همراهی الل T پلی‌مورفیسم جایگاه ۶۷- پروموتر ژن انتقال‌دهنده دوپامین (DAT1) با اسکیزوفرنی

دکتر مینا اوحدی
استادیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

دکتر فربد فدایی
استادیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

نازلی خدایاری
کارشناس ارشد ژنتیک

دکتر علیرضا رحیمی
استاد دانشگاه علوم پزشکی همدان

دکتر حسین نجم‌آبادی
دانشیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

مقدمه: نقص در سامانه‌ی نقل و انتقال دوپامین، می‌تواند به عنوان یکی از علل بیماری اسکیزوفرنی مطرح شود. ترانسپورتر دوپامین *(DAT1)* بازجذب دوپامین از انتهای سیناپس‌های عصبی را بر عهده دارد، بنابراین نقش مهمی را در تنظیم نقل و انتقال دوپامین ایفا می‌کند. در این تحقیق، همراهی احتمالی پلی‌مورفیسم *67T/A*-واقع در پروموترژن *DAT1* با بیماری اسکیزوفرنیا به وسیله روش توصیفی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش: یکصد بیمار مبتلا به اسکیزوفرنیا (طبق معیارهای *DSM-IV*) برحسب مصاحبه بالینی، و یکصد نفر گروه شاهد متناسب و غیربیمار از نظر ژنوتیپ‌ها و درصد الل‌های مربوط به پلی‌مورفیسم مذکور بررسی شدند.

یافته‌ها: درصد ژنوتیپ‌ها در گروه بیمار و شاهد به ترتیب، به قرار زیر است:

$TT=۱۲٪$، $AT=۵۹٪$، $AA=۲۹٪$

$TT=۵٪$، $AT=۳۸٪$، $AA=۵۷٪$

نتیجه: ارزش P *(Pvalue)* به‌دست آمده در تحقیق کمتر از ۰/۰۰۰۳ می‌باشد. این یافته‌ها برای نخستین بار در جهان مدرکی دال بر ارتباط پلی مورفیسم واقع در پروموتر ژن *DAT1*، با سبب‌شناسی اختلال اسکیزوفرنیا در جمعیت مورد بررسی را نشان می‌دهد. برای ارزیابی بیشتر اهمیت یافته‌های ما پژوهشهای بیشتری با نمونه‌های مستقل و بررسیهای همراهی[1]، بر پایه خانواده ضروری است.

واژگان‌کلیدی: *DAT1* / **پروموتر / اسکیزوفرنی / ارتباط / دوپامین / پلی مورفیسم**

1-Association

مقدمه

ترانسپورتر دوپامین (DAT) به عنوان یکی از اصلی‌ترین تنظیم کننده‌های میزان نقل و انتقال دوپامین، در فضای بین سیناپسی عمل می‌کند؛ و بیان ژن کدکننده‌ی این پروتئین، فقط محدود به سیستم عصبی مرکزی است؛ که در نورون‌های دوپامینی مغز میانی صورت می‌گیرد. عدم تعادل در فعالیت سیستم دوپامینرژیک با اختلالات عصبی روانی زیادی مرتبط است که، از آن جمله می‌توان به اسکیزوفرنی، بیش‌فعالی[1]، اختلالات دوقطبی و پارکینسون اشاره کرد(۱و۲و۳). در مطالعاتی که راجع به همراهی ژن DAT1 واقع بر روی کروموزوم شماره‌ی ۵ انجام شده است، اکثر یافته‌های کاربردی نشان داده که یک پلی‌مورفیسم تکرارهای متغیر[2] داخل ناحیه ۳ ترجمه نشدنی وجود دارد؛ که همراهی آن با بیماری بیش‌فعالی در اکثر جمعیت‌ها گزارش شده است (۴و۵و۸).

با وجود این، گزارشهای مختلف حاکی از آن است که هیچ‌گونه همراهی (۶و۷و۸و۹) و یا پیوستگی (۱۰و۱۱) بین این پلی‌مورفیسم و بیماری اسکیزوفرنی وجود ندارد. اخیراً یک پلی‌مورفیسم در موقعیت ۶۷ - داخل پروموترژن DAT1 شناسایی شده است(۱۲) که نتایج نشان می‌دهد، الل‌های این پلی مورفیسم تا ۲ برابر در بیان ژن با هم اختلاف دارند(۱۳). نکته جالب توجه این است که ۱۸۰bp از ناحیه پروموتوژن، توالی‌هایی است که در موش و انسان بسیار حفظ شده است؛(۱۴و۱۵) و در همه رده‌های سلولی مطالعه شده توسط Sacchetti و همکارانش، ژن DAT1 دارای ناحیه ۷۹۸ - پروکسیمال پروموتر، ۱۰ تا ۱۵۰ برابر فعال‌تر از ژن مصنوعی بدون پروموتر بوده است.

