

بررسی ارتباط پلی مورفیسمی های تک نوکلئوتیدی ژن Reelin با ناهنجاری طیف اوتیسم

در کودکان مبتلای آذری در شمال غرب ایران



لیلا مهدیزاده فانید^{۱*}، مینا آدمپور زارع^۲ و حسن شاهرخی

^۱ تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی

^۲ تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی، فیزیولوژی جانوری

^۳ تبریز، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری، بیمارستان رازی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۲

چکیده

اختلال طیف اوتیسم (ASD) اختلال عصبی پیچیده دوران کودکی است که توسط نقص در ارتباطات کلامی و غیر کلامی، تعاملات اجتماعی متقابل، رفتارهای کلیشه‌ای، علایق و فعالیتها توصیف شده است. در طول رشد مغز جنینی Reelin سیگنالی را برای مهاجرت مناسب نورونهای جدید حاصل از تقسیم میتوزی فراهم می‌کند. از آنجایی که ژن Reelin نقش بسیار مهمی در این فرآیند مهاجرتی دارد بنابراین، ژن به عنوان یک ژن کاندید بالقوه برای اوتیسم در نظر گرفته شده است. هدف این تحقیق بررسی ارتباط احتمالی پلی مورفیسمی های این ژن با اختلال طیف اوتیسم در جمعیت آذری در ایران بوده است. در این مطالعه مورد-شاهدی، 74 بیمار مبتلا به اختلال طیف اوتیسم و 88 فرد سالم استفاده شده است. استخراج DNA ژنومی از لکوسیت های خون محیطی به روش پروتئیناز K و salting out انجام شد. ژنوتیپهای جایگاه پلی مورفیسمی با استفاده از تکنیک واکنش زنجیرهای پلیمرز طول قطعه محدود (PCR-RFLP) انجام شد. اطلاعات جمع آوری شده از طریق نرم افزار آماری آنالین javastat با استفاده از تست کای اسکوار، با سطح معناداری $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فرکانس ژنوتیپی و آلی بین دو گروه کنترل و بیمار تفاوت معنی داری نشان ندادند. بنابراین، این SNP ها نمی‌توانند به عنوان یک نشانگر زیستی مولکولی مفید برای پیش بینی استعداد ژنتیکی برای اختلال طیف اوتیسم در بیماران ایرانی -آذری باشد.

واژه های کلیدی: اوتیسم، ژن Reelin، پلی مورفیسمی، مارکر مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۹۲۷۳۶، پست الکترونیکی: Ifanid@yahoo.co.uk

مقدمه

نظریه‌های ابتدایی در مورد این اختلال، نقش بیش‌تری را برای عوامل روان‌شناختی قائل بودند. ولی امروزه بیش‌تر جهت‌گیریها به سوی عوامل زیست‌شناختی است. در همین راستا، فول اثتاین و روزین-شیلدلی (۲۰۰۱) در گزارش خود میزان انطباق ناهنجاریها در دوقلوهای یک‌تخمکی اوتیسم را ۸۲ تا ۸۶ درصد و در دوقلوهای دوتخمکی اوتیسم، ۹ تا ۱۰ درصد بیان کرده‌اند که نشان‌دهنده مبنای ژنتیکی اختلال است (۱۴).

اوتیسم نوعی اختلال مغزی مقارن با تولد است که بر نحوه استفاده مغز بر اطلاعات تأثیر می‌گذارد. علت اصلی اوتیسم هنوز شناخته نشده است. برخی پژوهشها نشان می‌دهند که اوتیسم نوعی مشکل فیزیکی است که بر قسمتهایی از مغز که به فرآیند زبان و اطلاعات ناشی از حواس پنج‌گانه می‌پردازد تأثیر می‌گذارد. ممکن است علت آن عدم تعادل برخی عناصر شیمیایی در مغز باشد. در برخی موارد نیز عوامل ژنتیکی تأثیر گذار بوده‌اند (۲۱).

