

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین گروه زیست‌شناسی
پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد «M.Sc»
گرایش سلولی و مولکولی

عنوان:

بررسی جهش‌های شایع ژن (MAPT , APOE) در
بیماران ایرانی مبتلا به آلزایمر دیررس

فهرست مطالب:

عنوان	صفحه
خلاصه فارسی	۱
فصل اول : کلیات پژوهش	
۱-۱: بیان مسئله	۳
۱-۲: اهمیت و ضرورت	۸
۱-۳: تعریف واژه‌ها	۹
۱-۳-۱: آلزایمر	۹
۱-۳-۲: ژن APOE	۱۰
۱-۳-۳: ژن MAPT	۱۰
۱-۳-۴: NFTs :	۱۰
۱-۳-۵: β APP (β -Amyloid Precursor Protein) :	۱۱
۱-۴: هدف از اجرای تحقیق	۱۱
۱-۵: فرضیه های پژوهش	۱۱
۱-۶: سوال پژوهش	۱۱
فصل دوم: مروری بر متون گذشته	
۲-۱: تاریخچه و کشف بیماری آلزایمر	۱۴
۲-۲: پاتولوژی بیماری	۱۵
۲-۳: انواع بیماری و ژنهای دخیل در بیماری آلزایمر	۱۷
۲-۳-۱: بیماری آلزایمر با شروع زودرس	۱۸
۲-۳-۲: بیماری آلزایمر با شروع دیررس	۲۲
۲-۳-۳: ژن APOE :	۲۲

- ۲۵..... (Microtule Associated Protein Tau) MAPT ژن ۲-۳-۴
- ۲۹..... ۲-۴ : بررسی تحقیقات انجام شده

فصل سوم: مواد و روش ها

- ۳۵..... ۳-۱: روش شناسی تحقیق
- ۳۵..... ۳-۱-۱ : نوع مطالعه
- ۳۵..... ۳-۱-۲ : جامعه آماری
- ۳۵..... ۳-۱-۳ : معیار DSM-IV
- ۳۷..... ۳-۱-۴ : معیارهای انتخاب بیماران
- ۳۷..... ۳-۱-۵ : روش جمع آوری دادهها
- ۳۷..... ۳-۱-۵ : تعریف عملیاتی متغیرها و مقیاس اندازهگیری
- ۳۷..... ۳-۱-۶ : ملاحظات اخلاقی
- ۳۸..... ۳-۲: روش اجرا
- ۳۸..... ۳-۲-۱ : استخراج DNA
- ۴۱..... ۳-۲-۲: روش استخراج DNA با استفاده از کلروفرم:
- ۴۲..... روش تهیه محلولهای مورد نیاز جهت استخراج DNA:
- ۴۵..... ۳-۳: سنجش کیفیت و کمیت DNA
- ۴۵..... ۳-۳-۱ : سنجش کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ
- ۴۵..... ۳-۳-۲ : ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به کمک ژل آگارز (الکتروفورز افقی)
- ۴۸..... ۳-۴ : ژنوتایپ کردن نمونه ها (ژنوتایپینگ)
- ۵۲..... ۵-۳: آنالیز آماری
- ۵۵..... مشخصات افراد شرکت کننده در مطالعه

فصل چهارم: نتایج

- ۵۵..... ۴-۱: تجزیه و تحلیل آماری برای پلی مورفیسم (G/A) rs ۲۴۲۵۵۷ ژن MAPT
- ۵۵..... ۴-۱-۱: مقایسه ژنوتیپ های پلی مورفیسم (G/A) rs ۲۴۲۵۵۷ ژن MAPT در دو گروه بیمار و سالم

- ۴-۱-۲: مقایسه آلل های پلی مورفیسم (rs ۲۴۲۵۵۷ G/A) ژن MAPT در دو گروه بیمار و سالم ۵۶
- ۴-۲: تجزیه و تحلیل آماری برای پلی مورفیسم ژن APOE در دو گروه بیمار و سالم ۵۶
- ۴-۲-۱: مقایسه ژنوتیپهای پلی مورفیسم (rs ۴۲۹۳۵۸) و (rs ۷۴۱۲) ژن APOE در افراد ۲ ε ۵۶
- APOE ε۴ و APOE در دو گروه بیمار و سالم ۵۶
- ۴-۲-۲: مقایسه آلل های پلی مورفیسم ژن APOE در دو گروه بیمار و سالم ۵۷
- ۴-۳ (بررسی اثر متقابل ژنوتیپ های پلی مورفیسم (rs ۲۴۲۵۵۷ G/A) ژن MAPT با ژنوتیپ های ژن APOE ۵۸
- ۴-۴ : نتایج حاصل از PCR قطعات مورد نظر در ژن های MAPT و APOE ۵۸

فصل پنجم: بحث و پیشنهادات

- ۵-۱ (بحث ۶۱
- ۵-۲ (نتیجه گیری ۶۲
- ۵-۲-۱ (نتایج پلی مورفیسم rs242557(G/A مربوط به ژن MAPT ۶۲
- ۵-۲-۲ (نتایج پلی مورفیسم (rs ۴۲۹۳۵۸) و (rs ۷۴۱۲) مربوط به ژن APOE ۶۳
- ۵-۳ (پیشنهادات ۶۴

منابع

- ۶۶ REFERENCE:
- ۷۳ Introduction:

فهرست جداول:

<u>عنوان</u>	<u>صفحه</u>
جدول ۳-۱ مشخصات کلی پرایمرها	۴۸
جدول ۳-۲	۵۰
جدول ۳-۳ برنامه مورد استفاده جهت انجام PCR ژن MPT	۵۱
جدول ۴-۱-۱: بررسی توزیع ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و کنترل	۵۵
جدول ۴-۱-۲: بررسی همسانی توزیع آلل ها در دو گروه بیمار و سالم	۵۶
جدول ۴-۲-۱: بررسی توزیع ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و کنترل	۵۷
جدول ۴-۲-۲: بررسی همسانی توزیع آلل ها در دو گروه بیمار و سالم	۵۷

فهرست شکل ها:

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱) در این شکل نورو ن های سا لم با نورو نه ای دار ای شاخص های بیماری آلزایمر مقایسه شده است	۳
شکل ۱-۲: در این شکل ایزوفر م های گوناگون تائو به نمایش در آمده اند.	۷
شکل ۲-۱: پلاک های پیری آمیلوئید و NFT مشاهده شده در مغز بیمار ان مبتلا به آلزایمر	۱۴
شکل ۲-۲: سیستم لیمبیک و نواحی در گیر در بیماری آلزایمر	۱۶
شکل ۴-۴-۱: محصول PCR مربوط به ژن MAPT، همانگونه که مشاهده می شود، طول قطعه ی کنترل	
، موتانت و نرمال به ترتیب ۳۴۰، ۱۶۷، ۲۲۸ نو کلو تید می باشند.	۵۹
شکل ۴-۴-۲: محصول PCR مربوط به ژن APOE در دو جایگاه (لوکوس) ۱۱۲ و ۱۵۸.	۵۹

چکیده :

مقدمه : بیماری آلزایمر یک اختلال مولتی فاکتوریال بوده است و شایع ترین عامل دمانس در جهان می باشد. بنابراین قویترین فاکتور خطر برای ابتلا به بیماری آلزایمر رسیدن به سن پیری می باشد. از آنجا که یکی از شاخص های بیماری آلزایمر گره های نوروفیبریلاری درون سلولی (متشکل از فیلامنت های شدیداً فسفریله تائو) می باشد و با توجه به اینکه ژن MAPT کدکننده پروتئین تائو است و این پروتئین با بیماری آلزایمر در ارتباط مستقیم است بنابراین پلی مورفیسم شایع rs242557 (G/A) ژن MAPT می تواند با ریسک ابتلا به بیماری آلزایمر ارتباط داشته باشد و APOE هم یک ریسک فاکتور برای این بیماری شناخته شده است. بنابراین رابطه بین بیماری آلزایمر و تشکیل گره های نوروفیبریلاری انکار ناپذیر است.

روش کار: در این مطالعه پلی مورفیسم rs242557 (G/A) در ژن MAPT و پلی مورفیسم 429358 rs و rs7412 در ژن APOE در 57 فرد سالم و 50 فرد بیمار به روش Tetra Arms PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها : در پلی مورفیسم rs242557 (G/A) در ژن MAPT، فراوانی ژنوتیپ AG و آلل G در افراد بیمار به طور معناداری از افراد سالم بیشتر بود، (به ترتیب 64٪ و 36٪ در برابر 21٪ و 22٪ با $Pvalue \leq 0.01$). در پلی مورفیسم 429358 rs و rs7412 در ژن APOE، فراوانی ژنوتیپ 44/44 و آلل 44 در افراد بیمار به طور معناداری از افراد سالم بیشتر بود. (به ترتیب 38/4٪ و 57/7٪ در برابر 3/8٪ و 28/8٪ با $Pvalue \leq 0.009$).

نتیجه گیری : به نظر می رسد که در پلی مورفیسم rs242557 (G/A) در ژن MAPT در جمعیت ایرانی، ژنوتیپ AG و آلل G در این جمعیت دارای نقش ریسک فاکتوری برای بیماری آلزایمر است. به نظر می رسد که در پلی مورفیسم 429358 rs و rs7412 در ژن APOE، در جمعیت ایرانی، ژنوتیپ 44/44 و آلل 44 در این جمعیت دارای نقش ریسک فاکتوری برای بیماری آلزایمر است.

واژه های کلیدی : بیماری آلزایمر، ژن MAPT، ژن APOE، گره های نوروفیبریلاری

فصل اول:

کلیات تحقیق

۱-۱: بیان مسئله :

بیماری آلزایمر^۱ شایع ترین بیماری تخریب کننده عصبی^۲ می باشد (۱) که از نظر ژنتیکی هتروژن بوده و تاکنون بیش از ۲۶ میلیون نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا شده اند (۳ و ۲).
بیماری آلزایمر از نظر بالینی، با اختلالات شناختی، اختلالات زبانی و مهارت های حرکتی و تغییرات رفتاری همراه است (۲) و درگیر کننده مناطقی خاص از مغز از جمله لوب های گیجگاهی، هیپوکامپ، بخشی از کورتکس و بخش کوچکی از لوب پیشانی^۴ می باشد (۴) و از نظر پاتولوژیکی با وجود پلاک های پیری خارج سلولی^۵ و گره های داخل سلولی نوروفیبریلاری^۶ و فقدان ارتباطات سیناپسی درون کورتکس انتورینال^۷ مشخص می شود (۵).

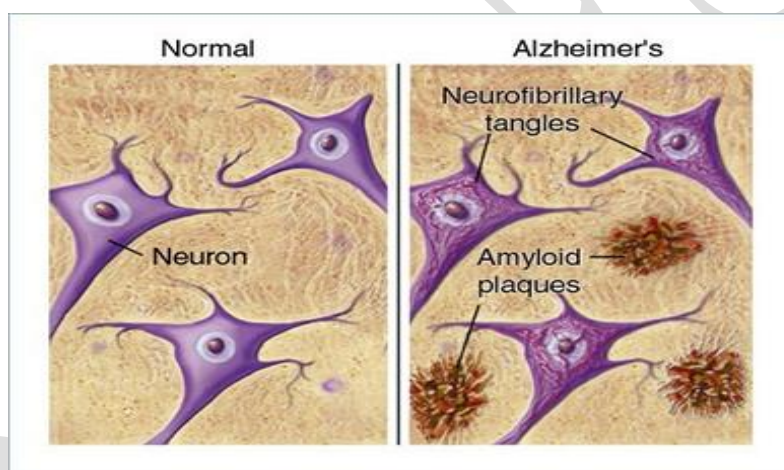


Figure 1. Abnormal pathology characteristic of Alzheimer's disease. Illustration courtesy of Alzheimer's Disease Research, a program of the American Health Assistance Foundation. © 2012. <http://www.ahaf.org/alzheimers>

شکل ۱-۱) در این شکل نورون های سالم با نورون های دارای شاخص های بیماری آلزایمر مقایسه شده است

¹ -Alzheimers disease

² -neurodegenerative

³ -temporal lobes

⁴ -frontal

⁵ -Extracellular Senile Plaques(ESPs)

⁶ -Intracellular Neurofibrillary Tangles(NFTs)

⁷ -Entorhinal

که همانگونه که ملاحظه می‌شود در نورون‌های آلزایمری پلاک‌های بتا آمیلوئیدی خارج سلولی و گره‌های نوروفیبریلاری داخل سلولی که از شاخص‌های بیماری آلزایمر می‌باشد به خوبی قابل مشاهده می‌باشد.

پلاک‌های پیری از رشته‌های ۸ نانومتری از پپتیدهای ۴۲-۴۰ اسید آمینه‌ای به نام آمیلوئید بتا درست شده‌اند که از پروتئولیز یک پروتئین بزرگتر به نام پروتئین پیش ساز آمیلوئید^۱ حاصل می‌شوند (۶و۵). شکستن APP توسط دو پروتئاز به نام بتا -سکرتاز^۲ و گاما -سکرتاز^۳ سبب تولید پپتید آمیلوئید بتا می‌شود که سریعاً به صورت فیبریل‌هایی تجمع می‌یابند. دو پروتئین مرتبط با بیماری آلزایمر به نام های پرسینیلین^۴ و پرسینیلین^۵ از اجزاء کاتالیتیک گاما-سکرتاز می‌باشند (۵).

گره‌های داخل سلولی نوروفیبریلاری از رشته‌هایی درست شده‌اند که ترکیب عمده آنها از پروتئینی به نام تائو^۶ می‌باشد که پروتئینی متصل شونده به میکروتوبول^۷ می‌باشد. واکنش دینامیک بین پروتئین تائو و میکروتوبول‌ها توسط فسفریلاسیون تنظیم می‌شود. تائوی فسفوریل شده در مقایسه با تائوی غیر فسفوریل شده تمایل چسبندگی پایین‌تری به میکروتوبول‌ها دارد (۷). میزان فسفریلاسیون در تائوی جدا شده از گره‌های نوروفیبریلاری چندین برابر بیشتر از تائوی طبیعی می‌باشد (۸). پروتئین تائو به فیلامنت‌های اکتین^۹ و اسپکترین^۸ متصل می‌شود که از طریق این واکنش‌ها پروتئین‌های تائو احتمالاً در میا نکش میکروتوبول‌ها با سایر اجزای اسکلت سلولی نظیر نوروفیلامنت‌ها اثر می‌گذارند. در انواعی از بیماری‌های نورودژنراتیو (به جز آلزایمر) که در مجموع به آنها تائوپاتی‌ها^{۱۰} اطلاق می‌شود گره‌های نوروفیبریلاری تجمع می‌یابد بدون اینکه رسوبات بتا آمیلوئیدی دیده شود و بر اساس نوع تائوی اجتماع یافته که به عنوان بار کد^{۱۱} می‌کنند پنج نوع تائو پاتی طبقه بندی شده است (۹).

^۱-Amyloid beta

^۲-Amyloid precursor protein

^۳- β -secretase

^۴- γ -secretase

^۵-Tau protein

^۶-Microtubule Associated Proteins(MAPT)

^۷-Actine

^۸-Spectrin

^۹-Taupathies

^{۱۱}-Bar code

بیماری آلزایمر بر اساس سن شروع بیماری به انواع زودرس^۱ و دیررس^۲ تقسیم می‌شود که در شکل زودرس (آلزایمر خانوادگی) سن شروع بیماری پایین تر از ۶۵ سال است در حالی که در شکل دیررس سن شروع بیماری بالاتر از ۶۵ سال می‌باشد (۱۰). عمده موارد بیماری از نوع دیررس (اسپورادیک) می‌باشد (۱۱) به نحوی که بیش از ۹۷٪ بیماری آلزایمری از نوع دیررس می‌باشد و تنها ۳٪ بیماران آلزایمری از نوع زودرس می‌باشد (۱۲).

چندین ژن دخیل در ایجاد بیماری آلزایمر زودرس شناسایی شده‌اند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به پرسینیلین ۱ بر روی کروموزوم ۱۴، پرسینیلین ۲ بر روی کروموزوم ۱ و پروتئین پیش ساز بتا آمیلوئید بر روی کروموزوم ۲۱ اشاره کرد که جهش در این سه ژن مسئول ۴۰٪ از موارد زودرس بیماری است. ژن‌های دخیل در آلزایمر دیررس به صورت یک ریسک فاکتور عمل می‌کنند و ژن‌های بسیاری در این زمینه به عنوان ریسک فاکتور مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که شناخته‌ترین آن‌ها، ژن آپولیپو پروتئین^۳ واقع بر روی کروموزوم ۱۹ می‌باشد (۱۴، ۱۳ و ۱۵). آپولیپو پروتئین E(APOE)، لیپوپروتئین اصلی در مغز است که در نقل و انتقال لیپیدها و به ویژه کلسترول دخیل می‌باشد. ژن کد کننده پروتئین APOE سه آلل دارد که توارث آلل (APOEε۴) قویترین فاکتور خطر برای بیماری آلزایمر تک گیر می‌باشد (۱۶).

چندین فرضیه ارائه شده‌اند که مرک نورونی ناشی از گره‌های داخل سلولی نوروفیبریلاری و آمیلوئید بتا را بیان می‌کنند. فرضیه آبشار آمیلوئید^۴ ادعا می‌کند که آمیلوئید بتا سبب افزایش یا ایجاد پاتولوژیکی گره‌های داخل سلولی نوروفیبریلاری می‌شود. فرضیه ای دیگر، آسیب اکسیداتیو مغز، به عنوان یک عامل برای بیماری آلزایمر اسپورادیک می‌باشد و فرضیه ای دیگر، نقص میتوزی را به عنوان یک دلیل تخریب نورونی در آلزایمر معرفی می‌کند (۱).

