ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲
صفحه ۲۲۴- ۲۲۱

بررسی اگزونهای داغ ژن *APP* در بیماران آلزایمر زودرس ایرانی

Investigation of hotspot exons in *APP* gene in Iranian patients with early onset Alzheimer disease

پریسا آزادفر[۱]، مریم نوروزیان[۲]، لیلا اکبری[۳]، سمیرا شیبانی نیا[۴]، فرهاد عصارزادگان[۵]، مسعود هوشمند*[۶]

۱،۳و۴- کارشناسان ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
۵- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۶- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

Azadfar P[1], Norouzian M[2], Akbari L[3], Sheibaninia S[4], Assarzadegan F[5], Houshmand M*[6]

1,3,4. MSc Students, Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran
6. Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: massoudh@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۴)

چکیده

بیماری آلزایمر بیماری پیشرونده دستگاه عصبی است که به وسیله از دست دادن حافظه اخیر و تغییر در شخصیت آشکار می شود. نقش موتاسیون در ژن پیش ساز آمیلوئید (*APP*) در بیماری آلزایمر با بروز زودرس به اثبات رسیده است. هدف از این مطالعه بررسی واریانت موتاسیون در اگزونهای ۱۶ و۱۷ به عنوان نقاط داغ در بیماران آلزایمر با بروز زودرس می باشد. در این بررسی ۲۴ فرد بیمار به همراه ۴۸ فرد به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام PCR، ژنوتیپ ها به وسیله روش توالی‌یابی بررسی شدند. نتایج در یکی از بیماران پلی‌مورفیسمی در موقعیت T12931884A در اینترون ۱۶ ژن پیش ساز آمیلوئید نشان داد ، که این موقعیت، ۲۶ نوکلئوتید با ناحیه کد شونده فاصله داشت. اما هیچ جهشی در اگزون ۱۶ و ۱۷ ژن پیش ساز آمیلوئید در بیماران مبتلا به آلزایمر با بروز زودرس دیده نشد. به نظر می رسد که اگزون ۱۶ و ۱۷ در بیماران آلزایمر با بروز زودرس منطقه داغ نبود .

واژه‌های کلیدی

آلزایمر،
بروز زودرس،
ژن *APP* ،
جهش،
ایران

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.12.6]

مقدمه

بیماری آلزایمر از شایعترین بیماری‌های نورودژنراتیو است که با کاهش حافظه نمود پیدا می‌کند. موتاسیون در سه ژن *PSEN1* ، *PSEN2* و *APP* باعث ایجاد فرم غالب و زودرس بیماری آلزایمر می‌شود. پاتولوژی بیماری آلزایمر به وسیله پلاکهای آمیلوئید (که از مهمترین آنها پروتئین بتا آمیلوئید می‌باشد) و کلافه‌های نوروفیبریلاری که ناشی از هایپرفسفریلاسیون پروتئین تاو است، مشخص می‌شود (La Bella et al. 2004 ; Tanaka et al. 2010). در بیماری آلزایمر ساختارهای پروتئینی کروی شکلی در خارج نورون‌های برخی مناطق مغز و ساختارهای پروتئینی رشته‌ای در جسم سلولی نورون‌ها، تشکیل می‌شود. این ساختارهای پروتئینی که به آنها اجسام آمیلوئیدی گفته می‌شود، در اثر برخی تغییرات درپروتئوم سلول‌های عصبی و به هم خوردن تعادل و تغییر در میزان و یا ساختار پروتئین‌های پره سنایلین، پپتید آمیلوئیدبتا ایجاد می‌شود.

یکی از مهمترین پروتئین‌هایی که در ایجاد آلزایمر نقش دارد، پروتئین پیش ساز آمیلوئید نام دارد، این پروتئین در سلول‌های دستگاه عصبی بیان می‌شود و در اتصال سلول‌ها به هم، تماس سلول‌ها و اتصال به ماتریکس خارج سلولی و اسکلت سلولی نقش دارد. در اثر پردازش پروتئین پیش ساز آمیلوئید بوسیله سه نوع آنزیم پروتئولیتیک آلفا، بتا و گاما- سکرتاز در اسیدهای آمینه ۶۷۸، ۶۷۱ و ۷۱۱ ، پپتیدهایی به نام آمیلوئیدبتا ۴۰ و ۴۲ (به ترتیب دارای ۴۰ و۴۲ اسید آمینه) ایجاد می‌شوند. در حالت عادی مقدار این قطعات در سلول‌ها کم است و به سرعت تجزیه می‌شود اما اگر در پروتئوم سلول‌های عصبی این تعادل برهم بخورد و مقدار این قطعات افزایش یابد، ساختارهای پروتئینی کروی و درنتیجه آلزایمر ایجاد می‌شود (Johnston et al. 1993; Shadlen et al. 1999; Hauptmann et al. 2006).