ارتباط این دو پلی مورفیسمی و اختلال طیف اوتیسم پرداخته می‌شود.

مواد و روشها

روش کار: تمام افراد مبتلا به ASD از اوتیسم انجمن تبریز در شمال غربی ایران انتخاب شدند. همه شرکت کنندگان مبتلا به ASD زیر یک ارزیابی دقیق روانپزشکی، سابقه رشد و نمو، و یک بررسی از اطلاعات ارائه شده توسط معلمان و پدر و مادر خود تشخیص داده شدند. این افراد پس از آن مورد بررسی قرار گرفتند و توسط روانپزشک دیگر ارزیابی شدند، و در پایان تنها ۷۴ نفر معیارهای DSM-IV برای ASD نشان دادند. رضایت آگاهانه کتبی و شفاهی از حداقل یکی از والدین از همه شرکت کنندگان به دست آمد، و پروتکل پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسید.

در گروه شاهد، داوطلبان از بیمارستان محلی کودکان در همان محدوده سنی انتخاب شدند. همچنین دقت گردید که آنها عاری از هر گونه مشکلات عصبی، روانی، و یا یادگیری باشند.

در پایان، گروه بیمار مبتلا به اوتیسم شامل (N = ۷۴)، میانگین سنی = ۸,۵۷ و سن محدوده = ۲۴/۳ سال در زمان نمونه‌گیری، ۵۳ پسر و ۱۸ دختر) و گروه کنترل شامل ۸۶ کودک بودند. در زمان نمونه‌گیری رضایت آگاهانه کتبی و شفاهی از حداقل یکی از والدین از همه شرکت کنندگان به دست آمد و پروتکل پژوهش توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسید.

به طور کلی روش تحقیق مورد استفاده در این پژوهش، موردی-شاهدی است. بدین ترتیب، ابتدا از خون افراد مبتلا به طیف اوتیسم و افراد سالم به عنوان گروه شاهد نمونه‌گیری انجام شد و در داخل یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس DNA به روش پروتئیناز K و روش salting out استخراج گردید. جهت تشخیص پلی

ژن Reelin (با نماد *reln*) بر روی کروموزوم شماره ۷ بازوی q نوار ۲۲ (7q22) واقع شده و محصول پروتئینی اش یک پروتئین سیگنال دهنده خارج سلولی است که در توسعه سیستم عصبی مرکزی، شامل مهاجرت نورونی، شکل‌گیری صحیح لایه‌های قشری و سیناپس‌زایی نقش مهمی دارد. مطالعات متعدد حاکی از دخالت پاتولوژیک Reelin یا محصول پروتئین اش در برخی از اختلالات neuropsychiatry از جمله اوتیسم می‌باشد (۱۳). این ژن در توسعه ساختارهای لامیناری نظیر قشر مغز، هیپوکامپ، مخچه و هسته‌های ساقه مغز نقش حیاتی دارد. Reelin لایه‌ای شدن قشر را به وسیله سیگنال دادن توسط رسپتور لیپوپروتئینی با چگالی بسیار پایین و رسپتور 2-apolipoprotein E receptor کنترل می‌کند (۱۵). در افراد اوتیسم بسیاری از مناطق مغز از جمله مخچه، هیپوکامپ، قشر پاریتال و فرونتال شکل غیر عادی دارند (۳، ۷، ۲۳). مطالعات postmortem کاهش در پروتئین Reelin را در چندین ناحیه از مغز نشان داده شده است (۱)، همچنین سطح Reelin در خون، فرونتال و قشر مغز در اختلالات اوتیسمی کاهش می‌یابد (۱۲).