ژن تائو kb ۱۳۵ طول دارد و دارای ۱۶ اگزون می‌باشد که بر روی کروموزوم شماره ۱۷ در موقعیت ۲۱q۱۷ قرار دارد و پروتئین کد شده توسط این ژن، دارای نقش حیاتی در سطح سلولی می‌باشد. نقش عمده

¹ -Early-onset

² -Late-onset^۱

³ -Apolipoprotein E

⁴ -Amyloid cascade hypothesis

فیزیولوژیکی این پروتئین، پیشبرد پایداری و تجمع شبکه میکروتوبولی می‌باشد که این شبکه میکروتوبولی در انتقالات آکسونی^۱ در نورون‌ها دارای اهمیت می‌باشد (۱۷، ۱۸). ژن تائو دارای دو جزیره CPG می‌باشد که یکی از جزایر با پروموتر و جزیره دیگر با اگزون ۹ در ارتباط می‌باشد. جزیره CPG مربوط به بخش پروموتر شبیه پروموترهای ویژه نورون می‌باشد (۱۹).

در تمام طول لوکوس ژنومی MAPT دو هاپلوتایپ شناسایی شده‌اند که این هاپلوتایپ‌ها را H1 و H2 می‌نامند که واریانت‌های H1 با بیماری آلزایمر در ارتباط می‌باشند (۱۶، ۲۰).

در مغز بالغین شش ایزوفرم از تائو در اثر پردازش متناوب اگزون‌های ۳، ۲ و ۱۰ حاصل می‌شود که سه تا از این ایزوفرم‌ها دارای سه ناحیه تکراری متصل شونده به میکروتوبول (3R) می‌باشند که توسط اگزون‌های ۹-۱۲ کد می‌شوند. اگزون ۱۰ نیز دومین دیگری را کد می‌کند که داشتن این دومین مربوط به اگزون ۱۰ باعث تولید سه ایزوفرم دیگر از تائو می‌شود که دارای چهار ناحیه اتصال به میکروتوبول می‌باشد و ایزوفرم‌های 4R-tau نامیده می‌شوند (۲۱). ایزوفرم‌های 3R، 4R یا بدون اسیدآمینه دخولی (0N) و یا دارای ۲۹ اسیدآمینه دخولی (1N) و یا دارای ۵۸ اسیدآمینه دخولی (2N) می‌باشند. در مغز انسان نسبت ایزوفرم‌های 3R به 4R در حدود یک می‌باشد و ایزوفرم‌های 0N، 1N و 2N به ترتیب ۵۴٪، ۳۷٪، ۹٪ از کل تائو را تشکیل می‌دهند. در مغز جنین کوتاه‌ترین ایزوفرم‌ها تائو (3R/0N) که دارای ۳۵۲ اسید آمینه است بیان می‌شود در حالی که شش ایزوفرم در زمان بعد از تولد بیان می‌شوند (۲۲). پروتئین تائو از طریق این تکرارها به میکروتوبول‌ها متصل شده و سبب اجتماع آنها می‌شود (۱۷). نشان داده شده است که ایزوفرم‌های 4R-tau در مقایسه با ایزوفرم‌های 3R-tau تمایل بیشتری برای اتصال به میکروتوبول‌ها دارند. این فرضیه ارائه شده است که افزایش شکل 4R-tau سبب ایجاد ساختار سخت و غیرقابل انعطاف میکروتوبولی می‌شود (۲۳).

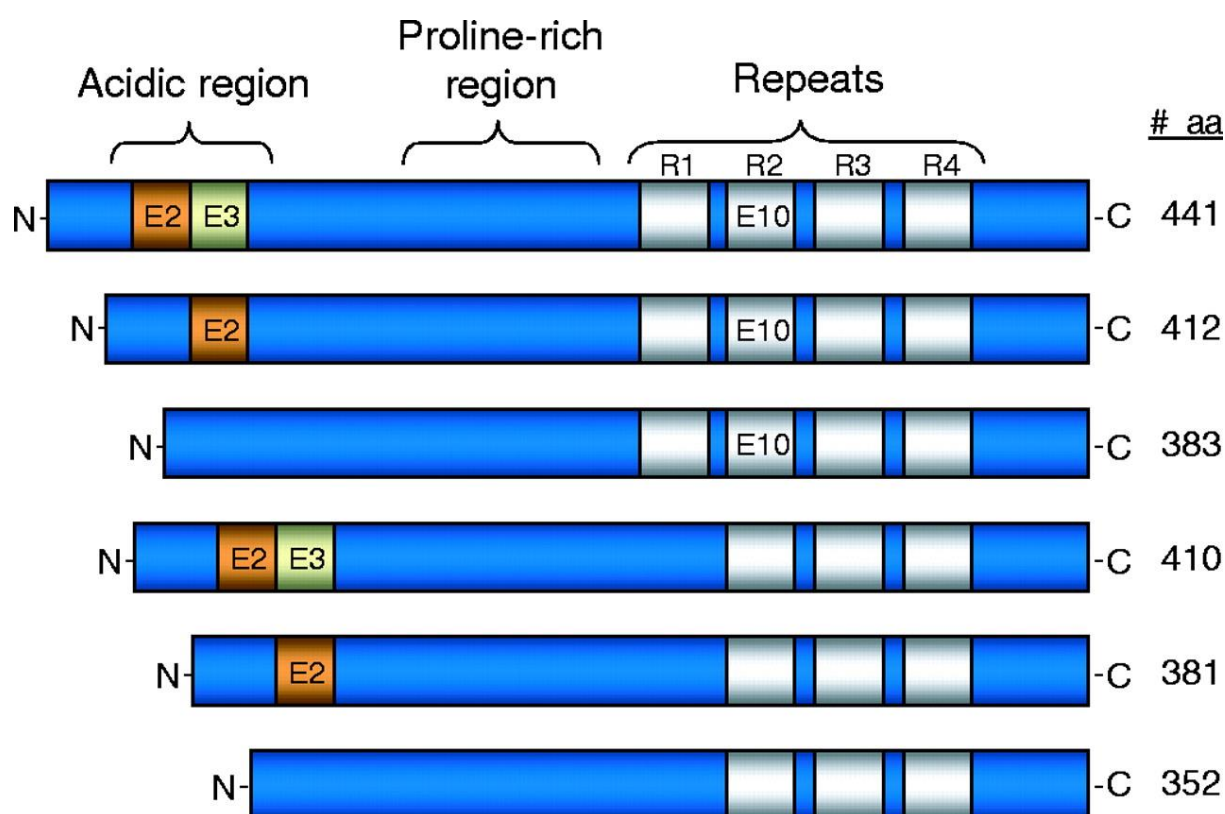
¹ -Axonal transport

² -CPG island

³ -Alternative splicing

⁴ -Assembly

پروتئین تائو یک سری تغییرات پس از ترجمه ای^۱ را می گذراند که سبب پایداری آن می شود. بر روی پروتئین تائو بیش از ۴۰ جایگاه فسفوریلاسیون شناسایی شده اند که این جایگاه ها اغلب باقیمانده های سرینی و ترئونینی می باشند که بعد از پرولین آمده اند (۲۳).



شکل ۱-۲: در این شکل ایزوفرم های گوناگون تائو به نمایش در آمده اند.

همانگونه که مشاهده می شود طویل ترین ایزوفرم دارای ۴۴۱ اسید آمینه می باشد و دارای اگزون های ۲،۳ و ۱۰ است در حالی که کوتاهترین ایزوفرم دارای ۳۵۲ اسید آمینه می باشد و فاقد اگزون های ۲،۳ و ۱۰ است. ژن تائو در بیماری PSP^۲ دارای سه پلی مورفیسم است که دو پلی مورفیسم در پروموتور (A→G در موقعیت- ۴۴ و C→G در موقعیت ۲۲۱-) و یک پلی مورفیسم در اینترون شماره یک (G→A در موقعیت ۳۰۹) می باشد که این پلی مورفیسم ایجاد دو هاپلوتاایپ H1P و h2p است که هاپلوتاایپ h2p با Pvalue≤0.00217 با بیماری PSP در ارتباط می باشد. از آنجا که ژن تائو در بیماری آلزایمر حائز اهمیت

¹ -Post- translational

² -Progressive Supranuclear Plasy

می‌باشد این تغییر پروموتری دیده شده در پروموتر تائو در بیماری PSP ممکن است در بیماری آلزایمر نیز مهم باشد (۲۴).

بین اگزون ۹ و ۱۰ از ژن تائو یک ژن بدون اینترون، به نام سایتوهین^۱ قرار گرفته است و الگوی بیان آن بسیار شبیه الگوی بیان ژن تائو می‌باشد (۲۵, ۱۶, ۱۴). این ژن همولوگ مشخصی ندارد (۲۶) و تنها دارای یک اگزون می‌باشد. عملکرد این ژن نامشخص می‌باشد و در مورد ژن بودن آن هنوز اختلاف نظر وجود دارد. ولی در فرایندهای پاتولوژیک در بیماری PSP تاثیر داشته است (۲۷, ۲۸).

۱-۲: اهمیت و ضرورت

بیماری آلزایمر یک بیماری تخریب عصبی است که کل زندگی فرد مبتلا را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد. این بیماری که یک بیماری مولتی فاکتوریال می‌باشد نتیجه عوامل ژنتیکی و محیطی است. در سال ۲۰۰۶، حدود ۲۶,۶ میلیون نفر از جمعیت جهان به این بیماری مبتلا بوده‌اند و طبق آخرین آمار موجود در ۱۳۷۵؛ حدود ۱۸۲ هزار نفر بیمار مبتلا به آلزایمر در ایران وجود داشته است که این تعداد در سال ۱۳۸۶ بین ۳۰۰-۲۵۰ هزار نفر برآورد می‌شود (۳۸). در جمعیت ایالت متحده آمریکا ۳-۴ میلیون نفر به بیماری آلزایمر دی‌ررس مبتلا می‌باشند و هر سال ۳۵۰ هزار نفر به این جمعیت اضافه می‌شوند (۳۹). شیوع این بیماری از ۲۰٪ برای افراد بالای ۷۵ سال به ۳۰٪ برای افراد بالای ۸۵ سال افزایش پیدا می‌کند و ۵٪ از افراد با سن ۶۵ سال یا بالاتر به آن مبتلا می‌باشند. از آنجایی که بیماری آلزایمر دی‌ررس (که در سنین بالای ۶۵ سال بروز می‌یابد)، بیش از ۹۷٪ از موارد بیماری آلزایمر را به خود اختصاص داده است و با توجه به اینکه تشخیص این بیماری بر اساس بررسی‌های بالینی و نوروسایکولوژیکی است که روندی زمان‌بر و پرهزینه می‌باشد. بنابراین تشخیص بیماری با استفاده از آلل یا مارکری خاص که به طور مستقیم با بیماری مرتبط است می‌تواند در تشخیص سریع بیماری و احیانا درمان آن موثر واقع گردد (۴۰).

با توجه به اینکه گره‌های نوروفیبریلاری (متشکل از فیلامنت‌های شدیداً فسفریله تائو) از شاخص‌های بیماری آلزایمر (از نوع دی‌ررس و زودرس) می‌باشند در کشور ما نیز با وجود جوان بودن جمعیت کنونی، شاهد

^۱ -Saitohin(STH)

رشد جمعیت سالمندان خواهیم بود و به نظر می‌رسد که در ۲۰ الی ۳۰ سال آینده با پیر شدن جمعیت جوان فعلی، شیوع بیماری آلزایمر افزایش خواهد یافت. لذا مطالعه و شناسایی فاکتورهای خطر ساز به ویژه بیومارکرهای ژنتیکی می‌تواند ما را در شناسایی زودرس بیماری، درمان هدفدار و نیز شناسایی افراد در معرض خطر در خانواده‌هایی با خطر بالای ابتلا به آلزایمر یاری رساند.

از این رو با توجه به مطالعات قبلی در سایر کشورها و عدم وجود مطالعه خاصی اثر این دو ژن در ارتباط با بیماری آلزایمر در جمعیت ایرانی و با توجه به اینکه ژن MAPT کدکننده پروتئین تائو است و این پروتئین با بیماری آلزایمر در ارتباط مستقیم است و APOE هم یک ریسک فاکتور برای این بیماری شناخته شده است لذا نیاز به انجام مطالعاتی نظیر این، ضروری احساس می‌شود.

۳-۱: تعریف واژه‌ها

۱-۳-۱: آلزایمر

بیماری آلزایمر شایع‌ترین علت زوال عقل در دوران میان سالی و پیری است که با نقص در فعالیت‌های شناختی، از دست دادن حافظه، از دست دادن توانایی انجام حرکات هدفدار و تغییرات شخصیتی همراه است. در این بیماری مناطق خاصی از مغز چون لوپ خای گیجگاهی، هیپوکامپ، بخشی از کورتکس و بخش کوچکتری از لوب پیشانی درگیر می‌شوند (۱). این بیماری، از نظر ژنتیکی هتروژن بوده و تحت تاثیر محیط و ژنتیک است که شیوع آن از حدود ۳٪ در میان افراد ۶۵ ساله تا حدود ۵۰٪ در میان افراد ۸۵ ساله تغییر می‌کند. بیماری آلزایمر بر اساس سن شروع بیماری به دو حالت زودرس (شروع در سن کمتر از ۶۵ سال) و دیررس (شروع در سن بیشتر از ۶۵ سال) تقسیم می‌شود. بیش از ۱۷٪ بیماران، دچار آلزایمر از نوع دیررس و تک گیر^۴ (بدون سابقه خانوادگی) هستند، در حالیکه آلزایمر زودرس تنها ۳٪ از جمعیت را شامل می‌شود (۵).

¹ -Dementia

² -Memory loss

³ -Hetrogenose

⁴ -Sporadic

۲-۳-۱: ژن APOE

ژن آپولیپو پروتئین^۱ واقع بر روی کروموزوم ۱۹ می باشد (۱۴، ۱۳ و ۱۵). آپولیپو پروتئین E (APOE)، لیپوپروتئین اصلی در مغز است که در نقل و انتقال لیپیدها و به ویژه کلسترول دخیل می باشد. ژن کد کننده پروتئین (APOE) سه آلل دارد که توارث آلل (APOEε ۴) قویترین فاکتور خطر برای بیماری آلزایمر تک گیر می باشد (۱۶).

۳-۳-۱: ژن MAPT

یکی از ژن های تازه شناخته شده است که بر روی کروموزوم شماره ۱۷ در موقعیت 17q21 قرار دارد و پروتئین کد شده توسط این ژن، دارای نقش حیاتی در سطح سلولی می باشد. نقش عمده فیزیولوژیکی این پروتئین، پیشبرد پایداری و تجمع شبکه میکروتوبولی می باشد که این شبکه میکروتوبولی در انتقالات آکسونی^۲ در نورون ها دارای اهمیت می باشد (۱۷، ۱۸).

۴-۳-۱: NFTs

یکی از ویژگی های پاتولوژیک بیماری آلزایمرگره های نوروفیبریلاری می باشد که همراه با پلاک های بتا آمیلوئیدی دیده می شود. این گره ها ترکیبی از پروتئین تائوی به شدت فسفوریله می باشد که از دو نوع فیلامنت به نام های فیلامنت هلیکال جفت شده و فیلامنت های صاف درست شده اند که میزان PHFs بسیار بیشتر از SFs است. تائو از پروتئین های واکنش دهنده با میکروتوبول ها می باشد که در شرایط طبیعی در آکسون ها و در شرایط پاتولوژیک به صورت کلافی در جسم سلولی نورون ها قرار می گیرد. در ابتدای بیماری این کلاف در نورون های هرمی موجود در کورتکس انتورینال، ناحیه زمینه ای^۳ و ناحیه CA1 هیپوکامپ، تشکیل می شوند و با گسترش بیماری، تعداد این کلاف ها رو به گسترش نهاده و کورتکس پارینال^۴ را نیز درگیر می کنند (۲۱، ۴، ۴۱، ۴۲).

^۱ -Apolipoprotein E

^۲ -Axonal transport

^۳ -Paired Helical Filaments(PHFs)

^۴ -Straight Filaments(SFs)

^۵ -Subiculum

^۶ -Parietal

۱-۳-۵ : β APP (β -Amyloid Precursor Protein)

این ژن اولین ژن شناخته شده در رابطه با استعداد برای ابتلا به بیماری آلزایمر خانوادگی است که دارای پردازش متناوب بوده و ایزوفرم‌هایی از پروتئین تبا آمیلوئید را کد می‌کند که طولانی‌ترین آنها ایزوفرمی غشاء گذر با اسید آمینه می‌باشد. پروتئین β APP توسط دو آنزیم پروتئولیتیک به نام‌های گاما و بتا سكرتاز تجزیه شده و بتا آمیلوئیدهایی با طول ۴۰-۴۲ اسید آمینه را تولید می‌نمایند که سمیت بتا آمیلوئید ۴۲ اسید آمینه از سایرین بیشتر است (۲۸).

۱-۴ : هدف از اجرای تحقیق

(هدف اصلی) : بررسی ارتباط پلی مورفیسم شایع rs۲۴۲۵۵۷ (G/A) در ژن MAPT و ابتلا به آلزایمر دیررس در بیماران ایرانی و گروه کنترل (افراد سالم).

(هدف جانبی) : بررسی ارتباط هاپلوتاایپ $\epsilon 4$ از ژن APOE و ابتلا به آلزایمر دیررس در بیماران ایرانی و گروه کنترل (افراد سالم).

(هدف کاربردی) : استفاده از نتایج جهت غربالگری بیماران مستعد یا در معرض خطر ابتلا به آلزایمر.

۱-۵ : فرضیه های پژوهش

بین فراوانی ژنوتاایپ $\epsilon 4$ از ژن APOE در بیماران مبتلا به آلزایمر و گروه کنترل (افراد سالم) تفاوت معناداری وجود دارد.

بین فراوانی پلی مورفیسم شایع rs۲۴۲۵۵۷ (G/A) در ژن MAPT در بیماران مبتلا به آلزایمر و گروه کنترل (افراد سالم) تفاوت معناداری وجود دارد.