پروتئین بتا آمیلوئید به وسیله اگزون ۱۶ و ۱۷ ژن *APP* کد می شود، که موقعیت دقیق آن روی کروموزوم ۲۱ (21q21) می‌باشد (Swerdlow et al. 2010). در بسیاری ازتحقیقات موتاسیون های پاتوژنیک زیادی در اگزون ۱۶ و ۱۷ ژن پیش ساز آمیلوئید گزارش شده است (Cruts et al.1998; Pasalar et al. 2002; Lindquist et al. 2008; Thajeb et al. 2009). هدف از این تحقیق، آنالیز این اگزون‌ها در بیماران مبتلا به آلزایمر در جمعیت ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۲۴ فرد بیمار (شامل ۱۰ زن و ۱۴ مرد) که هیچ رابطه‌ی خویشاوندی با یکدیگر نداشتند از مناطق مختلف ایران با درجات مختلف از بیماری آلزایمر با بروز زودرس (بین سنین ۴۰ تا ۶۵ سال) بودند، انتخاب شد. این بیماران با تست‌های تشخیصی مربوطه توسط نورولوژیست معاینه شده و پس از اطمینان از صحت تشخیص در کلینیک حافظه، جهت مطالعات ژنتیکی انتخاب شدند. ۴۸ فرد سالم (شامل ۲۲ زن و ۲۶ مرد) در محدوده سنی ذکر شده به عنوان کنترل استفاده شد. سپس با رضایت افراد، خون‌گیری و استخراج DNA با روش نمک اشباع انجام شد. PCR اگزون ۱۶ با طول ۲۷۷ bp و ۱۷ با طول ۳۱۹ bp ژن پیش ساز آمیلوئید به وسیله آغازگرهای اشاره شده در جدول ۱ ازدیاد شد (Cruts et al. 1998) و محصولات PCR به وسیله دستگاه ABI3100 شرکت کوثر و نرم افزار Finch-TV خوانده شد.

Exon16	F:5′-cttcaggcctagaaagaa-3′	R:5′-gatgaaccagagttaata-3′
Exon17	F:5′-cctcatccaaatgtcccctgc-3′	R:5′-gcctaattctctcatagtctt-3′

جدول۱- آغازگرهای اگزون ۱۶و۱۷ ژن *APP*

مواد	غلظت	اگزون۱۶	اگزون۱۷
Buffer 10	1 X	2.5 µl	2.5 µl
$MgCl_2$ 50mM	1 mM	0.8 µl	0.8 µl
dNTP 10mM	0.5 mM	0.5 µl	0.5 µl
Primer F	5 pmol	1 µl	1 µl
Primer R	5 pmol	1 µl	1 µl
DNA	200 ng	1.5 µl	2 µl
Taq polymerase	5 U	0.3 µl	0.3 µl
H_2O	-	16.4 µl	16.9 µl
Total	-	25	25

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.12.6]

نتایج و بحث

بعد از انجام PCR، توالی‌های به دست آمده از بیماران با توالی-های موجود در سایت NCBI مقایسه شد. یک پلی‌مورفیسم در موقعیت T12931884A در اینترون ۱۶ ژن پیش ساز آمیلوئید دیده شد، که حدود ۲۶ نوکلئوتید با ناحیه اگزونی فاصله داشت، که احتمال دارد در فرایند پیرایش[1] نقش داشته باشد. ولی هیچ جهشی در اگزونهای ۱۶ و ۱۷ ژن پیش ساز آمیلوئید در بیماران مبتلا به آلزایمر با بروز زودرس دیده شد.

بیماری آلزایمر با بروز زودرس، بیماری آتوزومی غالب است که سه ژن مهم دخیل در آن عبارتند از *PSEN1* و *PSEN2* و *APP* در این مطالعه ما نقاط داغ[2] *APP* را بررسی نمودیم. تعداد مبتلایان به بیماری آلزایمر با بروز زودرس بسیار محدود می‌باشد، لذا انتخاب ۲۴ نمونه بیمار و اثبات آلزایمر بودن بیماران از نظر بالینی در ایران در سنین (۶۵-۴۰) بسیار مشکل بود. زیرا عوامل بسیاری مانند: ضربه به سر، عمل جراحی، سیگاری بودن و ممکن است سن بروز بیماری را کاهش دهد.