علاوه بر این، *reeler* موش، یک جهش طبیعی است که حامل حذف بزرگ ژن Reelin است، تغییرات نورواناتومیکی در موقعیت نورونها در سراسر قشر مخچه، مخچه، مناطق هیپوکامپ نشان می‌دهد که چنین تغییراتی در مغز افراد مبتلا به اوتیسم نیز یافت می‌شود (۲ و ۸). این اطلاعات بیوشیمیایی و نورواناتومیکی توسط برخی از مطالعات که نشان می‌دهند ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم ژن Reelin و اوتیسم وجود دارد، حمایت شدند (۲۲). این ژن از ۶۵ اگزون و ۶۵ اینترون تشکیل شده و دارای ۳۴ پلی مورفیسمی تک نوکلئوتیدی در اگزونها و اینترنهای مختلف است و تا از پلی مورفیسمی‌های رایج این ژن به اگزون ۲۲ و اینترون ۵۹ مربوط می‌شود که اولی ساختار آمینواسیدی و دومی جایگاه اسپلیسینگ این ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مطالعه حاضر به بررسی

مورفیمی های ناحیه آگزون ۲۲ و اینترون ۵۹ ژن Reelin جهت تشخیص ژنوتیپ ناحیه پلی مورفیمی برش آنزیمی با استفاده از پرایمرهای ویژه ای که برای هر ناحیه طراحی شده بود PCR و سپس با استفاده از آنزیم برشی ویژه جدول ۱- اطلاعات مربوط به پرایمرها و سایز محصولات برشی

SNP	SNP ID and the base change	Amino acid change	Location	Sequence of the forward &reverse primers	Tm	Restriction enzyme (from NEB Inc.)	Alleles and fragment size
1	Rs362691(C/G)	L997v	Exon 22	5'-ACAGTGGAGGAGAGTCATACTG-3' 5'-CACAGTGGAGGAGAGTCATA*CTG-3'	62°C	BsrI	C=138+23 G=161
2	Rs736707(C/T)	-	Intron 59	5'-GCAGGGCTGACAGGTTACAC-3' 5'-TGGTCTCCTCTATCAAAGTTGGC-3'	59°C	BtsI	C=564 T=243+321

نتایج

آنالیز آماری داده‌ها: برای مقایسه فراوانی ژنوتیپی و آلی بین گروه کنترل و بیمار از تست X2 استفاده شد و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. نسبت شاخص و سطح اطمینان ۹۵ درصد برای تعیین رابطه بین متغیر وابسته و مستقل استفاده گردید.

نتایج مربوط به فراوانی ژنوتیپی و آلی در آگزون ۲۲ و اینترون ۵۹ در گروههای کنترل و بیمار در جدولهای زیر آورده شده است.

جدول ۲- فرکانس آلی و ژنوتیپی آگزون ۲۲ (C/G)

rs362691	Case (%) N=74	Control (%) N=88	OR (95% CI)	P-Value
Genotypes				
C/C	0	0		
C/G	16(36.4)	28(49.2)	1.692(0.830-3.449)	0.146
G/G	58(63.6)	60(50.8)		
Alleles				
C	16(10.81)	28(15.90)	0.641(0.259-1.573)	0.290
G	132(89.19)	148(84.09)	1.561(0.636-3.867)	0.289

جدول ۳- فرکانس آلی و ژنوتیپی اینترون ۵۹ (C/T)

rs736707	Case (%)	Control (%)	OR (95% CI)	P-Value
Genotypes				
C/C	41(55.41)	52(60.47)	0.812(0.445-1.482)	0.469
C/T	26(35.13)	28(32.56)	1.122(0.599-2.103)	0.701
T/T	7(8.11)	6(6.98)	1.176(0.37-3.777)	0.762
Alleles				
C	108(72.97)	132(76.74)	0.818(0.411-1.629)	0.539
T	40(27.03)	40(23.26)	1.222(0.614-2.436)	0.539