۱-۶ : سوال پژوهش

مساله اصلی در این پژوهش پاسخ به این سوال است که آیا بین فراوانی پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه در ژن MAPT (Microtubule-associated protein tau) و ژن APOE در جامعه بیماران آلزایمری و جامعه

کنترل (افراد سالم) در جمعیت ایرانی تفاوت معناداری وجود دارد، به گونه ای که بتوان آن را به عنوان یک فاکتور خطر ابتلا به آلزایمر در جمعیت ایرانی محسوب کرد.

منابع پایه‌ای پژوهش

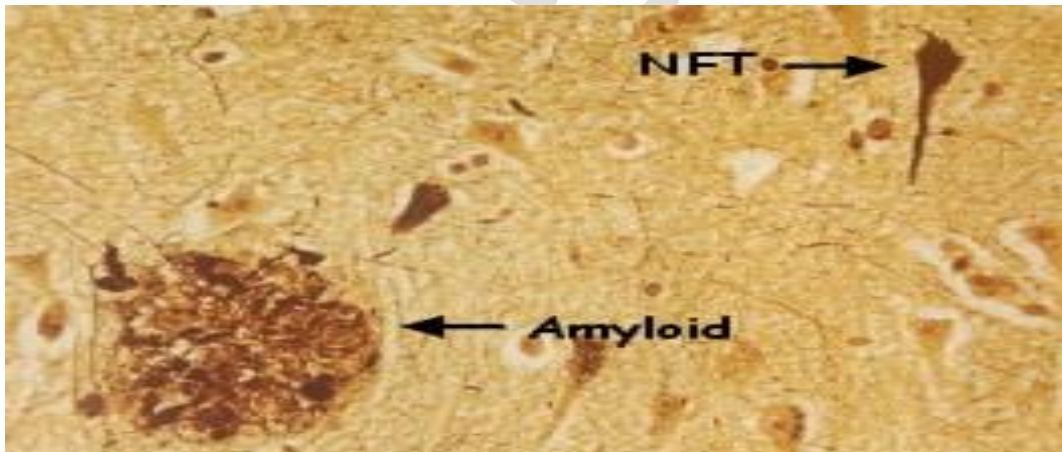
فصل دوم:

مروزی بر متون

گذشته

۲-۱: تاریخچه و کشف بیماری آلزایمر

در سال ۱۹۰۶، در سی و هفتمین گردهمایی روانپزشکان آلمانی در توبینگن، آلویس آلزایمر، سرپرست آزمایشگاه آناتومی دانشگاه لودویگ-ماکسی میلیانز در مونیخ اولین مورد بیماری را همراه با آتروفی کورتکس و NFT^۴ و رسوبات بتا آمیلوئیدی، در یک زن ۵۱ ساله گزارش کرد. در سال ۱۹۱۰، روانپزشک آلمانی به نام امیل کرپلین^۵ این بیماری را بیماری آلزایمر (AD)^۶ نامید (۴۳،۱۰). شیوع این بیماری از ۳٪ در میان افراد ۸۵ ساله، تغییر می‌کند و تعداد افراد بیمار تا سال ۲۰۵۰، حدود ۱۰۰ میلیون نفر تخمین زده شده است (۱۰). بیماری آلزایمر، جزء ده بیماری کشنده در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود (۴۴،۴۵). در آمریکا آلزایمر چهارمین دلیل مرگ و اصلی‌ترین دلیل زوال عقل می‌باشد که در حال حاضر علاج یا درمان موثری برای این بیماری وجود ندارد (۴۶) و از اقتصادی بارسنگینی را بر دوش جامعه تحمیل می‌کند برای مثال در آمریکا به ازای هر فرد آلزایمری سالیانه ۴۲ هزار دلار صرف می‌شود (۴۷).



شکل ۲-۱: پلاک‌های پیری آمیلوئید و NFT مشاهده شده در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر

^۱ -Alois Alzheimer

^۲ -Ludwig -Aaximilians

^۳ -atrophy

^۴ -Neurofibrillary tangles

^۵ -Emil Kraepelin

^۶ -Alzheimers Disease(AD)

۲-۲: پاتولوژی بیماری

بیماری آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو می‌باشد که از نظر بالینی با زوال عقل مشخص می‌شود (۴۸). از ویژگی‌های بالینی آن، می‌توان به از دست رفتن حافظه، تغییرات شخصیتی و از دست دادن فعالیت‌های شناختی اشاره کرد که ویژگی اخیر می‌تواند شامل عدم توانایی در سخن گفتن^۱، عدم تشخیص افراد و اشیاء با وجود سالم بودن حواس^۲ و عدم انجام فعالیت‌های حرکتی با وجود سیستم حرکتی سالم^۳ باشد (۴۲).

از مهم‌ترین ویژگی‌های پاتولوژیکی بیماری آلزایمر از دست رفتن پیشرونده نورون‌ها و ایجاد پلاک‌های آمیلوئیدی^۴ و مواد رشته‌ای سیتوپلاسمی می‌باشد که گره‌های نوروفیبریلاری^۵ خوانده می‌شود. ترکیب اصلی گره‌های نوروفیبریلاری را اشکال غیر طبیعی و به شدت فسفوریله شده^۶ تائو تشکیل می‌دهد. این در حالی است که پلاک‌های پیری^۷ (پلاک‌های آمیلوئیدی) از رشته‌های پپتیدی هشت نانومتری به نام بتا آمیلوئید تشکیل شده‌اند که نواحی مختلف مغز از جمله هیپوکامپ، آمیگدال و کورتکس انتورینال را درگیر می‌کنند (۱۰). پلاک‌های پیری که در مغز افراد کهنسال به میزان کم یافت می‌شود در مغز بیماران آلزایمری به میزان بسیار فراوان دیده می‌شود و تنها در بیماری آلزایمر دیده می‌شود.

^۱ -aphasia

^۲ - agnosia

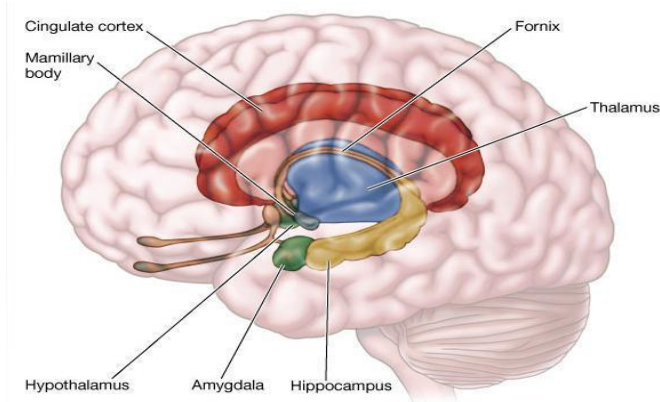
^۳ -apraxia

^۴ - Amyloid plaques

^۵ - Neurofibrillary tangles

^۶ -Hyperphosphorylated

^۷ -Senile plaques



شکل ۲-۲: سیستم لیمبیک و نواحی درگیر در بیماری آلزایمر

بنابراین برای این بیماری ویژه می‌باشد (۴۶). به نظر می‌رسد که میزان گوناگونی ژنومی^۱ در جمعیت آلزایمری در مقایسه با جمعیت‌های نرمال بدون هیچگونه سابقه بیماری، ۲-۳ برابر بالاتر باشد (۴۶ و ۴۸). جایگاه تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی در تعیین نوع پلاک‌ها، به عنوان فاکتوری اساسی عمل می‌کند. این بدان معنی است که برخی نواحی دارای پلاک‌های مخصوص خود می‌باشند (۴۶، ۴۸). پلاک‌های تیپیکال از سه جز تشکیل می‌شوند که آمیلوئید، نوریت‌ها و گلیای واکنش دهنده می‌باشند. نوریت‌های swollen دارای اجسام ضخیمی^۲ می‌باشند که می‌توان آنها را با آنتی بادی‌های یوبیکوئیتین نشاندار کرد. نوریت‌های swollen در مغز بیماران آلزایمری شامل گره‌های پیچ خورده جفت می‌باشد این در حالی است که در مغز افراد سالم، این فیلامنت‌ها دیده نمی‌شود (۴۶، ۴۷). یافته‌هایی دال بر موتاسیون در بیماری ۱۷ FTDP-^۳ که نوعی دیگر از بیماری نورودژنراتیو است (که همراه با تشکیل NFTs است) می‌رساند که تائو به تنهایی توانایی ایجاد نورودژنراسیون را دارا است. لذا مطالعه مکانیسم‌های مولکولی شکل‌گیری NFTs ممکن است دیدگاهی مهم را در باب نورودژنراسیون در بیماری آلزایمر ارائه می‌کند (۴۶، ۴۸، ۵۱) گرچه پلاک‌های پیری از ویژگی‌های بیماری آلزایمر می‌باشد NFTs در سطح وسیع تری رخ می‌دهد و در بیماری نورودژنراتیو دیگر نیز مشاهده می‌شود که این مطلب بیانگر آن است که پلاک‌های پیری در فرایندهای پاتولوژیکی تخصصی بیماری آلزایمر

^۱ -Genomic variation

^۲ - Neuritis

^۳ - Reactive glia

^۴ - Dense bodies

^۵ -Frontotemporal

دخیل می‌باشد در حالی که NFT در فرایندهای عمومی نورودژنراسیون اثر گذار است. NFTs را به عنوان دومین مشخصه بیماری آلزایمر قلمداد می‌کنند زیرا کمتر ویژه می‌باشد و علاوه بر آلزایمر در دیگر بیماری‌های نورودژنراتیو نظیر ۱۷ PSP,FTDP- نیز مشاهده می‌شود (۱).

۳-۲: انواع بیماری و ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر

بیماری آلزایمر، بیماری پیچیده و از نظر ژنتیکی هتروژن می‌باشد که پیچیدگی آن بر فقدان الگوی توارثی خاص، دلالت می‌کند و هتروژن بودن آن، بیانگر دخالت پلی مورفیسم‌ها و موتاسیون‌های موجود در چندین ژن، به همراه عوامل غیر ژنتیکی در این بیماری است (۴۹، ۲). به نظر می‌رسد که نقص شناختی متوسط قبل از بروز بیماری آلزایمر رخ می‌دهد. نقص شناختی متوسط^۱ مرحله‌ای گذرا بین پیر شدن طبیعی مغز و زوال عقل می‌باشد و تقویت کننده این دیدگاه است که قبل از بروز بیماری آلزایمر تغییرات سیناپسی رخ می‌دهند. ضعف سیناپسی به طور عموم در پاتولوژی بیماری آلزایمر دیده می‌شود و شاخص عملکرد بد سیناپسی در آلزایمر می‌باشد (۵۰).

داشتن ضعف شناختی متوسط که رخدادی هتروژن می‌باشد ریسک ابتلا به بیماری‌های زوال عقل و از جمله آنها آلزایمر را ده برابر می‌کند (۴۸، ۴۶). از اواخر قرن بیستم بیماری آلزایمر شایع‌ترین دلیل زوال عقل در جمعیت ژاپن توده است. بیش از ۳۰ ژن مختلف که در سراسر ژنوم انسان پراکنده شده‌اند ممکن است در آبشارهای اتیو پاتولوژیکی^۲ بیماری آلزایمر درگیر باشند که منجر به نورودژنراتیو در بیماری آلزایمر می‌شود (۵۱).

بیماری آلزایمر بر اساس سن شروع آن به دو نوع طبقه بندی می‌شود که آلزایمر با شروع زودرس^۳ (شروع در سنین کمتر از ۶۵ سال) و آلزایمر با شروع دیررس^۴ (شروع در سنین بیشتر از ۶۵ سال) خوانده می‌شوند. در هر دو نوع بیماری آلزایمر وجود پلاک‌های بتا آمیلوئیدی و گره های نوروفیبریلاری از مشخصات بیماری می‌باشند. سایر فاکتورهای گیج‌کننده در پاتوژنز بیماری آلزایمر شامل سیکل سلولی معیوب، بی نظمی در

^۱ -Mild Cognitive Impairment(CMI)

^۲ - Etiopathologic cascades

^۳ -Early-onset

^۴ -Late- onset

متابولیسم انرژی نورونی به دلیل نقص در فعالیت‌های میتوکندریایی و مکانیسم‌های التهابی^۱ و فشار اکسیداتیو و نقص در عملکرد پروتئوزوم‌ها می‌باشد (۲۶).

بخش عمده موارد بیماری آلزایمر از نوع دیررس می‌باشد به گونه ای که بیش از ۹۷٪ بیماران آلزایمری، از نوع اسپورادیک می‌باشند و تنها ۳٪ بیماران آلزایمری از نوع زودرس می‌باشند پس از سن، سابقه خانوادگی، دومین عامل خطر در این بیماری است (۱۲ و ۵۲).

۱-۳-۲: بیماری آلزایمر با شروع زودرس

مدل توارث در آلزایمر برای هر نوع متفاوت است. اکثر موارد آلزایمر خانوادگی و اسپورادیک دارای توارث پیچیده می‌باشند. در حالی که حدود ۱۰٪ از موارد آلزایمر خانوادگی اتوزومال غالب دارند (۵۳). در بیماری آلزایمر زودرس دلیل اصلی بیماری یک موتاسیون ژنتیکی می‌باشد (۲۶). بیماری آلزایمر زودرس (خانوادگی)، در اثر موتاسیون‌های نادر از نوع بد معنی با توارث اتوزومال غالب ایجاد می‌شود که این موتاسیون‌ها در ژن‌های APP, Presenilin1, Presenilin2 رخ می‌دهد (۲۶).

ژن پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید که در رابطه با استعداد برای ابتلا به بیماری آلزایمر خانوادگی شناسایی شد. که بر روی کروموزوم ۲۱ قرار دارد (۴۶، ۴۸، ۵۱). از پردازش متناوب حداقل سه اگزون از ژن APP، ۸ ایزوفرم APP، تولید می‌شود که از که معروف‌ترین آنها می‌توان به سه گونه‌ی ۶۹۵، ۷۷۰، ۷۵۱ اسید آمینه‌ای اشاره کرد که در سلول‌ها دچار تغییرات پس از ترجمه می‌شوند و از جمله این تغییرات می‌توان به اتصال قند، سولفاسیون و فسفریلاسیون^۲ را نام برد (۵۱). APP بلافاصله پس از ساخته شدن در شبکه آندوپلاسمی، دچار N-گلیکوزیلاسیون می‌شود و در دستگاه گلژی دچار N-گلیکوزیلاسیون‌های بعدی و O-گلیکوزیلاسیون می‌شود. جالب توجه این است که ۷۰-۸۰٪ از APP نابالغ N-گلیکوزیله شده، تجزیه می‌شود که این عمل

^۱ -Inflammatory mechanisms

^۲ -Oxidative stress

^۳ -Susceptibility

^۴ -Postranslational modification

^۵ -Glycosylation

^۶ -Sulfation

احتمالا در شبکه آندوپلاسمی رخ می‌دهد و تنها ۳۰-۲۰٪ به دستگاه گلژی می‌رسد. در خلال گذر از شبکه آندوپلاسمی به سطح سلول، APP همچنین دچار سولفاتاسیون و فسفوریلاسیون نمی‌شود (۴۶، ۴۸، ۵۱).

از پردازش متناوب در حداقل سه اگزون از اگزون‌های ژن β APP ایزوفرم‌های گوناگونی از این ژن حاصل می‌شود که فراوان‌ترین آنها دارای ۷۵۱ اسیدآمینه می‌باشد. ایزوفرم ۷۵۱ اسیدآمینه ای اگزون ۷ را دارا می‌باشد این در حالی است که ایزوفرم ۶۹۵ اسیدآمینه‌ای از β APP که به طور انتخابی در نورون‌ها بیان می‌شود، فاقد اگزون ۷ می‌باشد (۵۴). APP دارای یک دومین ۵۶ اسیدآمینه‌ای است که به علت شباهت به خانواده‌ای از پروتئازها موسوم به خانواده مهارکننده پروتئاز Kunitz، به نام دومین مهارکننده پروتئاز^۱ Kunitz، (KPI) نامیده می‌شود (۴۸، ۵۱، ۵۵). APP77 علاوه بر دارا بودن دومین KPI دارای یک توالی ۱۹ اسیدآمینه‌ای می‌باشد که با آنتی ژن MRC OX-2 دارای همولوژی می‌باشد (۴۶، ۵۱، ۵۵). APP در همه بافت‌ها^۲ بیان می‌شود ولی بیشترین میزان بیان آن در مغز و کلیه می‌باشد. در حالی که فراوان‌ترین ایزوفرم از APP، ایزوفرم ۷۵۱ می‌باشد. نورون‌ها به طور اختصاصی عمدتاً ایزوفرم ۶۹۵ را بیشتر بیان می‌کنند (۵۴). از لحاظ ساختاری APP از نوع پروتئین غشایی انتگرال نوع یک^۳ می‌باشد که دارای زنجیره‌های کربوهیدراتی از نوع متصل به ۵ و متصل به N می‌باشد (۴۶، ۵۱، ۵۴). اولین ۲۸ اسیدآمینه مربوط به توالی آمیلوئید بتا در بخش خارج سلولی قرار دارد و ۱۵-۱۱ اسیدآمینه‌ای باقیمانده در عرض غشاء فرو رفته است این بدان معنی است که برای تولید آمیلوئید بتا از APP باید حداقل دو شکست پروتئولیتیکی رخ دهد و در نهایت دومین سیتوپلاسمی مربوط به APP دارای یک موتیف درونی NPTY می‌باشد که در اندوسیتوز آن ایفاء نقش می‌کند (۴۶، ۵۱، ۵۵). هنگامی که APP از مسیر ترشحی^۴ عبور می‌کند دچار یکسری شکست‌های پروتئولیتیکی^۵ دیگر می‌شود که این اعمال توسط انواعی از پروتئازها صورت می‌پذیرد که به مجموع آن‌ها سکرته‌های آلفا و گاما اطلاق می‌شود (۵۶). در ابتدا APP توسط بتا سکرته‌ای شکسته می‌شود و سبب تولید یک قطعه‌ای اکتودومینی به نام $SAPP\beta$ و یک قطعه C- ترمینال می‌شود که این قطعه C- ترمینال دارای تمام توالی A- β می‌باشد. شکست‌های

^۱ -Kunitz Protease Inhibitor

^۲ -Ubiquitously

^۳ -Type- 1 transmembrane integral protein

^۴ -Secretory pathway

^۵ -Endoproteolytic

بعدی توسط سكرتاز ييب توليد آميلوئيد بتا می‌شود. در عوض شكسته شدن APP توسط آلفا سكرتاز سبب توليد يك قطعه‌ی اکتو دومینی ترشحي بلند به نام α PPA و يك قطعه C- ترمینال لنگر شده به غشاء می‌شود که ادامه شكست بخش C- ترمینال توسط گاما سكرتاز سبب توليد P3 می‌شود. ژن APP دارای ۱۷ اگزون می‌باشد که از میان آنها اگزون‌های ۷، ۸، ۱۵ به صورت متناوب پردازش می‌شوند (۴۶، ۴۸، ۵۴، ۵۱).