مطالعه در فرانسه بر روی ۴۳۶۷۱۰ نفر ۵/۳ درصد از ۱۰۰،۰۰۰ نفر بیماری آلزایمر زودرس را نشان داد که زیر ۶۱ سال بودند و در ۳ نسل به صورت اتوزومال غالب دیده شده‌اند. در این مطالعه ۵۶ درصد جهش در ژن *PSEN1* دیده شده و ۱۹ درصد در ژن *APP* و مابقی هیچگونه جهشی در هیچکدام از ۳ ژن مسئول شناخته شده نشان ندادند (Piscopo et al. 2011).

با در نظر گرفتن مطالعه Piscopo در سال ۲۰۱۱ و سهم ژن*APP* باید در پنج بیمار جهش مشاهده می شد، در صورتی که تمام اگزون‌ها بررسی می‌شدند. با توجه به سهم اگزون های مورد مطالعه در مولژن انتظار داشتیم در دو بیمار جهش ببینیم، ولی در تحقیق حاضر هیچ جهشی دیده نشد.

جدول۲- سهم اگزون های۱۶و۱۷ در مولژن در بررسی ۸۰ خانواده ایرانی

Exon	Mutations	Families
EX16	3	3
EX17	21	77

[1] Splicing
[2] Hot spot

در تحقیقات انجام شده در ایران و سایر کشورها که بر روی اگزون های ۱۶و۱۷ انجام شده موتاسیون‌ها و پلی‌مورفیسم‌های مختلفی در بیماران آلزایمر با بروز دیررس و زودرس گزارش شده است (Cruts et al.1998; Pasalar et al. 2002; Lindquist et al. 2008; Thajeb et al. 2009). در بررسی‌های مشابه در ایران که توسط خانم دکتر پاسالار در سال ۲۰۰۲ بر روی خانواده‌ای در شمال کشور که چند فرد از اعضای خانواده آنها به بیماری آلزایمر با بروز زودرس مبتلا بودند وهمچنین دکتر لیندکوئست در دانمارک که بر روی بیماران ایرانی کار کردند موتاسیون *T714A* برای اولین بار گزارش شد (Pasalar et al. 2002; Lindquist et al. 2008). اما این جهش در بیماران این تحقیق دیده نشد. بنابراین بررسی سایر اگزون‌های ژن *APP* و سایر ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر با بروز زودرس پیشنهاد می‌شود.

منابع

Cruts M, van Duijn CM, Backhovens H et al. (1998) Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. Human Molecular Genetics. 7:43-51.

Hauptmann S, Keli U, Scherping I, Bonert A, Eckert A, Muller W (2006) Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer disease. Science Direct 41:668-673.

Johnston J, Lilis L, Axelman K, Cowburn R, Johansson K, Viltanen M, Winblad B, Lannfelt L (1993) Sequencing of exons 16 and 17 of the β- amyloid precursor protein gene fails to identify new mutation in Swedish Alzheimer's disease. Human Molecular Genetics. 1045-1046.

La Bella V, Liguori M, Cittadella R, Settipani N, Piccoli T, Manna L, Quattrone A,Piccoli F (2004) A novel mutation (Thr116Ile) in the presenilin 1 gene in a patient with early-onset Alzheimer's disease. Eurropean Journal of Neurolgy 11:521-4.

Lindquist SG, Nielsen JE, Stokholm J, Schwartz M, Batbavli M, Ballegaard M, Erdal J, Krabbe K, Waldemar G (2008) Atypical early-onset Alzheimer's disease caused by the Iranian APP mutation. Journal of the Neurological sciences. 124-130.

Pasalar P, Najmabadi H, Noorian AR, Moghimi B, Jannati A, Soltanzadeh A, Krefft T, Crook R, Hardy J (2002) An Iranian family with Alzheimer's disease caused by a novel APP mutation (Thr714Ala). Neurology. 58:1574-1575.

Piscopo P, Talarico G, Malvezzi-Campeggi L and et al. (2011) Presenilin2 mutation R71W in an Italian early-onset sporadic Alzheimer's disease case. Journal of neuroscience. 258:2043-2047.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.12.6]

Tanaka N, Goto Y, Akanuma J, Kato M, Kinoshita T, Yamashita F, Tanaka M, Asada T (2010) Mitochondrial DNA variants in a Japanese population of patients with Alzheimer's disease. Mitochondrion 10:32-7.
Thajeb P, Wang P, Chien CL, Harrigan R (2009) Novel polymorphisms of the amyloid precursor protein (APP) gene in Chinese/Taiwanese patients with Alzheimer's disease. Journal of Clinical Neuroscince 259-63.
Shadlen M, Larson E, Gibbons L, McCormick W Teri L (1999) Alzheimer's disease symptom severity in blacks and whites. Journal of the American Geriatrics Society. 47:482-6.
Swerdlow R, Burns J, Khan S (2010) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. Journal of Alzheimers disease. 20 2:S265-79.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.12.6]