به طور مشابه، دوتا و همکارانش پلی مورفیمی ناحیه ایترون ۵۹ (rs736707)، آگزون ۲۲ را در یک جمعیت هند مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که هیچ ارتباطی بین پلی مورفیمی این ناحیه با اوتیسم وجود ندارد (۹). از طرف دیگر شارما و همکارانش یک ارتباط مثبت معنی داری بین پلی مورفیمی این ناحیه و با اختلال اوتیسم در آفریقای جنوبی جمعیت دریافتند (۲۶). عدم تجانس بین گروه مورد مطالعه در ویژگیهای بالینی و تعاملات ژن محیط زیست ممکن است مسئول تناقض نتایج باشد. همچنین فرض شده است که اوتیسم یک اختلال ارثی پلی ژنیک است به طوری که اثر تنها یک SNP می تواند ظریف باشد. بنابراین، مطالعات بیشتر، از جمله SNP های بیشتر از ژن Reelin، باید بررسی شود (۱۶).

اگر چه، در مطالعه حاضر، تفاوت قابل توجهی در فراوانی آللی در دو گروه مشاهده نشد اما آلل C در مقایسه با آلل T شایع تر بود. این یافته ها با نتایجی که قبلاً توسط شارما در جمعیت آفریقای جنوبی (۱۶) به دست آمده بود مطابقت دارد. با این وجود، این یافته ها در تضاد با داده های گزارش شده توسط Dutta و همکاران (۹) در جمعیت هند (REF)، سراجی و همکاران در میان خانواده های قفقازی اوتیسم (REF) (۲۴)، و بونور و همکاران (۴) در میان بیماران مبتلا به اوتیسم انتخاب شده از مولکولی مطالعه بین المللی ژنتیکی کنسرسيوم اوتیسم (IMGSAC) خانواده چندگانه از جمعیت اروپا مبتلا به اوتیسم می باشد که در آن آلل C آلل مغلوب در حالی که آلل T آلل غالب شناسایی شده بود.

نتایج این مطالعه هیچ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیمی آگزون ۲۲ (SNP rs362691) و اختلال طیف اوتیسم در جامعه مورد مطالعه نشان نداد (table 1) (OR (CI): 1.692(0.830-3.449), P=0.146). به طور مشابه، مطالعه دوتا (۲۰۰۸) و بونور (۲۰۰۳) نیز ارتباط معنی داری بین پلی مورفیمی آگزون ۲۲ و ابتلا به

همانطوری که از اطلاعات جدول های ۱ و ۲ بر می آید هیچ ارتباط معنی داری بین گروه اوتیسم و کنترل در دو پلی مورفیمی مطالعه شده وجود نداشت ($P>0.05$).

بحث

در طول توسعه مغز در دوران جنینی، پروتئین Reelin توسط سلولهای رتزیوس کاخال در منطقه حاشیه ای ترشح می شود و سیگنالی برای مهاجرت مناسب نورون postmitotic که به تازگی از مناطق بطن تولید شده اند جهت تنظیم مهاجرت عصبی و لامیناسیون مغز و ترویج رشد دندریت و تثبیت تماس سیناپسی برای تشکیل دادن مناطق مغزی متمایز فراهم می کند (۵، ۶، ۱۹ و ۲۷). بیان Reelin در چند اختلال عصبی مانند اسکیزوفرنی، اختلال دو قطبی، سندرم لیزنسفالی، اوتیسم، و غیره (۱۰، ۱۱، ۱۷ و ۱۸) کاهش می یابد. مطالعات بعد از مرگ نشان می دهد که Reelin در مخچه (۴۰ درصد)، فرونتال فوقانی (۷۰ درصد)، و قشر پاریتال (۷۰ درصد) کاهش می یابد. این مناطق مغزی با سه رفتار اصلی که در اوتیسم آسیب می بیند، ارتباط دارد که شامل رفتار اجتماعی، زبان، و رفتارهای تکراری و کلیشه ای است. به علاوه قشر پاریتال و فرونتال برنامه ریزی و سازماندهی رفتار را تحت تأثیر قرار می دهد و با تشخیص زبان و حافظه ارتباط نزدیک دارد (۲). چندین مطالعات ژنتیکی ثابت کرده اند که بین ژن Reelin و احتمال ابتلاء به بیماری اوتیسم ارتباط وجود دارد (۱، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۲۸).