بخش پروتئینی اصلی آميلوئيد بتا که در مغز بیمار آلزایمري رسوب می‌دهد يك پروتئين چهار كيلو دالتونی می‌باشد که آميلوئيد بتا نامیده می‌شود (۴۶، ۵۶، ۵۵، ۴۸).

پرسينيلين‌ها يك خانواده از پروتئين‌های حفاظت شده از نظر تكاملی می‌باشند که به صورت همه جایی بيان می‌شود و دارای چندین دومین غشاء گذر می‌باشند (۴۸، ۴۶، ۵۴، ۵۵، ۵۶). ژن‌های كدكننده پروتئين‌های پرسينيلين ۱ را PS1 و PS2 می‌نامند. که به ترتيب بر روی کروموزوم‌های ۱۴ و ۱ قرار دارند. تعداد موتاسيون‌های شناسایی شده در Presenilin 1 از تعداد موتاسيون‌های شناسایی شده در Presenilin ۲ خیلی بیشتر می‌باشد (۵۵، ۵۴).

PS2 توسط ژنی ۱۲ اگزونی که طولی برابر ۲۳۷۳۷ جفت باز دارد، كد می‌شود و بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱ در موقعیت 1q42 قرار گرفته است که از میان دوازده اگزون تنها ده اگزون در سنتز پروتئين شرکت می‌کنند و دو اگزون ابتدایی دارای اطلاعات غير كد كننده می‌باشند. بيان ps2 در مغز پایین می‌باشد ولی در ماهیچه اسكلتی، قلب و پانكراس نسبتا بالا می‌باشد (۵۴، ۴۶، ۵۵، ۵۶). PS1 در موقعیت 14q24.3 و PS2 در موقعیت 1q42.1 قرار گرفته است (۵۶).

ایزوفرم ۶۹۵ آمینو اسیدی در نوروها بیش از سلول‌های غير نوروئی بيان می‌شود. پروتئين β APP دچار شكست‌های پروتئولیتیک درونی گوناگونی می‌شود که از این نوع شكست‌ها را آنزیمی به نام آلفا سكرتاز کاتالیز می‌کند و سبب آزاد شدن بخش خارج سلولی پروتئين β APP می‌شود که این شكست آنزیمی در دومین بتا آميلوئيدی رخ می‌دهد و لذا يك مسیر غير آميلوئيدساز طی می‌شود و از توليد آميلوئيد بتا جلوگیری می‌شود. در نوعی دیگر از شكست‌های پروتئولیتیک مربوط به پروتئين β APP دو آنزیم به نام‌های بتا و گاما سكرتاز

¹ -Beta Amyloid

² -Non- amyloidogenic

شرکت می‌کنند که ییب تولید مجموعه‌ای از پپتید های ۴۲-۴۰ اسید آمینه‌ای از آمیلوئید بتا می‌شوند. پپتیدهای بتا آمیلوئیدی که طول آنها ۴۲ اسید آمینه می‌باشد در مقایسه با آمیلوئید بتای ۴۰ اسید آمینه‌ای از میزان سمیت بیشتری برای نورون‌ها برخوردار می‌باشند (۴۶، ۴۸، ۵۱). اگر چه اعتقاد بر این است $\beta A 42$ در سنتز آمیلوئید نقش بیشتری را عهده دار می‌باشد ولی $\beta 40$ نقش مهمی در بلوغ پلاک‌های مرکزی ضخیم ایفا، می‌کند بدون اینکه مستقیماً توسعه بیماری را تحت تاثیر قرار دهد (۲۶). تا کنون ۱۶ موتاسیون مختلف از نوع missense، در ژن APP شناسایی شده است که برخی از موتاسیون‌ها در ناحیه برش سکر تازها (سبب افزایش تولید بتا آمیلوئیدی) اتفاقی می‌افتد که تنها ۳-۲٪ موارد اتوزمال غالب از بیماری را شامل می‌شود (۴۳، ۴۹، ۵۶). پس از ژن APP، طی مطالعات آنالیز پیوستگی، دو ژن دیگر به نام‌های پرسینلین ۱ (PSEN1) روی بازوی بلند کروموزوم ۱۴ و پرسینلین ۲ (PSEN2) روی کروموزوم ۱، به عنوان ژن‌های دخیل در آلزایمر زودرس شناسایی شدند که موتاسیون در این ژن‌ها با تغییر در برش باعث افزایش $\beta A 42$ می‌شود و علاوه بر آن PSEN ۱ها در برش درون غشایی برخی پروتئین‌های غشاء گذر مانند پروتئین‌های خانواده Notch لازم می‌باشد (۴۶، ۴۸، ۵۱، ۵۵، ۵۷). ۱۳۳ جهش در ژن PSEN1 شناسایی شده که افراد دارای این جهش‌ها، در دهه پنجم، چهارم و حتی سوم زندگی خود، بیماری را بروز داده‌اند و در واقع ژن PSEN1، اصلی ترین عامل آلزایمر زودرس محسوب می‌شود (۵۷). PSEN1 در بافت‌های گوناگون از بافت‌های عصبی مرکزی گرفته تا بافت‌های غیر عصبی در سطح پایینی بیان می‌شود PSEN همانند βAPP دارای پردازش متناوب می‌باشد (۴۶، ۴۸، ۵۱). تمام موتاسیون‌های روی داده در سه ژن βAPP ، PSEN1 و PSEN2 در مجموع حدود ۱٪ از کل موارد بیماری آلزایمر را به خود اختصاص می‌دهند (۱).

علاوه بر ژن‌های ذکر شده ژن‌های دیگری مثل آلفا -یک آنتی -کیمو تریپسین و رسپتور^۲ VDRL با آلزایمر خانوادگی در ارتباط می‌باشند (۴۶، ۴۸، ۵۱، ۵۵).

پرسینیلین‌ها پروتئین‌هایی غشاء گذر هستند که ۹ بار عرض غشاء را طی می‌کنند و بخش کاتالیتیکی اصلی کمپلکس آنزیمی گاما -سکر تاز می‌سازد که این کمپلکس آنزیمی در شکستن رسپتورهای غشاء گذر

^۱ - $\alpha 1$ -anti- chymotrypsin

^۲ -Very Low Lipoprotein Receptor(VLDLR)

تیپ ۱ از جمله APP و Wnt ایفاء نقش می‌کنند. افزایش APP شکسته شده توسط آنزیم‌های بتا و گاما سكرتاز باعث تولید پپتیدهای $A\beta_{42}$ → ۴۰ می‌شود که موتاسیون‌های APP عامل ایجاد FAD، در نزدیکی جایگاه‌های شکست بتا و گاما سكرتاز قرار گرفته‌اند و عموماً بیماری با وخامت کمتری را در مقایسه با FAD حاصل از موتاسیون‌های PSEN ایجاد می‌کنند. موتاسیون‌های PSEN عامل FAD، در سراسر ژن‌های PSEN1 و psen2 پراکنده شده‌اند و عامل ایجاد بیشتر موارد FAD می‌باشند (۲۶).

۲-۳-۲: بیماری آلزایمر با شروع دیررس

بیماری آلزایمر اسپورادیک یک بیماری پیشرونده نورودژنراتیو می‌باشد که عمدتاً در کهنسالی به آن دچار می‌شوند. شیوع این بیماری از ۲۰٪ برای افراد بالای ۷۵ سال و برای افراد بالای ۸۵ سال افزایش می‌یابد و ۵٪ افراد با سن ۶۵ سال یا بالاتر به آن مبتلا می‌باشند. ۴-۳ میلیون از جمعیت ایالت متحده آمریکا به SAD مبتلا هستند و هر سال ۳۵۰ هزار نفر به این جمعیت اضافه می‌شوند (۳۹). در حالی که ژنتیک بیماری آلزایمر زودرس که دارای توارث اتوزومال غالب است نسبتاً به خوبی مشخص شده است پاتوژنز بیماری آلزایمر دیررس که بسیار معمول‌تر می‌باشد، هنوز معلوم نیست (۲۹). عمده موارد بیماری آلزایمر از نوع اسپورادیک می‌باشد (۲۶). در بیماری آلزایمر دیررس افزایش سن ریسک فاکتور اصلی می‌باشد اتیولوژی این بیماری هتروژن خیلی نا مشخص و شامل ترکیبی از ریسک فاکتورهای ژنتیکی و غیر ژنتیکی می‌باشد (۲۶). چندین ریسک فاکتور با بیماری آلزایمر دیررس مرتبط شناخته شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها افزایش سن و وجود ایزوفرم خاصی از ژن APOE می‌باشد (۳۰).

۲-۳-۲: ژن APOE

ژن APOE در انسان دارای سه پلی مورفیسم معمول می‌باشد که فراوان‌ترین آن‌ها ϵ^3 می‌باشد که منعکس کننده یک سیستمین در کدون ۱۱۲ می‌باشد و در ۷۵٪ از جمعیت Caucasians وجود دارد. دومین پلی مورفیسم ϵ^4 در کدون ۱۱۲ اسید آمینه‌ی آرژنین جای گرفته است و در ۱۵٪ هر جمعیت Caucasians دیده شده است و سومین پلی مورفیسم ϵ^2 می‌باشد که در این واریانت، در کدون‌های ۱۱۲ و ۱۵۸ اسید آمینه‌ی سیستمین قرار می‌گیرد و در ۱۰٪ از Caucasians وجود دارد. مطالعه این سه پلی مورفیسم در جمعیت‌های

بیمار و سالم نسبت به آلزایمر نشان داده است که در افراد مبتلا به آلزایمر فراوانی آل ۴ بسیار بالا می‌رود و به حدود ۴۰٪ می‌رسد و فرکانس آل ۲ به حدود ۲٪ کاهش می‌یابد. نکته قابل توجه این است که بین تعداد کپی‌های آل ۴ و سن شروع بیماری آلزایمری ارتباط وجود دارد، به گونه‌ای که افراد هموزیگوت برای آل ۴ در مقایسه با افراد هتروزیگوت برای این آل دارای سن شروع زودتری برای بیماری هستند و از سوی دیگر افراد دارای یک آل ۲ سن شروع دیرتری دارند. مکانیسمی که توسط آن آل ۴ با شروع زودرس آلزایمر مرتبط است و آل ۲ با سن دیر بیماری در ارتباط می‌باشد. معلوم نیست ولی یک فرضیه این است که APOE ممکن است تولید، پراکنش و پاکسازی آمیلوئید بتا را تحت تاثیر بگذارد (۴۶، ۵۴، ۴۸). برآورد شده است که ریسک نسبت داده شده به جمعیت برای SAD حاصل از APOE بین ۲۰ تا ۷۰٪ باشد که این مطلب مدرکی دیگر در تایید این است که فاکتورهای ژنتیکی دیگری در ریسک ابتلا به SAD دخیل می‌باشند (۳۹).

قبل از کشف ارتباط آل ۴ در ژن APOE به عنوان عامل خطر با بیماری آلزایمر دیررس، مطالعات ایمو نو هیستوشیمی^۱، حضور پروتئین APOE را در رسوبات بتا آمیلوئیدی و بافت مغز افراد بیمار نشان داده بود به طوریکه افراد حامل آل ۴ نسبت به افراد غیر حامل، دارای پلاک‌های آمیلوئیدی بیشتری بودند. تا مدت‌ها تنها توضیح موجود برای مکانیسم عمل ایزوفرم ۴ APOE در پاتوژنز بیماری، نقش این ایزوفرم در بهبود رسوب گذاری بتا آمیلوئید و یا کاهش پاک کردن مغز از بتا آمیلوئید بود (۷۵، ۷۷). بر اساس مطالعات in vitro، پروتئین APOE، قابلیت اتصال به پپتید بتا آمیلوئید را دارد و تمایل به این اتصال در ایزوفرم ۴ بیشتر از ایزوفرم ۳ است و ایزوفرم ۴ به NFT نیز مرتبط است (۷۸، ۷۹، ۸۰).

پروتئین APOE، ناقل لیپیدی است که در انتقال و توضیح کلسترول و لیپیدها از کبد به همه بافت‌های خارج کبدی به واسطه مکانیسم LDL-receptor، نقش دارد. این پروتئین در انتقال کلسترول از مغز و به مغز، نقشی ندارد اما در توزیع مجدد کلسترول در بین نورون‌های بخش‌های مختلف مغز دخیل است. در سیستم عصبی محیطی و بافت‌ها، apoE، apoD، apoA I، apoA-IV تولید می‌شوند، در حالیکه در سیستم

¹ - Immunohistochemistry

عصبی مرکزی فقط apoE سنتز می‌شود و آپو لیپوپروتئین اصلی مغز محسوب می‌شود، به طوریکه ۲۰٪ از کل apoE بدن در مغز سنتز می‌شود (۸).

این پروتئین در سیستم عصبی مرکزی توسط آستروسیت‌ها و ماکروفاژها سنتز و ترشح می‌شود. ApoE مشتق از گلیال، توسط نورون‌ها جذب شده و در پایانه‌های سیناپسی و محل اتصال نورون به ماهیچه، تجمع می‌یابد. با توجه به اینکه apoE، هم با بتا آمیلوئید رشته‌ای و هم با بتا آمیلوئید محلول قابلیت تشکیل کمپلکس دارد، به نظر می‌رسد که اندر کنش apoE با بتا آمیلوئید، برای پاکسازی آن قبل از رسوب گذاری است. از طرفی پردازش پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP) که در درون غشای سلولی قرار گرفته، تحت تاثیر کلسترول موجود در غشاء است، به طوریکه میزان بالای کلسترول غشاء، از عمل α سكرتاز جلوگیری کرده و سبب شکافت توسط β و γ سكرتاز و در نتیجه تولید فرم توکسیک بتا آمیلوئید می‌گردد (۸۱). کلسترول بالای پلاسما با رسوب بتا آمیلوئید ارتباط مستقیم دارد و کلسترول کم در رژیم غذایی با اثر روی α سكرتاز، سبب پردازش APP از مسیر غیر آمیلوئید وژنیک می‌گردد (۸۲، ۸۳).

به طور کلی حضور یک بیماری قلبی-عروقی^۱، سبب بروز حالت شدیدتر بیماری آلزایمر می‌شود (۸۵). و طبق مطالعات اپیدمیولوژیک، در افراد جذاقل با یک آلل $\epsilon 4$ و علائم آترواسکلروز بیشترین خطر ابتلا به بیماری آلزایمر و افراد فاقد این آلل و فاقد آترواسکلروز، کمترین خطر ابتلا وجود دارد (۸۵).

طبق مطالعات *in vivo* و *in vitro*، داروهای کاهنده کلسترول سبب کاهش میزان پپتیدهای بتا آمیلوئید ۴۲ آمینواسیدی می‌شوند و از طرفی شیوع بیماری آلزایمر در بین افراد مصرف‌کننده داروهای کاهنده کلسترول ۶۰٪ الی ۷۰٪ کمتر است (۸۶، ۸۷، ۸۸، ۸۹). لازم به ذکر است که میزان کلسترول پلاسما در بیماران مبتلا به آلزایمر و افراد سالم ناقل آلل $\epsilon 4$ ، بیشتر از افراد فاقد این آلل است (۹۰، ۹۱). بنابراین پروتئین‌های حامل کلسترول و لیپید از جمله apoE، کلسترول و بیماری آلزایمر در ارتباط تنگاتنگ با یکدیگر قرار گرفته‌اند، اما مکانیسم دقیق این ارتباط هنوز مشخص نیست. با توجه به ارتباط بین apoE با هیپرکلسترولمی و بیماری های قلبی-عروقی، به نظر می‌رسد که apoE با همان مکانیسمی که بر پاتوژنز این بیماری‌ها اثر می‌گذارد،

¹ -Cardiovascular disease

بر بیماری آلزایمر نیز موثر است (۹۲). مطالعات بسیاری در جمعیت‌های گوناگون جهت بررسی ارتباط ژن APOE و بیماری آلزایمر صورت گرفته است و به طوریکه فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های حاصل از آن‌ها در جمعیت‌های مختلف متفاوت است (۹۳).

اکثر موارد دیررس بیماری تحت تاثیر چند ژن مختلف هستند و سن و عوامل ژنتیکی و محیطی بر نفوذ بیماری موثر است. در چنین حالتی، عوامل خطر مستعد کننده ژنتیکی^۲ و قرار گرفتن در معرض آن‌ها مطرح می‌شوند (۵۸).

