywords: miR148a, human, Genetic polymorphism, Multiple sclerosis

Citation: Ahmadi F, Peymani M, Kheirollahi M. **Increased Risk of Multiple Sclerosis in the Presence of a Genetic Variant in 19-Nucleotide Downstream of miR-148a Coding Gene in Isfahan City Population in Iran.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(541): 1040-6.

1- MSc Student, Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2- Assistance Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3- Associate Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Maryam Peymani, Email: peymani62_m@yahoo.com