به علت اهمیت این پلی‌مورفیسم و نقش آن در تنظیم تعادل دوپامینی، بر آن شدیم احتمال همراهی این پلی‌مورفیسم با بیماری اسکیزوفرنی را در گروهی از بیماران ایرانی مبتلا به اسکیزوفرنی بررسی کنیم.

نتایج به دست آمده، همراهی الل T پلی‌مورفیسم T/A ۶۷ - و اسکیزوفرنی را در جمعیت ایرانی مورد بررسی نشان می‌دهد. این یافته برای اولین بار در دنیا همراهی بین پلی‌مورفیسم واقع در پروموترژن DAT1 را با اسکیزوفرنی نشان می‌دهد.

مواد و روش‌ها

الف ـ بیماران

در این تحقیق، تعداد ۱۰۰ نفر مرد ایرانی غیروابسته که همگی دچار بیماری اسکیزوفرنی بودند، از مرکز روان‌پزشکی رازی در تهران و بیمارستان سینا در همدان برای نمونه‌گیری انتخاب شدند. معیارهای DSM-IV(۱۶) برای تشخیص اسکیزوفرنیا در کلیه بیماران به کار رفت، و براساس معاینات انجام شده وجود هر گونه بیماری روانی یا عصبی دیگر در آنها رد شد. ۱۰۰ نفر مرد ایرانی غیروابسته نیز به عنوان گروه کنترل، برای مقایسه نتایج، به روش تصادفی انتخاب شدند. یافته‌های جمعیت نگاری این افراد نیز که شامل شجره‌نامه، محل تولد و قومیت آنان بود، ثبت شد. دوگروه فوق از نظر جنس، سن و قومیت با هم هماهنگ شدند. میانگین سن بیماران و گروه کنترل به ترتیب ۸±۴۰/۹ و ۵/۴±۴۵ بود. به منظور حذف تداخل اثر احتمالی جنسیت در این تحقیق، همه بیماران و گروه کنترل مذکر انتخاب شدند و مصاحبه‌های بالینی نسبت به پلی‌مورفیسم T/A ۶۷ - به صورت کور انجام شد. از همه شرکت‌کنندگان در این آمارگیری رضایت‌نامه کتبی و از مؤسسات و بیمارستانهای مذکور رضایت‌نامه رسمی دریافت شد.

ب ـ تعیین ژنوتیپ

۱۰ میلی لیتر خون از افراد مورد مطالعه دریافت شد و DNA آنها به روش استاندارد استخراج گردید، و قطعه حاوی پلی‌مورفیسم T/A۶۷ - توسط واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز[3] تکثیر شد(۱۲).

۱۰۰ نانوگرم از DNA تکثیر شده به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض ۱ واحد آنزیم ASP1[4] قرار گرفت. DNA هضم شده توسط آنزیم، به وسیله الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل آمید ۴% مورد بررسی قرار گرفت و به وسیله نیترات نقره زنگ‌آمیزی شد.

ج ـ آنالیز داده‌ها

برای مقایسه فراوانی الل‌ها و ژنوتیپ‌های به دست آمده در بین دو گروه، از روش مربع کای (χ^2) استفاده شد. براساس قانون بونفرونی[5]، ارزش p کمتر از ۰/۰۱۱ بود و ارتباط معنی‌دار قلمداد شد.