۴-۳-۲: ژن MAPT (Microtule Associated Protein Tau)

در دهه ۸۰ میلادی تائو که یک پروتئین متصل شونده به میکروتوبول‌ها می‌باشد و در آکسون نورون‌ها به فراوانی یافت می‌شوند، شناسایی شد. تائو به عنوان بخش اصلی سازنده‌ی گره‌های نورو فیبریلاری عمل می‌کند. توانایی تائو در اتصال، پلی‌مریزه کردن و پایدار کردن میکروتوبول‌ها، برای مور فوژنز نورونی و نیز انتقال آکسونی بسیار مهم است (۱۸، ۴۶، ۲۱، ۴۸، ۲۷). پروتئین تائوی هایپر فسفریله، فیلامنت‌های پیچ خورده را تشکیل می‌دهند که به شکل گره‌های نوروفیبریلاری درون سلولی تجمع می‌یابد (۵۹ و ۱). گره‌های نوروفیبریلاری که به شکل تائوی هایپر فسفریله می‌باشد در انواعی از بیماری‌های نورودژنراتیو اسپورادیک و خانوادگی، که همراه با اختلالات حرکتی می‌باشند و تائو پاتی خوانده می‌شوند، دیده می‌شوند که از جمله بیماری‌هایی که در لیست تائوپاتی‌ها قرار می‌گیرند می‌توان به آلزایمر، PSP، FTDP-17 و بیماری پیک^۳ اشاره نمود (۴۶، ۴۸، ۵۱، ۵۴). هر چند که تائو از یک ژن بیان می‌شود، بیان آن در سیستم عصبی مرکزی بسیار پیچیده می‌باشد. پردازش متناوب در اگزون‌های ۲، ۱۰، ۳ سبب ایجاد شش ایزوفرم در مغز انسان بالغ می‌شود. این اگزون‌ها در مغز جنین بیان نمی‌شوند و کوتاهترین ایزوفرم در مغز جنین، بیان می‌شود. اگزون‌های ۹-۱۲ هر کدام دارای یک توالی ۱۸ اسید آمینه‌ای می‌باشند که توسط ناحیه بین تکراری متشکل از ۱۴-۱۳ اسید آمینه‌ای از یکدیگر جدا می‌شوند و دومین‌های متصل شونده به میکروتوبول‌ها را تشکیل می‌دهند

¹ -Penetrance

² -Genetic Susceptibility risk factor

³ -Picks disease

(۲۲،۲۳،۶۰،۲۱). وجود اگزون ۱۰ سبب تولید تائویی می‌شود که دارای چهار تکرار می‌شود این در حالی است که عدم وجود این اگزون باعث تولید ایزوفرمی از تائو می‌شود که دارای سه تکرار می‌شود (۱۷،۱۸،۲۱،۶۰). در مغز انسان بالغ، نسبت $4R/3R$ حدود یک می‌باشد. از آنجایی که تائوهای چهار تکراره با کارایی بالاتری باعث تجمع میکروتوبول‌ها می‌شود و در مقایسه با تائوهای سه تکراره با قدرت بیشتری به میکروتوبول‌ها متصل می‌شوند. بیان متغیر ایزوفرم‌های تائو بیانگر ملزومات عملکردی متفاوت برای میان کنش میکروتوبول‌ها در مغز حنین و فرد بالغ است (۱۸،۲۳). در ژن تائوی انسانی حداقل ۳۰ موتاسیون از نوع بد معنی، خاموش، حذف و درون اینترونی گزارش شده‌اند (۶۰). این موتاسیون‌ها در دو کلاس قرار می‌گیرند که در کلاس اول عملکرد بیوشیمیایی تائو دچار تغییر می‌شود و کلاس دوم با تاثیر بر نسبت $4R/3R$ بر اگزون ۱۰ عمل می‌کند. موتاسیون‌هایی که توانایی تائوی موتانت را در اتصال به میکروتوبول‌ها و پایدار کردن آنها تحت تاثیر می‌گذارند، همواره در اگزون‌های ۱، ۹، ۱۱، ۱۲ اتفاق می‌افتند و این موتاسیون‌ها در هر شش ایزوفرم تائو دیده می‌شوند. به نظر می‌رسد که عده‌ای از موتاسیون‌ها هم بر عملکرد تائو و هم بر نسبت $4R/3R$ اثر می‌گذارند. در بر داشتن متعادل اگزون ۱۰ حداقل به ده توالی تنظیم کننده پردازش از نوع Cis نیاز دارد که شامل توالی‌های افزاینده و مهارکننده می‌شود (۶۰).

بیماری آلزایمر با دو ویژگی پاتولوژیکی شناخته می‌شود که این دو ویژگی وجود پلاک‌های پیری و گره‌های نوروفیبریلاری می‌باشند. که گره‌های نوروفیبریلاری از فیلامنت‌های به هم پیچ خورده تائو درست شده‌اند (۵). در فسفوریلاسیون تائو کینازهای گوناگونی مشارکت می‌کنند و در تائو نیز موتیف‌های گوناگونی برای عمل این کینازها وجود دارد. موتیف S/TXXXS/T که توالی مورد اثر GSK3 می‌باشد. در مولکول تائو ۲۲ بار تکرار شده است. برخی از این موتیف‌ها در شرایط *in vivo* نیز مورد تایید قرار گرفته‌اند (۵۴، ۵۱). هنگامی که با استفاده از ترکیباتی پلی‌مریزاسیون تائو افزایش یابد، تائوی هایپر فسفریله به صورت پلی‌مرهای رشته‌ای در می‌آید، در حالی است که تائوی معمولی این توانایی را ندارد (۵۳).

مکانیسم‌های مختلفی سبب افزایش تائوی هایپر فسفریله می‌شوند. برای مثال در بیماری آلزایمر افزایش سطح تائوی هایپر فسفریله، می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت GSK3 باشد و دلیل فعال شدن این کیناز

می‌تواند حاصل عملکرد آمیلوئید بتا که آنتاگونیست رسپتور انسولین است و می‌تواند باعث فعال شدن GSK3 شود (۳۱، ۳۵، ۶۰، ۵۴).

تائو در مغز بیماران آلزایمری در مقایسه با افراد مسن ولی سالم ۴-۸ برابر بیشتر است که این تائو عمدتاً به شکل هایپر فسفوریله دیده می‌شود (۵۶، ۵۳). این تائوی غیر طبیعی و هایپر فسفوریله، در مغز بیماران آلزایمری به دو شکل دیده می‌شود که در یک شکل از آن به صورت فیلامنت‌های پیچ خورده که تا حدودی با فیلامنت‌های صاف مخلوط شده است، پلی مریزه می‌شود و در شکل دیگر، به شکل غیر رشته ای در سیتوپلاسم دیده می‌شود. تائوی تشکیل دهنده گره‌های نوروفیبریلاری ظاهراً در افزایش تجمع میکروتوبول‌ها هستند تائوی نرمال عمل می‌کند، این در حالی است که تائوی هایپر فسفوریله غیر طبیعی سیتوزولی، نه تنها با میکروتوبول‌ها واکنش نمی‌دهد بلکه باعث جدا کردن تائو از سایر پروتئین‌های متصل شونده به میکروتوبول‌ها، مانند MAP1 و MAP2 می‌شود. تائوی هایپر فسفوریله غیر طبیعی به تجزیه شدن توسط پروتئازها مقاومت نشان می‌دهد و دلیل آن می‌تواند این باشد که سطح تائو در بیماران آلزایمری چندین شده است (۵۶، ۵۴، ۵۱، ۴۸، ۴۶).

فعالیت پروتئین کینازهای PP2A و PP1A در بیماران آلزایمری مورد تایید قرار گرفته است و فسفوریلاسیون تائو که سبب جدا شدن آن از میکروتونول‌ها می‌شود توسط PP2A تنظیم می‌شود. PP2A همچنین فعالیت برخی کینازها تائو را در مغز به صورت مستقیم و غیر مستقیم تنظیم می‌کند (۴۷، ۴۶، ۵۱، ۵۵، ۵۴).

ژن تائو دارای ۱۶ اگزون می‌باشد که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ در موقعیت ۱۷q۲۱ قرار گرفته دارد (۱۷). در انسان، تائو در نورون‌ها یافت می‌شود هر چند که سلول‌های غیر نورونی نیز دارای مقدار کمی تائو می‌باشند. اگزون شماره یک تائو بخشی از پروموتور می‌باشد که رونویسی می‌شود ولی ترجمه نمی‌شود. اگزون-های ۲، ۴، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳ از اگزون‌های دائمی می‌باشند اگزون‌های ۲، ۱۰، ۳ به صورت متناوب پردازش می‌شوند و اگزون ۲ هرگز به صورت مستقل از اگزون ۳ پردازش نمی‌شود (۹). ژن MAPT به همراه چند ژن دیگر در یک ناحیه ژنومی به طول ۹۰۰ کیلو باز قرار گرفته‌اند که توسط تکرارهای معکوس با کپی کم احاطه شده‌اند. که در خلال تکامل پرمات‌ها از طریق یک نوترکیبی غیر آلل همولوگ یک پلی مورفیسم ژنومی به

نام H1 و H2 شده است که این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که تکرارهای با کپی کم مربوط به MAPT را نسبت به نوترکیبی مستعد می‌کند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که هاپلوتایپ H2 در راندن ژن تائو به سوی بیان شدن از هاپلوتایپ H1 موثرتر می‌باشد (۶۲).

H2 هاپلوتایپی منفرد است که چندین ژن را در بازوی بلند کروموزوم ۱۷ پوشش می‌دهد هاپلوتایپ H2 نماینده یک ساب کروموزومی یک مگا بازی می‌باشد که باعث کاهش نوترکیبی در این ناحیه از کروموزوم ۱۷ می‌شود. از سوی دیگر هاپلوتایپ H2 گوناگونی فراوانی نشان می‌دهد و گزارشاتی دال بر ارتباط واریانت ویژه‌ای از هاپلوتایپ H1 (H1c) با بیماری آلزایمر و سایر تائوپاتی‌های اسپورادیک وجود دارد (۶۳).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که ژن تائو دارای دو جزیره CPG می‌باشد که یکی از آن‌ها با پروموتور و دیگری با اگزون ۹ در ارتباط می‌باشد. جزیره CPG مربوط به پروموتور ژن تائو شبیه پرموتورهای مخصوص نوروں ها است. توالی پروموتوری در تائو فاقد جعبه TATA و به نظر می‌رسد همانند ژن‌های خانه دار دارای چندین جایگاه شروع باشد. جایگاه اتصال به SP1 که در تعیین جهت رونویسی در سایر پرموتورهای بدون TATA دخیل می‌باشند. در نزدیکی اولین جایگاه شروع رونویسی در تائو نیز یافت می‌شود. اعتقاد بر این است که جایگاه‌های اتصال به SP1 بیان ویژه نورونی تائو را کنترل نماید (۹). در نوروں‌های سیستم عصبی مرکزی اگزون‌های ۲، ۳، ۱۰ به صورت متناوب پردازش می‌شوند. با پردازش متناوب Mina مربوط به تائو حداقل شش ایزوفرم حاصل می‌شوند که طولی بین ۴۴۱-۳۵۲ اسید آمینه دارند و وزن مولکولی آنها از ۴۶-۳۷ کیلو دالتون متفاوت است (۱۷، ۱۵). تفاوت شش ایزوفرم تائو با یکدیگر در دو ویژگی می‌باشد که ویژگی اول مربوط به حضور یا عدم حضور تکرار چهارمی ۳۱ اسید آمینه‌ای در دومین متصل شونده به میکروتوبول می‌باشد و اختلاف دوم در داشتن هیچ، یک یا دو دخول در بخش انتهایی آمینی این پروتئین است. تائو یک پروتئین سیتوزولی می‌باشد که عمدتاً در اکسون‌ها یافت می‌شود هر چند که می‌تواند در ارتباط با غشاء سلوبی نیز باشد (۶۴).

این پروتئین بر اساس تعداد تکرارهای متصل شونده به میکروتوبول‌ها به دو نوع 3R-Tau و 4R-Tau تقسیم می‌شود که میل ترکیبی ایزوفرم‌های 4R جهت اتصال به میکروتوبول‌ها بیش از ایزوفرم‌های 3R می‌باشد

(۲۳). ایزوفرم‌های هایپر فسفوریله شده از این پروتئین به شکل NFTs در می‌آیند که از ویژگی‌های اساسی پاتولوژیک در بیماری آلزایمر می‌باشد (۵۹).

در بیماری آلزایمر تفاوت تائوی اجتماع یافته در مقایسه با تائوی منفرد این است که تائوی اجتماع یافته دارای فسفوریلاسیون بیشتری است که سبب کاهش تحرک الکتروفوری آن می‌شود. دو ناحیه غنی از پرولین که فسفوریلاسیون آن‌ها اتصال تائو به میکروتوبول‌ها را تحت تاثیر می‌گذارد دو طرف دومین اتصال به میکروتوبول را احاطه کرده است (۶۴). در شرایط *in vitro* پر.تئین تائو توسط فسفاتازهای گوناگونی دفسفوریله می‌شود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به PP2A، PPA، و PP2B اشاره نمود. تائو علاوه بر فسفوریله شدن در بسیاری از اسیدهای آمینه سرین و تره اونین خود، در تیروزین ۱۸ نیز فسفوریله می‌شود که احتمالاً تیروزین کینازی به نام Fyn عهده دار این فسفوریلاسیون می‌باشد. Fyn همچنین با فسفوریلاسیون کدن $GSK3\beta$ که منجر به افزایش فعالیت آن می‌شود سبب افزایش فسفوریلاسیون تائو توسط این آنزیم می‌شود (۴۶، ۵۱، ۵۴، ۵۵).

در سال ۱۹۷۵ پروتئین تائو کشف شد. به خوبی معلوم شده است که فسفوریله شدن $GSK3\beta$ در سرین ۹ سبب مهار فعالیت آن در حالی است که فسفوریلاسیون آن در تیروزین ۲۱۶ باعث افزایش فعالیت آن می‌شود. AKT باعث فسفوریلاسیون $GSK3\beta$ در سرین ۹ می‌شود و بنابراین مهارکننده $GSK3\beta$ می‌باشد. گزارش شده است که کلسیم نیز در تنظیم فعالیت $GSK3\beta$ ایفای نقش می‌کند. یک افزایش گذرای متوسط در کلسیم درون سلولی سبب افزایش طولانی مدت فسفوریلاسیون تائو توسط $GSK3\beta$ می‌باشد. علاوه بر این ، فسفوریلاسیون تائو توسط $GSK3\beta$ همراه با فسفوریلاسیون در تره اونین ۲۱۶ مربوط به $GSK3\beta$ می‌باشد که فسفوریلاسیون $GSK3\beta$ در وابستگی با کلسیم می‌باشد (۳۵، ۶۵).

۲-۴: بررسی تحقیقات انجام شده

مطالعات صورت پذیرفته در خصوص جنبه‌های مختلف بالینی-مولکولی آلزایمر بیانگر وجود شواهد قوی از دخالت ژن‌ها در ایجاد، گسترش، تنوع بالینی و استعداد ابتلا بیماران به آلزایمر دارد. در این راستا سوابق مطالعاتی صورت پذیرفته در خصوص ارتباط ژن‌های MAPT و APOE و ابتلا به آلزایمر شواهد متنوعی را از چگونگی سطح معناداری نشان داده است.

بررسی‌های صورت پذیرفته در خصوص APOE بیانگر وجود ارتباط معنی‌دار در تنوع ε4 با استعداد ابتلا به آلزایمر در جمعیت‌های متنوعی است بطور مثال:

اسکوت و همکاران در سال ۱۹۹۷ در مطالعه‌ای بررسی کردند:

وجود آلل ε4 باعث کاهش سن شروع بیماری آلزایمر میگردد در حالیکه آلل ε۲، سبب افزایش سن شروع بیماری شده و نقش حفاظتی در برابر بیماری از نوع دیررس دارد، اما نقش حفاظتی آن در نوع زودرس هنوز تحت بررسی است (۲۱).

هافمن و همکاران در سال ۱۹۹۷ در مطالعه‌ای بررسی کردند:

حضور یک بیماری قلبی-عروقی، سبب بروز حالت شدیدتر بیماری آلزایمر می‌شود و طبق مطالعات اپید میولوژیک، در افراد حداقل با یک آلل ε4 و علائم آترواسکروز بیشترین خطر ابتلا به بیماری آلزایمر و افراد فاقد این آلل و فاقد آترواسکروز، کمترین خطر ابتلا وجود دارد (۲۳)

هولتزمن و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه‌ای بررسی کردند:

مطالعات هیستوشیمی، حضور پروتئین APOE را در رسوبات بتا آمیلوئیدی و بافت مغز افراد بیمار نشان داده بود به طوریکه افراد حامل آلل ε4 نسبت به افراد غیر حامل، دارای پلاک‌های آمیلوئیدی بیشتری بودند (۲۰).

پریک و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه‌ای بررسی کردند:

وجود آلل ε4 برای ابتلا به بیماری آلزایمر کافی و لازم نیست به طوری که بیش از یک سوم از افراد مبتلا، فاقد حتی یک آلل ε4 هستند و خطر این عامل در جمعیت‌های مختلف، متفاوت است و حتی در برخی جوامع فراوانی این آلل در بین بیماران آلزایمری کمتر از افراد سالم گزارش شده است (۲۲).

مطالعات مشابه در جمعیت ایرانی نتایج فوق را تأیید می‌کند به طور مثال: در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰: در مطالعه صورت گرفته در میان جمعیت ایرانی، تعداد ۱۵۴ بیمار آلزایمری اسپورادیک و ۱۶۲ فرد کنترل (شاهد) مورد بررسی قرار گرفته است که حاکی از ارتباط معنادار آلل ε4 با بیماری آلزایمر دیررس است (Pvalue ≤ ۰/۰۰۱).

جدیدترین مطالعه در زمینه ارتباط این تنوع آلل APOε4 با بیماری آلزایمر، در سال ۲۰۱۴ صورت گرفته است و در آن حجم نمونه‌ای به تعداد ۶۷۷۷ شرکت کننده مورد بررسی قرار گرفتند و پس از انجام آنالیزهای آماری لازم ارتباط معنادار آلل ε4 با بیماری آلزایمر دیررس شناخته شد ($Pvalue \leq 0/001$). جمع بندی سوابق مطالعاتی فوق بیانگر وجود ارتباط معنی دار تنوع آلل APOε4 و بیماری آلزایمر در اکثر جمعیت‌های مورد بررسی است.