بنابراین اخیراً ما یک مطالعه موردی شاهدهی برای ارزیابی کردن ارتباط بین دو پلی مورفیمی تک نوکلئوتیدی در آگزون ۲۲ و ایترون ۵۹ ژن Reelin و اختلال طیف اوتیسم انجام گرفت. در این مطالعه که شامل ۷۴ کودک مبتلا به طیف اوتیسم و ۸۶ کودک سالم بود هیچ ارتباط معنی داری در فرکانسهای ژنوتیپی و آللی بین دو گروه مشاهده نشده بود.

مطالعه ژنتیک مولکولی بین‌المللی کنسرسيوم اوتيسم (IMGSAC) توسط بونورا و همکاران (۲۰۰۳)، آلل G به عنوان آلل مغلوب شناخته شد (۴) در حالی که در جمعیت آفریقای جنوبی مورد مطالعه توسط شارما و همکاران (۲۶)، آلل G به آلل غالب بود. بنابراین، اختلاف در فرکانس آللی نشان‌دهنده تفاوت‌های نژادی است که ممکن است مسئول نتایج متناقض باشد.

اوتيسم به ترتیب در میان جمعیت هند و در میان نمونه IMGSAC نشان‌نداد (۴ و ۹).

همچنین، در مطالعه حاضر، مشخص گردید که آلل G در مقایسه با آلل C در بیماران آذری و کنترل بالاتر بود. در واقع، آلل غالب است در حالی که C آلل مغلوب در جامعه مورد مطالعه است. در این مطالعه، تفاوت قابل توجهی در فراوانی آللی در دو گروه مشاهده نشد. در مقابل، در میان بیماران مبتلا به اوتيسم انتخاب شده از

منابع

- 1- Ashley-Koch A.E., Jaworski J., M.a. de Q., Mei H., Ritchie M.D., et al. (2007). Investigation of potential gene-gene interactions between APOE and RELN contributing to autism risk. *Psychiatr Genet* 17: 221–226.
- 2- Bailey A., Luthert P., Dean A., et al. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121 (Pt 5):889–905.
- 3- Bauman M.L., Kemper T.L. (1985). *Neurology*, 35: 866–874.
- 4- Bonora E., Beyer K.S., Lamb J.A., et al. (2003). Analysis of reelin as a candidate gene for autism. *Mol Psychiatry* 8:885–892.
- 5- Costa E., Davis J., Grayson D.R., Guidotti A., Pappas G.D., et al. (2001). Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. *Neurobiol Dis* 8: 723–742.
- 6- Costa E., Chen Y., Davis J., Dong E., Noh J.S., et al. (2002). REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. *Mol Interv* 2: 47–57.
- 7- Courchesne E. et al. (2001). *Neurology*, 57: 245–254.
- 8- D’Arcangelo G., Miao G.G., Chen S.C., et al. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374:719–723.
- 9- Dutta S., Sinha S., Ghosh S. (2008). Genetic analysis of reelin gene (RELN) SNPs: no association with autism spectrum disorder in the Indian population. *Neurosci Lett* 441:56–60.
- 10- Fatemi S.H., Earle J.A., McMenomy T. (2000). Reduction in reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression, *Mol. Psychiatr.* 57, 654-663.
- 11- Fatemi S.H., Sary J.M., Halt A.R., Realmuto G.R. (2001). Dysregulation of Reelin and Bcl-2 Proteins in Autistic Cerebellum. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 31, 6.
- 12- Fatemi S.H., Sary J.M., Egan E.A. (2002). Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. *Cell Mol Neurobiol*, 22:139–15.
- 13- Fatemi S.H., Snow A.V., Sary J.M., et al. (2005). Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry*, 57:777–787.
- 14- Folstein S.E., Rosen-Sheidley B. (2001). Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet*, 2(12):943–55.
- 15- Hiesberger T., et al. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, 24: 481–489.
- 16- He Y., Xun G., Xia K., et al. (2011). No significant association between RELN polymorphism and autism in case-control and family-based association study in Chinese Han population. *Psychiatry Res* 187:462–464.
- 17- Hong S.E., Shugart Y.Y., Huang D.T., Shahwan S.A., P.E. Grant, Hourihane J.O.B., artin N.D.T.M., et al. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia associated with human reelin mutations, *Nat. Genet.* 26, 93-96.
- 18- Impagnatiello F., A.R. Guidotti, C., Pesold, et al. (1998). A decrease of reelin expression as a