1-ADHD 2-VNTR
3-PCR
۴- یک واحد آنزیم عبارت است از مقداری آنزیم که ۱ میکروگرم DNA را در مدت یک ساعت هضم می‌نماید. آنزیم ASP1 از کمپانی Roche در آلمان خریداری گردید. این آنزیم جزو آنزیم‌های Sticky end می‌باشد.
5-Bonferroni

یافته‌ها

پلی‌مورفیسم ۶VT/A - واقع در پروموترژن DAT1 در ۱۰۰ نفر بیمار غیروابسته و ۱۰۰ نفر گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ گروه بیمار به قرار زیر مشاهده شد:

AA=۲۹%, AT=۵۹%, TT=۱۲%

و ژنوتیپ‌ها در گروه شاهد به ترتیب زیر بود:

AA=۵۷%, AT=۳۸%, TT=۵%

که بهای P به دست آمده در مقایسه دو گروه ذکر شده کمتر از ۰/۰۰۰۳ بوده و معنی‌دار می‌باشد. فراوانی الل T در گروه بیمار ۱/۷ برابر بیشتر از گروه کنترل مشاهده شد. هیچ‌گونه ارتباطی بین سن شروع بیماری (۵۲ بیمار قبل از ۲۰ سالگی و ۴۸ بیمار پس از ۲۰ سالگی) و فراوانی الل T در بیماران مشاهده نشد ($P \leq 1/00$).

جدول شماره ۱ - توزیع ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم 67T/A- ژن DAT1 در ۱۰۰ نفر بیمار مبتلا به اسکیزوفرنی و ۱۰۰ نفر گروه کنترل.

	AA(%)	AT(%)	TT(%)	A(%)	T(%)	Total
Normal	۵۷	۳۸	۵	۷۶	۲۴	۱۰۰
Schizophrenia	۲۹	۵۹	۱۲	۵۸/۵	۴۱/۵	۱۰۰

بحث

ارتباط فاکتورهای ژنتیکی با علت‌یابی بیماری اسکیزوفرنی در بسیاری از موارد مورد بررسی قرار گرفته است. در تحقیق ارائه شده، ارتباط بین پلی‌مورفیسم واقع در پروموترژن DAT1 (۶VT/A-) به عنوان یک فاکتور دخیل در بیماری، به روش مطالعه شاهد/موردی[1] مشخص گردید. گزارشهای قبلی هر گونه ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم تکرارهای متغیر[2] واقع در ۳ ژن و این بیماری را رد کرده‌اند. چنانچه الل تکرارهای متغیر در حالت عدم تعادل و پیوستگی[3] با پلی‌مورفیسم‌های عامل نباشند، بررسی این پلی‌مورفیسم‌ها نشان دهنده نتایج منفی در مطالعات همراهی و آنالیز پیوستگی است.

بعلاوه پلی‌مورفیسم تکرارهای متغیر واقع در منطقه ۳ ژن هیچ تأثیری بر فنوتیپ ترانسپورتر دوپامینی، و یا روی نسخه‌برداری این ژن در انسان ندارد(۱۷). محل حساس قرارگیری این پلی‌مورفیسم ۶VT/A - که از مناطق بسیار حفظ شده پروموتر است، مدرکی دال بر اهمیت این پلی‌مورفیسم در بیان ژن می‌باشد، به طوری که الل T میزان بیان ژن را دو برابر افزایش می‌دهد(۱۳).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق فراوانی الل T در پلی‌مورفیسم ۶VT/A -، در افراد بیمار ۱/۷ برابر بیش‌تر از افراد کنترل است. و بیانگر این مطلب است که، پلی‌مورفیسم این لوکوس ژنی می‌تواند یکی از علل بیماری اسکیزوفرنی باشد. آلل T این پلی‌مورفیسم بیان ژن DAT1 را دو برابر افزایش می‌دهد. این یافته تأییدی است، برای فرضیه دوپامینرژیک در بیماری اسکیزوفرنی که، بر طبق آن یکی از علل عمده‌ی اسکیزوفرنی اختلال در تعادل میزان دوپامین در سیستم عصبی مرکزی است. پلی‌مورفیسم‌های دیگری نیز در ناحیه انتهایی پروموتر و در بین اینترونها گزارش شده است (۱۲و۱۸) که ارزش بررسی هاپلوتایپ را در بیماریهای روانی دارند. این در حالی است که بیشتر فعالیت بیانی ژن به ۲۰۰bp پروموتر ژن باز می‌گردد. از طرفی درجه حفظ شدگی بسیار بالای توالی‌ها در انسان و موش که ۱۸۰bp اول پروموتر است، و میزان تفاوت بیان ژن در دو الل متفاوت پلی‌مورفیسم ۶VT/A - مؤید این نکته است که، این پلی‌مورفیسم می‌تواند مهمترین هدف برای بررسی و آنالیز مطالعات همراهی باشد. انجام تحقیقات بیشتر، دخالت این پلی‌مورفیسم را در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی در سایر جمعیت‌ها با تاریخچه ژنتیکی متفاوت تأیید خواهد کرد.