بررسی‌های صورت پذیرفته در خصوص ارتباط ژن MAPT و جهش‌های آن در ابتلا به آلزایمر بیانگر آن است که :

ازکورا و همکاران در سال ۱۹۹۹: در مطالعه ای در جمعیت اسپانیا بر روی پلی مورفیسم C/G در ناحیه پروموتوری در ارتباط با بیماری آلزایمر. در این مطالعه ۷۴ فرد مبتلا به بیماری آلزایمر و ۱۹۵ فرد سالم، در این پلی مورفیسم، مورد مطالعه قرار گرفتند. در این مطالعه ارتباط معناداری بین این پلی مورفیسم و بیماری آلزایمر یافت نشد ($Pvalue \leq 0/0527$) (۳۱).

لیز و همکاران در سال ۲۰۰۱: ژن تائو در بیماری PSP دارای سه پلی مورفیسم است که دو پلی مورفیسم در پروموتور (A/G در موقعیت ۴۴- و C/G در موقعیت ۲۲۱-) و یک پلی مورفیسم در اینترون شماره ۱ (G/A در موقعیت ۳۰۹) آن می‌باشد که حاصل این پلی مورفیسم ایجاد دو هاپلوتایپ H1p و H2 است که هاپلوتایپ H2p با $pvalue \leq 0/000217$ با بیماری PSP در ارتباط می‌باشد. از آنجا که ژن تائو در بیماری آلزایمر حائز اهمیت است این تغییر پروموتوری دیده شده در پروموتور تائو در بیماری PSP ممکن است در بیماری آلزایمر نیز مهم باشد (۳۰).

کانراد و همکاران در سال ۲۰۰۲: در مطالعه ای بررسی کردند ژن سایتوهین (STH) دارای پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی است که G7R نامیده و با هاپلوتایپ تائو در ارتباط است (۲۸).

رادمیکرز و همکاران در سال ۲۰۰۳: در مطالعه‌ای بررسی کردند که ژن MAPT با بیماری آلزایمر ارتباط معناداری دارد و باید به عنوان یک ژن کاندید برای بیماری آلزایمر خانوادگی و اسپورادیک در نظر گرفته شود (۲۶).

مایر و همکاران در سال ۲۰۰۵: گزارش کردند که هاپلوتایپ H1c از ژن MAPT با ریسک ابتلا به بیماری آلزایمر دیررس ارتباط معناداری دارد. این مطالعه بر روی ۳۶۰ نمونه بیمار با سن بالای ۶۵ سال و ۲۵۲ نفر به عنوان گروه کنترل انجام شده است (۲۷).

کفری و همکاران در سال ۲۰۰۷: در مطالعه‌ای بررسی کردند در تمامی طول لوکوس ژنومی MAPT دو هاپلوتایپ شناسایی شده‌اند که این هاپلوتایپ‌ها را H1 و H2 می‌نامند که واریانت‌های H1 با بیماری آلزایمر در ارتباط می‌باشد (۲۹).

کواک و همکاران در سال ۲۰۰۸: نشان دادند که جهش در ناحیه آلل G/A (rs242557) باعث افزایش بیان ژن MAPT و ساختار غیرطبیعی آن می‌شوند. در نتیجه به جای میکروتوبول‌ها به میکروفیلامنت‌ها متصل می‌گردد و این موجب بیماری آلزایمر می‌گردد. همچنین نویسنده اشاره دارد به این موضوع که هاپلوتایپ‌های H1/H2 از ژن MAPT با عملکرد پلی مورفیسم‌های موجود در ژن GSK3B و افزایش ریسک ابتلا به آلزایمر در ارتباط است (۲۴).

لیو و همکاران در سال ۲۰۱۳: در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم (rs 242557) در ژن MAPT با بیماری آلزایمر دیررس بررسی شده است و ارتباط معناداری بین این پلی مورفیسم و بیماری آلزایمر وجود داشته و به عنوان یک ریسک فاکتور برای بیماری آلزایمر دیررس معرفی شده است (۲۵).

جدیدترین مطالعه در زمینه ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری آلزایمر، در سال ۲۰۱۴ صورت گرفته است و در آن حجم نمونه‌ای به تعداد ۱۴۱ نفر بیمار و ۱۷۹ نفر کنترل (شاهد) شرکت کننده مورد بررسی قرار گرفتند و پس از انجام آنالیزهای آماری لازم ارتباط معنادار این پلی مورفیسم با بیماری آلزایمر دیررس شناخته شد ($P\text{value} \leq 0.02$)

منابع پارس پر وفه

فصل سوم:

مواد و روش‌ها

۳-۱: روش شناسی تحقیق

۳-۱-۱: نوع مطالعه

روش تحقیق توصیفی مقطعی از نوع Case-series می باشد و با توجه به اینکه دسترسی به بیماران آلزایمری قطعی مشکل بوده و نیز تغییرات مورد بررسی MAF (Minimum Allele frequency) مشخص در جمعیت ایرانی ندارند لذا نهایتاً تحقیق به صورت Case Series صورت پذیرفته و حداقل امکان موجود و جامعه در دسترس ۵۰ بیمار تعیین گردیده است که امکان دسترسی داشته باشد.

۳-۱-۲: جامعه آماری

بیماران مبتلا به آلزایمر، بستری در مرکز نگهداری (نورسته) و سایر مراکز همکار مورد ارزیابی اولیه قرار گرفته و پس از بیماری یابی و تائید بیماری توسط متخصص اعصاب و روان، مشاوره و ثبت اطلاعات پرسشنامه طرح تحقیقاتی از طریق مصاحبه با خانواده بیمار و مطالعه پرونده‌ی بیمار انجام یافته و افراد کاندید برای بررسی انتخاب می‌گردند که پس از کسب رضایت اولیاء و همراهان با نمونه‌گیری از افراد مبتلا و در صورت امکان خانواده‌ی آنان به میزان ۵ cc خون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA، استخراج DNA صورت پذیرفته و با استفاده از دستگاه نانودراپ کیفیت سنجی نمونه‌ها انجام پذیرفته و از هر بیمار حداقل ۱۰۰ میکرولیتر DNA تهیه گردیده و جهت بررسی مولکولی استفاده می‌گردد.

۳-۱-۳: معیار DSM-IV

DSM، در واقع کتابی است که اولین بار در سال ۱۹۵۲ توسط Psychiatric Association American به عنوان معیاری برای تشخیص ناهنجاری‌های ذهنی به چاپ رسید و ناهنجاری‌های جدید به تدریج به آن افزوده شد. آخرین نسخه این کتاب، در سال ۱۹۹۴ به چاپ رسید که در ایالات متحده و بسیاری از نقاط جهان توسط پزشکان و محققین، به عنوان یک معیار تشخیصی مورد استفاده قرار می‌گیرد. DSM-IV تنها به عنوان

معیار تشخیصی پس از معاینه مورد استفاده قرار می‌گیرد و فاقد راهنمایی جهت نحوه معاینه و یا درمان است. یکی از کاربردهای این معیار، در اهداف تحقیقی است. در مطالعات متمرکز بر یک بیماری خاص، افرادی که دارای علائمی مطابق با معیارهای DSM-IV برای آن بیماری خاص، هستند به عنوان بیمار وارد مطالعه می‌شوند.

معیارهای DSM-IV برای تشخیص زوال عقل از نوع آلزایمر :

الف- بروز نقص‌های شناختی که عبارتند از :

۱- نقص در حافظه که به صورت نقص در یادگیری اطلاعات جدید و یا یادآوری اطلاعات یاد گرفته شده قبلی است .

۲- یک یا دو نقص شناختی مانند : عدم توانایی در سخن گفتن^۱، عدم تشخیص افراد و اشیاء با وجود سالم بودن حواس^۲ و عدم انجام فعالیت‌های حرکتی با وجود سیستم حرکتی سالم^۳

ب- نقص‌های شناختی مذکور در الف-۱ و الف-۲، باعث نقصان‌های قابل توجهی در عملکرد شغلی و اجتماعی فرد و تنزل او از جایگاه قبلیش می‌گردد.

پ -بیماری آغاز تدریجی داشته و تا تنزل شناختی ادامه می‌یابد.

ت- نقص‌های مذکور در الف-۱ و الف-۲ به واسطه عوامل زیر نیستند :

۱- شرایطی از سیستم عصبی مرکزی که سیبب نقص پیشرونده در حافظه و شناخت می‌شوند مانند بیماری های مغزی عروقی ، پارکینسون ،هماتوم زیر سخت شامه ، زوال عقلی ناشی از هیدروسفالی و تومور مغزی .

- شرایط سیستمیک که از عوامل ایجاد زوال عقل به شمار می‌آید مانند : کم کاری تیروئید ، کمبود ویتامین

B یا اسید فولیک ، کمبود نیاسین ، کلسیم بالا ، سیفیلین سیستم عصبی مرکزی و عفونت HIV .

۳- شرایط القایی توسط یک ماده خاص .

ث- نقصان‌ها منحصر در یک دوران روان آشفتگی رخ نمی‌دهد.

¹ -aphasia

² - agnosia

³ - apraxia

۳-۱-۴ : معیارهای انتخاب بیماران

تشخیص بیماری با معیار DSM-IV، سن بالای ۶۵ سال و امضای فرم رضایت نامه توسط بیمار یا قیم وی به عنوان معیار ورود مطالعه محسوب می‌شدند. سن کمتر از ۶۵ سال، وجود هر گونه بیماری نورولوژیک یا روانپزشکی همراه، وجود سابقه خانوادگی و عدم تمایل به همکاری از طرف بیمار و یا قیم وی به عنوان معیار خروج برای انتخاب بیماران در نظر گرفته شدند.

۳-۱-۵ : روش جمع آوری داده‌ها

اطلاعات افراد حاضر در مطالعه از طریق مراجعه حضوری به مراکز ذکر شده، گردآوری شد. بخشی از داده‌ها از طریق مصاحبه با افراد یا پرسنل شاغل در مراکز و بخشی نیز از پرونده آن‌ها بدست آمد. داده‌های حاصل از آزمون‌های مولکولی نیز در فرم جمع آوری اطلاعات ثبت شد.

۳-۱-۵ : تعریف عملیاتی متغیرها و مقیاس اندازه‌گیری

مقیاس	روش اندازه‌گیری	تعریف علمی - عملی	متغیر	متغیر کمی	نوع متغیر
			کیفی	پیوسته	مستقل
			اسمی	گسسته	وابسته
			رتبه‌ای		
بلی خیر	معاینه پزشک	DSM معیار	✓		✓
مثبت منفی	Tetra ARMS-PCR	MAPT ژن			پلی مورفیسم در ژن (rs242557) MAPT

۳-۱-۶ : ملاحظات اخلاقی

از آنجا که این مطالعه نیازمند گرفتن نمونه خون و اخذ برخی اطلاعات از افراد بود، فرم رضایت نامه برای حاضرین در مطالعه تهیه شد و در مورد بیماران، این فرم به امضای قیم آنها و در گروه شاهد، به امضای خود فرد رسید. اطلاعات افراد به صورت محرمانه بوده و نتایج بدون ذکر مشخصات خواهد بود.

۳-۲: روش اجرا

۳-۲-۱ : استخراج DNA

روش‌های متعددی برای استخراج DNA وجود دارد. که در این تحقیق با توجه به کمیت و کیفیت مناسب DNA حاصله برای انجام PCR و همچنین نسبتاً بی ضرر بودن محلول‌های مورد استفاده در این روش‌ها، DNA بیمار ان را از روش نمک اشباع شده و کلروفرم استخراج نمودیم.

استخراج DNA با استفاده از روش نمک اشباع:

مواد و تجهیزات مورد استفاده برای انجام استخراج DNA به روش نمک اشباع

مواد لازم:

✓ ایزوپروپانول ۱۰۰ درصد

✓ پروتئیناز K ۰.۰۲ درصد

✓ بافر Tris-EDTA-NaCl

✓ سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد

✓ کلرید سدیم اشباع (۶مولار)

✓ اتانول ۷۰ درصد (merck)

✓ آب مقطر

تجهیزات لازم:

✓ میکروتیوپ با حجم ۱/۵ میکرولیتر

✓ سانتریفیوژ با حداکثر دور ۱۴۰۰۰ (اپندروف)

✓ هات پلیت (زیماژن-ایران)

✓ بنماری (محصول شرکت بهداد)

✓ میکروفیوژ ورتکس (mxcell)

✓ هود لامینار کلاس ۲ یا هود PCR یا PCR Work Station (زیماژن)

✓ سمپلرهای متغیر از ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر (socorex)

✓ سر سمپلرهای کریستالی، زرد و آبی رنگ

✓ دستکش‌های لاتکس

✓ رک سر سمپلر

✓ روپوش

✓ پارافیلیم

تهیه محلول‌های مورد نیاز

بافر (TES (Tris-EDTA-Salt, pH; ۷/۵-۸)

برای تهیه این بافر ابتدا محلولهای زیر تهیه شد که در زیر توضیح هر کدام از آنها آمده است:

Tris-HCl(1M, PH:۷/۴-۸)

۱۴/۱۲۱ گرم از Tris-HCl را در داخل آب مقطر حل کرده و سپس تنظیم pH با HCl صورت گرفت.

EDTA: (۰/۵M , PH:۸)

۱۸۶/۱ گرم دی سدیم اتیلن دی آمین تترااستات را که در ساختمانش حاوی ۲ مولکول آب است در ۸۰۰ ml آب مقطر ریخته و روی همزن مغناطیسی قرار داده سپس pH محلول را با استفاده از NaOH به ۸ رسانده، پس از حل شدن، حجم محلول با آب مقطر به یک لیتر رسید. در نهایت محلول به دست آمده به کمک فیلتر میلی پور ۰/۲ μ m در زیر هود فیلتر شده و در حجم‌های کوچک تقسیم و در یخچال نگه داری شد.

NaCl(۵M)

۲۹۲/۲ گرم NaCl در ۸۰۰ ml آب مقطر حل شده و سپس حجم نهایی محلول به یک لیتر رسید.

جهت تهیه بافر Tris-EDTA-NaCl مقادیر ۱۰ میلی لیتر Tris-HCl ۱ مولار، ۳۰ میلی لیتر EDTA ۵ مولار و ۳۰ میلی لیتر NaCl ۵ مولار را مخلوط کرده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و سپس محلول مورد نظر به کمک فیلتر میلی پور استریل شد و با اسید به pH= ۷/۵ رسانده می شود.

SDS (۱۰ درصد)

۱۰۰ گرم SDS در ۹۰۰ ml آب مقطر حل شده و تا ۶۸ °C گرم شد. Ph محلول با استفاده از HC به ۷/۷ و حجم محلول با آب مقطر به یک لیتر رسید.

بافر (۱X, pH:۸) TE

۱۰ ML از (۵ M) Tris-HCl را با ۲ ml از (۰/۵ M) EDTA مخلوط کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر استریل به ۱ لیتر رسانده شد و سپس به کمک فیلتر میلی پور استریل شد.

روش کار

(۱) به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از خون حاوی EDTA، به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا سرم آن جدا گردد. (خون کهنه و فریز شده به دلیل لیز شدن نیازی به جداسازی سرم ندارد). سپس این سرم حذف گشت.

(۲) جهت لیز کرن گلبول های قرمز خون، به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر سرد به رسوب سلولی افزوده و پلیت سلولی در آن حل گردید. این عمل باعث می شود که گلبول های قرمز سفید بترکند و هسته ها بیرون بریزند.

(۳) انجام مراحل ۱ و ۲، تا سه مرتبه تکرار شد تا لایه سلولی با رنگ صورتی شفاف حاصل گردد که به معنای حذف کامل گلبول های قرمز می باشد.

(۴) سپس ۵۰۰ میکرولیتر Tris-EDTA-salt (TES) اضافه و کاملاً مخلوط گردید. در این مرحله گلبول های سفید لیز شده و رسوب به دست آمده کاملاً به حالت محلول در می آید.

(۵) به محلول فوق ۵۰ میکرولیتر محلول سدیم دو دسیل سولفات (۱۰ درصد) افزوده شد و بعد از اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۰/۰۲ درصد) و بعد از اینورت کردن ملایم این مخلوط، درب میکروتیوپ ها با پارافیلیم بسته شد و سپس بین ۴ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل بنماری قرار داده شد.

(۶) پس از خروج میکروتیوپ‌ها از بن ماری، به میزان یک سوم حجم موجود (۱۵۰ میکرولیتر) محلول کلرید سدیم (NaCl) اشباع به آن افزوده شد تا رنگ آن کدر شود. در صورت عدم تغییر باید میزان NaCl را بیشتر کرد. عمل NaCl، کمک به رسوب پروتئین‌هاست.

نکته: معمولاً اولین حجم ۲۵۰ میکرولیتر خواهد بود که در اکثر موارد بعد از کمی تامل کدر می‌شود. در صورت نیاز هر بار به میزان ۱۰ میکرولیتر اضافه می‌گردد. چرا که، مقادیر اضافی NaCl در محیط، به عنوان مهار کننده PCR عمل می‌کند. (۷) پس از سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، محلول رویی به یک لوله ی تمیز و استریل انتقال داده شد و به میزان حداقل ۰/۷ حجم محلول (حدوداً ۵۰۰ میکرولیتر) به آن ایزوپروپانل افزوده شد تا کلاف DNA ظاهر شود.

نکته: در مواردی که کلاف دیده نمی‌شود می‌توان محلول الکل و DNA را برای یک ساعت در فریزر قرار داد تا کریستاله شدن تسریع گردد.

(۸) مجدداً میکروتیوپ‌ها در ۸۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳۰ ثانیه تحت سانتریفیوژ قرار گرفتند و سپس مایع رویی حذف گردید.

(۹) با هدف شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب فوق افزوده شد و سانتریفیوژ گردید. این مرحله، جهت حذف نمک‌های باقی مانده، که مانع PCR هستند، ۳ مرتبه تکرار می‌شود.

(۱۰) سپس، درب میکروتیوب باز گذاشته شد تا الکل باقیمانده تبخیر شود.