- putative vulnerability factor in schizophrenia, Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 15718-15723.
- 19- Keller F., Persico A.M. (2003). The neurobiological context of autism. *Mol Neurobiol* 28: 1–22.
- 20- Kelemenova S., Schmidtova E., Ficek A., Celec P., Kubranska A., et al. (2010) Polymorphisms of candidate genes in Slovak autistic patients. *Psychiatr Genet* 20: 137–139.
- 21- Mendelsohn N. J., Schaefer B. G., (2008). *Semin Pediatr Neurol*, 15: 27-31.
- 22- Persico A.M., D'Agruma L., Maiorano N., et al. (2001). Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Mol Psychiatry*, 6:150–159.
- 23- Saitoh O., et al. (2001). *Brain*, 124: 1317–1324.
- 24- Serajee, F.J., Zhong, H., Mahbulul Huq, A.H., (2006). Association of Reelin gene polymorphisms with autism. *Genomics*, 87:75–83.
- 25- Skaar D.A., Shao Y., Haines J.L., Stenger J.E., Jaworski J., et al. (2005). Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Mol Psychiatry* 10: 563–571.
- 26- Sharma J.R., Arieff Z., Gameeldien H., et al. (2013). Association analysis of two single-nucleotide polymorphisms of the RELN gene with autism in the South African population. *Genet test mol biomarkers*, 17(2):93–8.
- 27- Tissir F., Goffinet A.M. (2003). Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4: 496–505.
- 28- Zhang H., Liu X., Zhang C., Mundo E., Macciardi F., et al. (2002). Reelin gene alleles and susceptibility to autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 7: 1012– 1017.22: 139–152.

Association of two common single nucleotide polymorphisms of Reelin gene, Intron 59 (C/T) and exon 22 (C/G), with autism spectrum disorder in a Population Sample of Children of Iranian-Azeri

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex childhood neuropsychiatric disorder that is characterized by deficits in verbal and non-verbal communication, reciprocal social interactions, stereotypic behaviors, interests, and activities. During embryonic brain development, Reelin provides signal for proper migration of newly generated postmitotic neurons. Since the Reelin plays a crucial role in these migratory processes. Therefore, reelin gene is considered as a potential candidate gene for autism. In this study, we aimed to investigate the probable association of this polymorphisms with autism spectrum disorder in Iranian-Azeri population. In this Case-control study, we recruited 74 patients with Autism spectrum disorder and 88 healthy controls. Genomic DNA isolated from blood leukocytes by the proteinase K and salting out method. SNP genotyping was carried out by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. The collected data were analyzed through javastat online statistics software, using Chi-square (χ^2), with a significance level of 0.05. The allele and genotype frequencies did not show significant difference between cases and controls ($p > 0.05$). Therefore, this SNPs could not be used as a useful molecular biomarker to predict genetic susceptibility for autism spectrum disorder in Iranian-Azeri patients.

Key words: Autism, Reelin gene, Polymorphism, Molecular marker