1-Case/Control 2-VNTR
3-Linkage Disequilibrium

1-Bannon MJ, Michelhaugh SK. Wang J, Sacchetti P: The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potcntial involvement in ncuropsychiatric disorders. European Neuropsychopbarmacology,2001,11,449-455.

2-Cooper JR, Bloom FE, Roth RH, (Eds): The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford Univ. Press. New York, 1996,p510.

3-Jellinger Ka, Pathology of Parkinson's discasc. Changes other than the nigrostriatal pathway. Mol Chem Neruopathol, 1991, 14; 153-157.

4-Cook Jr FH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL: Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. Am J Hum Genet, 1995,56;993-998.

5-DiMaio S. Grizenko N, Joober R: Dopamine genes and attention-deficit hyperactivity disorder a review. J Psychiatry Neurosci, 2003, 28;27-38.

6-Daniels J, Williams J, Ashcrson P, McGuffin P, Owen M: No association between schizophrenia and polymorphisms within the genes for Debrisoquine 4- hydroxylase (CYP2D6) adn the dopamine transporter. Am J Med Genet, 1995,60;85-87.

7-Pean BS, Laurent C, Camion D, Lay M, Thibaut F, Dolfus S, Petit M, Samolyk D, D'Amato T, Martinez M, Mallet J: No evidence for linkage or association between the dopamine transporter gene and schizophrenia in a French population. Psychiatr Rcs, 1995, 59;1-6.

8-Georgicva L, Dimitrova A, Nikolov I. Koleva S, Tsvetkova R., Owen MJ, Toncheva D, Kirov G: Dopamine transporter gene (DAT1) VNTR polymorphism in major psychiatric disorders: family-based association study in the Bulgarian population. Acta Psychiatr Scand, 2002, 105; 396-9.

9-Hauser J, Kapelski P, Czerski PM, Godlewski S, Dmitrzak-Weglarz M, Twardowska K, Rybakowski JK: [Lack of association between VNTR polymorphism of DAT gene and schizophrenia]. Psychiatr Pol, 2002, 36; 403-12.

10-Byerlcy WF, Coon H, Hoff M, Holik J, Waldo M, Frccdman R, Caron MG, Giros B: Human dopamine transporter gene not linked to schizophrenia in multigenerational pedigrees. Hum Hered, 1993, 43;319-322.

11-Persico Am, Wang 2W, Black DW, Andreasen NC, Uhl GR, Crowe RR: Exclusion of close linkage of the dopamine transporter gene with schizophrenia spectrum disorders. Am J Psychiatr, 1995, 152;134-136.

12-Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkun G, Riedercr P, Stober G: The human dopamine transporter gene; the 0' flanking region reveals fine diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. Neuroscinece Letters, 2001, 297;125-128.

13-Greenwood TA, Kclsoe JR: Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. Genomics, 2003,82;511-519.

14-Sacchetti P, Brownschidle LA., Granneman JG, Bannon MJ: Characterization of the 0-flanking region of the human dopamine transporter gene. Mol Brain Res, 1999, 74;167-174.

15-Donovan DM, Vanderbergh DJ, Perry MP, Bird GS, Ingorsoll R, Nanthakumar E, Uhl GR: Human and mouse dopamine transporter genes: conservation of 0-flanking sequence elements and gene structures, Brain Res Mol Brain Res, 1995,30;327-335.

16-American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,4th ed. (DSM-IV). 1994.APA, Washington DC.

17-Martinez D, Gelemter J, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Kegeles L, Innis RB, Laruelle M: The variable number of tandem repcats polymorphiam of the dopamine transporter gene is not associated with significant change in dopamine transporter phenotype in humans. Neuropsychopharmacology, 2001,24;553-60.

18-Vandcnbergh DJ, Thompson MD, Cookk Eh, Bendahhou E, Nguyen T, Krasowski MD, Zarrabian D, Comings D, Sellers EM, Tyndale RF, George SR, O'Dowd BF, Uh1 GR: Human dopamine transporter gene: coding regine conservation among normal, Fourcue's disorder, alcohol dependence and attention-deficit hyperactivity disorder populations. Mol Psychiatry, 2000, 5:283-92.