می‌توان از ترموبلاک با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد هم استفاده کرد. البته باید توجه داشت که مدت زمان استفاده نباید زیاد باشد در غیر این صورت DNA بیش از حد خشک می‌شود.

(۱۱) با توجه به حجم DNA بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل بدان افزوده شد تا DNA حل گردد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۲-۳) روش استخراج DNA با استفاده از کلروفرم:

مواد لازم:

✓ آب مقطر

✓ NaCl اشباع (۶مولار)

✓ N-Lysis

✓ کلروفرم

✓ اتانول ۱۰۰٪

✓ اتانول ۷۰٪

✓ تجهیزات لازم:

✓ میکروتیوپ با حجم ۱/۵ میکرولیتر

✓ سانتریفیوژ با حداکثر دور ۱۴۰۰۰ (اپندروف)

✓ هات پلیت (زیماژن-ایران)

✓ میکروپیوژ ورتکس (mxcell)

✓ هود لامینار کلاس ۲ یا هود PCR یا PCR Work Station (زیماژن)

✓ سمپلرهای متغیر از ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر (socorex)

✓ سر سمپلرهای کریستالی، زرد و آبی رنگ

✓ دستکش های لاتکس

✓ رک سر سمپلر

✓ روپوش

✓ پارافیلیم

روش تهیه محلول های مورد نیاز جهت استخراج DNA:

روش تهیه محلول کلرید سدیم ۶ مولار NaCl (M)

جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محلول کلرید سدیم ۶ مولار مقدار ۳۱/۵۶۴ گرم NaCl در آب مقطر حل گردید

و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد، محلول حاصل در دمای اتاق نگهداری می شود.

منابع پارس پر وفه

محلول N-Lysis:

ماده	وزن	محصول شرکت
Tris	58gr	Merck
EDTA	1/57gr	Merck
SDS	5 gr	Sigma

مواد ذکر شده در جدول فوق را با حجم‌های مورد نظر مخلوط کرده و سپس با استفاده از آب مقطر

دیونیزه حجم نهایی را به ۵۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم.

استخراج DNA از خون به روش کلروفرم:

این روش در دو مرحله انجام می‌شود:

مرحله اول

(۱) ۵۰۰ میکرولیتر خون را در ویال ۱٫۵ میلی لیتری ریخته به آن ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر سرد اضافه نموده و

آن را پیپتینگ می‌کنیم. سپس آن را با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ قرار می‌دهیم. این عمل را تا سه بار تکرار می‌نماییم.

(۲) مایع رویی را دور ریخته و رسوب را نگه می‌داریم.

(۳) اضافه نمودن ۳۰۰ میکرولیتر N-lysis - به رسوب برجای مانده و پیپتینگ آن جهت لیز شدن هسته سلول‌ها. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرارداد داده شد.

(۴) اضافه نمودن ۲۵۰ میکرولیتر NaCl - اشباع وورتکس نمودن آن جهت حذف پروتئین‌ها.

(۵) اضافه نمودن ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم و وورتکس نمودن آنها و سپس نمونه‌ها با دور rpm ۴۵۰۰ به مدت ۴

دقیقه سانتریفوژ شد (به منظور جداسازی DNA از سایر قسمت‌ها به واسطه تشکیل دو فاز مختلف).

(۶) جدا کردن مایع رویی حاوی DNA و منتقل کردن آن به یک میکروتیوپ استریل دیگر به نحوی که با کلروفرم زیر آن مخلوط نشود.

(۷) اضافه کردن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد برای کریستاله کردن DNA، سپس درب ویال را با پارافیلیم

پوشانده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد.

مرحله دوم

۱. جهت رسوب DNA روز بعد ابتدا نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. اگر DNA مشاهده نشد به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌شود.

۲. سپس مایع رویی را دور ریخته و شستشوی نهایی با الکل ۷۰ درصد به مقدار ۲۵۰ میکرولیتر انجام می‌دهیم. (این عمل را تا سه بار تکرار می‌کنیم و هر بار در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت دو دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم.) در آخرین شستشو الکل را دور ریخته و درب ویال را باز گذاشته تا الکل کاملاً خشک شود. اضافه کردن ۷۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر جهت حل شدن رسوب DNA.

۳-۳) سنجش کیفیت و کمیت DNA

۳-۳-۱) سنجش کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ

کیفیت و کمیت تمام نمونه‌های DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ، با نسبت OD 260/280 (نشانگر خلوص) انجام شد. برای این کار بعد از صفر کردن دستگاه با آب مقطر، ۵ میکرولیتر از DNA متعلق به هر یک از نمونه‌ها به جایگاه مخصوص در دستگاه نانودراپ منتقل شد. اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۸ باشد، نشان دهنده این است که جذب عمدتاً به علت اسید نوکلئیک است و کیفیت و خلوص DNA مطلوب است. اعداد کمتر از ۱/۸ آلودگی پروتئین یا فنلی را نشان می‌دهد و اعداد بالاتر از ۲ نشان دهنده آلودگی RNA هستند.

۳-۳-۲) ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به کمک ژل آگارز (الکتروفورز افقی)

مواد و تجهیزات مورد استفاده جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به کمک ژل

آگارز

مواد لازم:

✓ بافر TBE با غلظت 1x

✓ پودر آگارز (شرکت زیست فناوری کوثر)

✓ بافر لودینگ

✓ DNA استخراج شده

✓ پودر ساکارز (محصول شرکت Merk)

✓ بروموفنول بلو (محصول شرکت Sigma)

✓ سایبرگرین (محصول شرکت Bioron)

تجهیزات لازم:

✓ بشر

✓ هیتر برقی (Persia shimi)

✓ سینی ژل و شانه (محصول شرکت پایا پژوهش پارس)

✓ تانک الکتروفورز (محصول شرکت پدیده نوژن پارس)

✓ منبع تغذیه (محصول شرکت فن آوران سهندآذر)

✓ دستگاه ترانس لومیناتور (محصول شرکت کیاژن)

✓ سمپلر (محصول شرکت socorex)

✓ سر سمپلر

✓ مگنت مغناطیسی (Persia shimi)

✓ نانو دراپ (ترمو سایننتفیک آمریکا)

طرز تهیه بافرها

الف) بافر 10x TBE

مقدار ۷/۵ گرم EDTA در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و به مخلوط حاصل ۱۰۸/۹۹ گرم Tris base و

۵۵/۶۵ گرم Boric acid اضافه کرده و توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

جهت تهیه بافر TBE با غلظت 1x، ۱۰۰ میلی لیتر بافر 10x TBE را با ۹۰۰ میلی لیتر آب به حجم ۱ لیتر رسانده شد.

ب) بافر لودینگ

مقدار ۵۰۰ میکرولیتر لودینگ بافر و ۵۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulphoxide (Dmsو) به ۵ میکرولیتر سایبرگرین اضافه شده و به میزان بسیار اندک پودر بروموفنل بلو در این مخلوط حل گشت. لازم به ذکر است برای تهیه ی لودینگ بافر ۵۰۰ میکرولیتری اولیه ۴۰ گرم ساکارز ۴۰٪ همراه با ۲، ۵ گرم بروموفنول بلوی ۲۵٪ با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد و محلول حاصل برای ساخت بافر لودینگ در دمای ۴ درجه نگه داری شد.

روش کار

(۱) پس از رفع آلودگی ها با استفاده از الکل، دو سمت سینی مخصوص ژل را با استفاده از چسب نواری به طور محکم بسته و سپس شانه ژل درون سینی قرار داده شد.

(۲) برای تهیه ۵۰ میلی لیتر ژل آگارز ۲ درصد، ۱ گرم پودر آگارز به همراه ۵۰ میلی لیتر بافر 1x TBE در یک بشر ریخته شد و بشر بر روی هیتر قرار گرفت تا آگارز کاملاً حل شود. جهت همگن کردن این محلول از مگنت مغناطیسی استفاده شد.

(۳) پس از این که محلول شفاف مشاهده گردید، بشر از روی حرارت برداشته شد و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمی خنک شود. سپس درون سینی ژل ریخته شد تا ببندد.

(۴) پس از بسته شدن ژل، شانه به آهستگی برداشته شد و چسب های اطراف سینی باز گردید و سپس سینی محتوی ژل درون تانک الکتروفورز قرار داده شد و مقداری بافر 1-TBE x درون تانک ریخته شد.

(۵) ۴ میکرولیتر از DNA استخراج شده همراه با ۲ میکرولیتر بافر لودینگ مخلوط و با دقت درون چاهک های ژل تزریق شد.

(۶) منبع تغذیه بر روی ولتاژ ۹۰ تنظیم شد و پس از مدت ۲۰ دقیقه جریان قطع گردید و بر روی دستگاه ترانس لومیناتور و با کمک نور UV مشاهده شد.

۴-۳) ژنوتایپ کردن نمونه ها (ژنوتایپینگ)

واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR)

PCR روش بسط آنزیمی یک قطعه از DNA هدف است که بین دو بخش الیگونوکلوئیدی قرار دارد. این واکنش به منظور ایجاد مقادیر نامحدود باز یک توالی مورد نظر می‌باشد. درواقع PCR می‌تواند از یک مولکول منفرد از DNA در مدت چند ساعت چندین بلیون ملکول را تولید کند. این روش هم در تشخیص مولکولی و هم در آنالیز مولکولی بیماریهای ژنتیکی انقلابی به وجود آورده است.

روش Amplification Refractory Mutations System (ARMS/PCR) یک روش نسبتاً ساده سریع جهت تعیین جهش‌های نقطه‌ای، حذف و اضافه شدن چند نوکلئوتیدی و چند شکلی‌های پلی مورفیسم (Polymorphism) است. این تکنیک سنجش دو لوله‌ای با پرایمرهای طبیعی و جهش یافته در واکنش‌های جداگانه می‌باشد که با پرایمرهای کنترلی همراه می‌باشد تا از انجام واکنش PCR اطمینان حاصل شود. (۴۵) در Tetra ARMS/PCR (Tetra Primer Amplification Refractory Mutations System) برای تشخیص یک جهش ویژه، یک جفت آغازگر کنترل در طرفین محل موتاسیون برای اطمینان از عملکرد صحیح PCR طراحی می‌شود. برای تکثیر منطقه حاوی جهش نیز از یک جفت آغازگر که به ترتیب برای آلل جهش یافته و آلل طبیعی طراحی شده، استفاده می‌گردد. (تصویر ۳-۲) پس از انتخاب جفت آغازگرها به منظور اطمینان از ویژگی آنها در اتصال به ناحیه مکملی خود در ژن مربوطه، توالی آغازگرها با تمامی توالی ژنوم انسان در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank مقایسه گردید. به منظور افزایش ویژگی جفت آغازگرهای اصلی، علاوه بر عدم تطابق انتهای ۳،۲ یا ۳ آلل در انتهای ۳ از پرایمرهای داخلی را تغییر می‌دهیم تا از اتصال احتمالی آن آغازگر به آلل مخالف ممانعت به عمل آید. (۴۶)

در این آزمون برای شناسایی پلی مورفیسم rs242557 از ژن MAPT، تکنیک Tetra ARMS/PCR استفاده شد. در این تکنیک ما از ۴ پرایمر استفاده کردیم که خصوصیات کلی آنها در جدول زیر گزارش شده است.

جدول ۱-۳ مشخصات کلی پرایمرها

Primers name	Volume of DW adding to one μL of each primers	Volume of primer	Sequence	TM	Final Concentration
EPCR-A3-FC	350 μL	۰,۳	TAGAGCAACAAGAGGCCACAG	68	100 nmol
EPCR-A3-RM	190 μL	۰,۶	CACACCAGCAATGATGATAC ^C	62	100 nmol
EPCR-A3-TFN	230 μL	۰,۶	CCTGGGCGTCCTGGTGT ^{GA}	68	100 nmol
EPCR-A3-RC	230 μL	۰,۳	TGCCAGCCTCCATCAATCCAG	64	100 nmol

آغازگرها

طراحی پرایمر به روش Tetra ARMS/PCR با استفاده از نرم افزارهای آنلاین primer3 و آفلاین Gene runner و چک در سایت‌های UCSC و NCBI و انجام تست بلاست در سایت NCBI/BLAST صورت گرفت. در تحقیق حاضر سفارش ساخت پرایمرها به شرکت زیست فناوری کوثر (www.kawsar.ir) (KBC) فرستاده شد. این شرکت سنتز پرایمرها را با همکاری کمپانی Biolegio (<http://www.biolegio.com>) انجام می‌دهد.

طبق دستورالعمل شرکت که به همراه پرایمرها ارسال شده است، باید به کرایورهای حاوی پرایمرهای لیوفلیزه آب مقطر دیونیزه اضافه کرد و آن را خوب پیتاژ کرده تا محلول پرایمر مایع یکدست با غلظت ۱۰۰ پیکومول فراهم گردد. از محلول اصلی، محلول کار (Working) با غلظت ۱۰۰ μL تهیه کرده و به منظور PCR مورد استفاده قرار گرفت. م. حلول کار برای تمامی پرایمرها به این صورت تهیه شد که میزان ۳/۱۰ μL از پرایمر FC، ۳/۱۰ μL از پرایمر RC، ۶/۱۰ μL از پرایمر RM و به میزان ۰,۶ mL از پرایمر TFN، با ۸۲ μL آب مقطر به حجم ۱۰۰ μL رسانده شد. پرایمر تهیه شده در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مصارف بعدی نگهداری شد.

¹Primers

مواد و تجهیزات مورد استفاده در واکنش PCR

تجهیزات لازم:

- ✓ ظرف حاوی یخ
- ✓ دستگاه ترموسایکلر (محصول شرکت اپندروف)
- ✓ دستگاه میکروسانتریفیوژ (محصول شرکت Labnet)
- ✓ میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی لیتری
- ✓ سر سمپلر کریستالی و زرد
- ✓ سمپلرهای با حجم‌های ۰/۵ - ۱۰، ۱۰ - ۱۰۰ و ۱۰۰ - ۱۰ میکرولیتر (محصول شرکت BrandTech)

مواد لازم:

- ✓ DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم (ng)
 - ✓ پرایمرهای ۱۰ میکرومولاری (μM)
 - ✓ آب مقطر
 - ✓ Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red
- جهت انجام واکنش PCR، مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۰ μL درون لوله‌های اپندورف (۰/۲ ml مطابق غلظت‌های زیر فراهم گردید:

جدول ۲-۳

	One Reaction
Master Mix	10 μL
4-PRIMER	1.8 μL
DNA	2.5 μL
Water	5.7 μL
Total	20 μL

نمونه‌ها در دور بالا به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ گردید و سپس در دستگاه ترمو سايكلر قرار داده شد .
برنامه زیر برای دستگاه تنظیم گردید.

جدول ۳-۳ برنامه مورد استفاده جهت انجام PCR ژن MAPT

	PCR Programs	
Initial denaturation		95°C for 5 min
	START LOOP	35X
	Denaturation	94°C for 40 Sec
	Annealing	68°C for 40 Sec
	Extension	72°C for 40 Sec
cycles:		72°C for 5 min
		۱۰°C
Final Extension		
Soak		

روش کار

ابتدا Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red و آغازگرها (Primer) از فریزر خارج و مدتی در دمای اتاق قرار داده تا آب شوند. البته کلیه مواد فوق بر روی ظروف حاوی یخ انجام گرفت. مقادیر مورد نیاز از هر ماده، به ترتیب از بیشترین حجم به کمترین حجم در میکروتیوب‌های ۰/۲ میکرولیتری ریخته شدند. در نهایت بعد از ریختن آب مقطر و پیپتینگ مختصر، میکروتیوب‌ها سریعاً به دستگاه منتقل شدند تا واکنش تکثیر انجام شود.

در پایان محصولات PCR به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد تا جهت انتقال بر روی ژل آگارز ۲٪ به منظور مشاهده‌ی باندهای مورد نظر استفاده شود.

الکتروفورز

برای انتقال محصولات PCR به ژل آنها را به نسبت ۵ به ۱ از نمونه و لودینگ بافر مخلوط می‌نماییم لودینگ بافر در داخل رشته‌های DNA جایگزین می‌شود و با نور UV رنگ فلورسنت قابل تشخیص خواهد بود، حال آن‌ها را به چاهک‌هایی که در درون ژل تعبیه شده‌اند با دقت انتقال می‌دهیم. به چند دلیل از بافر راهنما استفاده می‌شود: ترکیب بافرهای راهنما از ترکیب اصلی رنگ و یک ماده غلیظ و چسبنده مثل گلیسرول یا سوکروز غلیظ تشکیل شده است، ویسکوزیته نمونه با استفاده از این بافرها افزایش می‌یابد و انتقال نمونه به داخل چاهک آسان می‌شود. با ایجاد رنگ در نمونه انتقال آن با اطمینان بیشتری انجام می‌گردد. رنگ‌های

مورد استفاده در بافر راهنما خود نیز باردار شده و همراه DNA به سمت آند حرکت می نمایند بنابر این میزان حرکت DNA قابل پیش بینی می شود.

سرعت حرکت DNA نسبت مستقیم با ولتاژ مورد استفاده دارد که البته این نسبت خطی نیست. ژل ها معمولاً در میدان الکتریکی $4-10 \text{ V/cm}^2$ الکتروفورز می شوند. در اینجا منظور از سانتی متر فاصله میان دو الکتروود ژل است.

با استفاده از مارکر استاندارد، اندازه مورد نظر محصول PCR، قابل بررسی و ارزیابی است. پس از پایان الکتروفورز می توان ژل را در ژل داک قرار داد و به کمک نور UV رنگ فلورسنت در محلی که باندهای DNA قرار دارند آنها را تشخیص داد.

۳-۵: آنالیز آماری

به منظور تفسیر نتایج به دست آمده از تحقیقات آزمایشگاهی، پارامترهای کمی (عددی) مورد نیاز است. در این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS آزمون های آماری Chi-Square (χ^2) و در صورت نیاز آزمون Odd Ratio (OR) انجام گرفت و همچنین پارامترهایی مانند P-value و CI Confidence Interval نیز تعیین می شود، که در بخش بعدی در مورد هر یک از پارامترهای فوق توضیحاتی داده شده است.

آزمون Chi-Square: از این آزمون آماری به منظور بررسی مورد تایید بودن نتایج مشاهده شده استفاده می شود. در واقع نتایج این آزمون نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف در نسبت فاکتور خطر مورد نظر بین گروه های مورد مطالعه می باشد.

P-value: این پارامتر معنی دار بودن یا نبودن نتایج را از نظر آماری نشان می دهد. در واقع P-value میزان خطایی است که مرتکب می شویم. در صورتی که میزان $P \leq 0.05$ باشد، نتایج به دست آمده معنی دار خواهند بود.

آزمون Odd Ratio: این آزمون که به طور گسترده در مطالعات اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرد، میزان تأثیر یک فاکتور خطر احتمالی در بروز یک بیماری خاص را نشان می دهد. اما برای تفسیر OR بدست آمده از آزمون، نیاز به محاسبه پارامتر CI یا فاصله ی اطمینان است که مقدار این پارامتر به صورت یک بازه

عددی نمایش داده می‌شود. تنها هنگامی که میزان OR بزرگ‌تر از یک باشد و حداقل بازه‌ی CI هم یک باشد، می‌توان فاکتور خطر پیشنهاد شده را به عنوان یک فاکتور خطر موثر در بروز بیماری در نظر گرفت.

منابع پایه‌ای پژوهش

فصل چہارم:

نتائج

مشخصات افراد شرکت کننده در مطالعه

در این تحقیق از دو گروه ، گروه اول که شامل ۵۰ فرد با بیماری آلزایمر اسپورادیک (دیپرس) از مرکز سالمندان نورسته بودند و گروه دوم شامل ۵۷ فرد سالم بودند که به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.

۴-۱: تجزیه و تحلیل آماری برای پلی مورفیسم (G/A) rs ۲۴۲۵۵۷ MAPT ژن

۴-۱-۱: مقایسه ژنوتیپ های پلی مورفیسم (G/A) rs ۲۴۲۵۵۷ MAPT ژن در دو

گروه بیمار و سالم

همانگونه که در جدول پایین مشاهده می شود ژنوتیپ های مربوط به پلی مورفیسم (G/A) rs ۲۴۲۵۵۷۲۴ در ۵۰ نفر فرد بیمار و ۵۷ نفر فرد سالم، با یکدیگر مقایسه شدند. با توجه به وجود دو آلل برای این ژن ، سه ژنوتیپ وجود داشت که فراوانی ژنوتیپ نوع نرمال، هتروزیگوت و موتانت (GG, AG, AA)، در گروه بیماران و شاهد به ترتیب (۱۶،۳۲،۲) و (۱، ۲۴، ۳۲) می باشد. (در این مقایسه P-Value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد).

جدول ۴-۱-۱: بررسی توزیع ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و کنترل

گروه تحت مطالعه						
ژنوتیپ	بیمار	کنترل	کل	OR	95% CI	P-Value
AA	۱۶ (۳۲٪)	۳۲ (۵۶٪)	۴۸	رفرانس		
AG	۳۲ (۶۴٪)	۲۴ (۴۲٪)	۵۶	۲/۶۶۷	۱/۱۹۸-۵/۹۳۶	۰/۰۱۵۱
GG	۲ (۴٪)	۱ (۱٪)	۳	۴	۰/۳۳-۴۷/۴۹۵	۰/۲۴۱
	۵۰	۵۷	۱۰۷			

مقایسه فراوانی ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و سالم نیز نشان می دهد که ارتباط ژنوتیپ هتروزیگوت (AG)، در جمعیت بیماران و سالم معنادار بوده و دارای نقش ریسک فاکتوری می باشد (P-Value ۰/۰۱).
ژنوتیپ هموزیگوت موتانت (GG) به خاطر اینکه حجم نمونه بسیار کم است، ارتباط معناداری در دو گروه بیمار و سالم نشان نمی دهد.

۴-۱-۲: مقایسه آلل های پلی مورفیسم (rs ۲۴۲۵۵۷ G/A) ژن MAPT در دو گروه

بیمار و سالم

همانگونه که در جدول پایین مشاهده می شود آلل های مربوط به پلی مورفیسم (G/A) rs۲۵۵۷۲۴ در

۵۰ نفر فرد بیمار و ۵۷ نفر فرد سالم، با یکدیگر مقایسه شدند و در این مقایسه P-Value کمتر از ۰/۰۵

معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۴-۱-۲: بررسی همسانی توزیع آلل ها در دو گروه بیمار و سالم

آلل	گروه تحت مطالعه		کل	OR	95% CI	P-Value
	بیمار	کنترل				
A	۶۴ (٪۶۴)	۸۸ (٪۷۷/۲)	۱۵۲	رفرانس		
G	۳۶ (٪۳۶)	۲۶ (٪۲۲/۸)	۶۲	۱/۹۰۴	۳-۱/۰۴۶/۴۶۴	۰/۰۳۳۷
	۱۰۰	۱۱۴	۲۱۴			

همانگونه که مشاهده می شود این مقایسه معنی دار بوده و آلل G می تواند به عنوان یک ریسک فاکتور برای بیماری آلزایمر اسپورادیک عمل کند. از مقدار OR چنین نتیجه گرفته می شود که افراد دارای این آلل در مقایسه با افرادی که این آلل را ندارند ۱/۹۰ برابر بیشتر به بیماری آلزایمر مبتلا می شوند.

۴-۲: تجزیه و تحلیل آماری برای پلی مورفیسم ژن APOE در دو گروه بیمار و سالم

۴-۲-۱: مقایسه ژنوتیپ های پلی مورفیسم (rs ۴۲۹۳۵۸) و (rs۷۴۱۲) ژن APOE

در دو افراد APOE ε۲ و APOE ε۴ بیمار و سالم

همانگونه که در جدول پایین مشاهده می شود ژنوتیپ های مربوط به پلی مورفیسم (rs ۴۲۹۳۵۸) و (rs۷۴۱۲)

در ۵۰ نفر فرد بیمار و ۵۷ نفر فرد سالم، با یکدیگر مقایسه شدند. با توجه به وجود دو آلل برای این ژن، سه

ژنوتیپ وجود داشت که فراوانی ژنوتیپ نوع نرمال، هتروزیگوت و موتانت (ε۲/ε۲، ε۲/ε۴، ε۴/ε۴) در

گروه بیماران و شاهد به ترتیب (۵،۵،۳) و (۱۱، ۱،۱۴) می باشد . (در این مقایسه P-Value کمتر از ۵/۰ معنادار در نظر گرفته شد).

جدول ۴-۲-۱: بررسی توزیع ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ	گروه تحت مطالعه		کل	OR	95% CI	P-Value
	بیمار	کنترل				
ε۲/ε۲	۳(۰.۲۳/۰.۷)	۱۱(۰.۴۲/۳)	۱۴	رفرانس		
ε۲/ε۴	۵(۰.۳۸/۴)	۱۴(۰.۵۳/۸)	۱۹	۱/۳۱۰	۰/۲۵۵-۶/۷۱۵	۰/۷۴۶
ε۴/ε۴	۵(۰.۳۸/۴)	۱(۰.۳/۸)	۶	۱۸/۳۳۳	۱/۵۰۸-۲۲۲/۸۷	۰/۰۰۹
	۱۳	۲۶	۳۹			

مقایسه فراوانی ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و سالم نیز نشان می دهد که ارتباط ژنوتیپ هموزیگوت موتان (ε۴/ε۴)

در دو گروه بیمار و سالم معنادار بوده و دارای نقش ریسک فاکتوری می باشد(P-Value ۰/۰۰۹). ژنوتیپ هتروزیگوت(ε۲/ε۴) به خاطر اینکه حجم نمونه بسیار کم است، ارتباط معناداری در دو گروه بیمار و سالم نشان نمی دهد.

۴-۲-۲: مقایسه آلل های پلی مورفیسم ژن APOE در دو گروه بیمار و سالم

همانگونه که در جدول پایین مشاهده می شود آلل های مربوط به پلی مورفیسم ژن APOE در ۵۰ نفر فرد بیمار و ۵۷ نفر فرد سالم ، با یکدیگر مقایسه شدند و در این مقایسه P-Value کمتر از ۵/۰ معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۴-۲-۲: بررسی همسانی توزیع آلل ها در دو گروه بیمار و سالم

آلل			کل	OR	95% CI	P-Value
	بیمار	کنترل				
ε2	۱۱(۰.۴۲/۳)	۳۶(۰.۶۹/۲)	۴۷	رفرانس		
ε4	۱۵(۰.۵۷/۷)	۱۵(۰.۲۸/۸)	۳۰	۳/۰۶۸	۱/۱۵۶-۸/۱۴۰	۰/۰۲۱
	۲۶	۵۱	۷۷			

همانگونه که مشاهده می‌شود این مقایسه معنی دار بوده و آلل $\epsilon 4$ می‌تواند به عنوان یک ریسک فاکتور برای بیماری آلزایمر اسپورادیک عمل کند. از مقدار OR چنین نتیجه گرفته می‌شود که افراد دارای این آلل در مقایسه با افرادی که این آلل را ندارند $3/068$ برابر بیشتر به بیماری آلزایمر اسپورادیک مبتلا می‌شوند.

۳-۴) بررسی اثر متقابل ژنوتیپ های پلی مورفیسم (rs 242557 G/A) MAPT ژن MAPT

با ژنوتیپ های ژن APOE

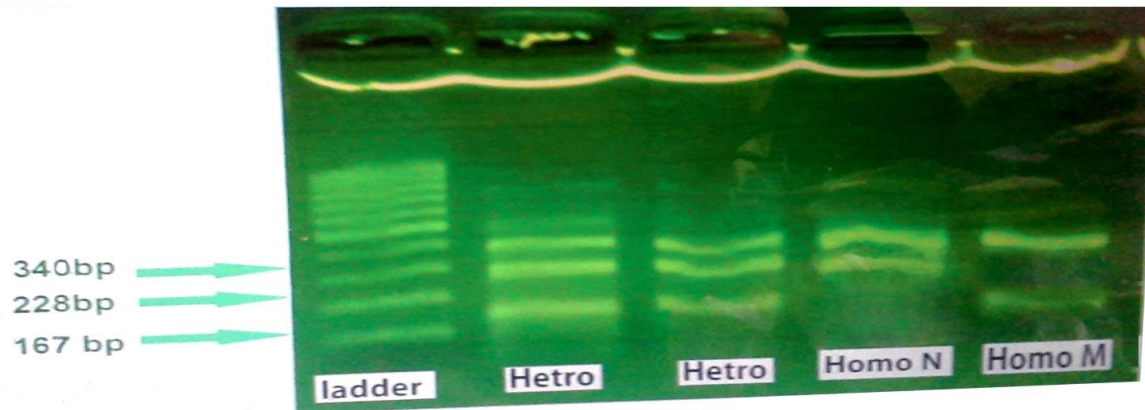
آنالیز بررسی اثر متقابل ژنوتیپ‌های دو ژن نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های ژن APOE اثر متقابل (اندرکنش) با ژن MAPT ندارد، به عبارت دیگر Pvalue به دست آمده در این آزمون غیر معنی‌دار می‌باشد ($Pvalue \leq 0/4$). به طوری که افرادی که دارای ژنوتیپ ($\epsilon 2/\epsilon 4$) می‌باشد و در عین حال دارای ژنوتیپ (AG)، بودند شانس ابتلا به آلزایمر در آنها نسبت به افرادی که دارای ژنوتیپ همونرمال (AA) بودند، ۳ برابر بیشتر بودند هر چند که عدد به دست آمده مربوط به نمونه مورد بررسی بوده و قابل تعمیم به جامعه نمی‌باشد.

در افرادی که ژنوتیپ ($\epsilon 2/\epsilon 4$) و ژنوتیپ (AG) بوده‌اند، ۱۰ برابر شانس ابتلا به آلزایمر بیشتر بوده است.

۴-۴: نتایج حاصل از PCR قطعات مورد نظر در ژن های MAPT و APOE

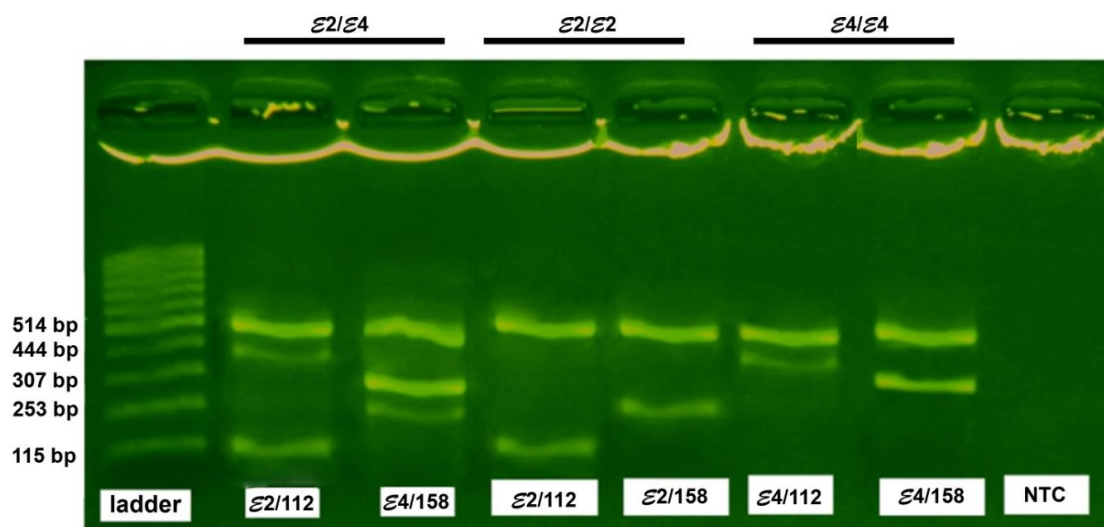
پس از انجام واکنش PCR برای تایید محصول واکنش روی ژل آگارز ۲٪ برده شد و طول قطعات با طراحی پرایمرهای مورد نظر مورد بررسی قرار گرفتند. در تکنیک Tetra Arms PCR، ۳ قطعه DNA مورد انتظار است. که در شکل‌های زیر شان داده شده‌اند. این شکل‌ها موید آن است که پس از اپتیمایز کردن شرایط PCR، کلیه قطعات مورد نظر بدون هر گونه قطعه اضافی تکثیر شده‌اند و برای تایید طول قطعات با داده‌های پایگاه NCBI مقایسه شدند.

Electrophoresis pattern of MAPT G/A (rs242557)



شکل ۴-۴-۱: محصول PCR مربوط به ژن MAPT، همانگونه که مشاهده می شود، طول قطعه‌ی کنترل، موتانت و نرمال به ترتیب ۳۴۰، ۱۶۷، ۲۲۸ نو کلو تید می باشند.

Electrophoresis pattern of APE



شکل ۴-۴-۲: محصول PCR مربوط به ژن APOE در دو جایگاه (لوکوس) ۱۱۲ و ۱۵۸.

همانگونه که مشاهده می شود، طول قطعه‌ی کنترل (۵۱۴ bp)، دو باند مشخص موتانت (۴۴۴ bp و ۳۰۷ bp) و دو باند مشخص نرمال (۱۱۵ bp و ۲۵۳ bp) می باشد.

فصل پنجم

بحث و پیشنهادات

۵-۱) بحث

بیماری آلزایمر شایع ترین علت زوال عقل در دوران میانسالی و پیری است که با نقص در فعالیت‌های شناختی، از دست دادن حافظه، از دست دادن توانایی انجام حرکات هدفدار و تغییرات شخصیتی همراه است (۲۱). این بیماری از نظر ژنتیکی هتروژن بوده و تحت تاثیر محیط و ژنتیک است که شیوع آن از حدود ۳٪ در میان افراد ۶۵ ساله تا حدود ۵۰٪ در میان افراد ۸۵ ساله تغییر می‌کند و این بیماری در لیست ده بیماری کشنده، در کشور های در حال توسعه جای دارد (۳۸). بیماری آلزایمر با شروع دیررس (شروع در سنین بالای ۶۵ سال)، ۹۷٪ از موارد بیماری را شامل می‌شود، در حالی که آلزایمر زودرس تنها ۳٪ از این جمعیت را شامل می‌شود. در حال حاضر تخمین زده می‌شود که حدود ۲۴/۳ میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به دمانس می‌باشند و هر سال ۴/۶ میلیون مورد جدید اضافه می‌شود. تعداد افراد مبتلا به دمانس هر ۲۰ سال دو برابر شده و در سال ۲۰۴۰ به ۸۱ میلیون نفر می‌رسد (۱۲).

ژن MAPT یکی از ژن‌های تازه شناخته شده است که بر روی کروموزوم شماره ۱۷ در موقعیت ۲۱ q قرار دارد و پروتئین کد شده توسط این ژن، دارای نقش حیاتی در سطح سلولی می‌باشد. نقش عمده فیزیولوژیکی این پروتئین، پیشبرد پایداری و تجمع شبکه میکروتوبولی می‌باشد که این شبکه میکروتوبولی در انتقالات آکسونی^۱ در نورون‌ها دارای اهمیت می‌باشد (۱۷، ۱۸). از آنجا که یکی از شاخص‌های بیماری آلزایمر گره‌های نوروفیبریلاری درون سلولی (متشکل از فیلامنت‌های شدیداً فسفریله تائو) می‌باشد و با توجه به اینکه ژن MAPT کدکننده پروتئین تائو است بنابراین رابطه بین بیماری آلزایمر و تشکیل گره‌های نوروفیبریلاری انکار ناپذیر است، بنابراین پلی مورفیسم شایع rs۲۴۲۵۵۷ (G/A) ژن MAPT می‌تواند با ریسک ابتلا به بیماری آلزایمر ارتباط داشته باشد. و ژن آپولیپو پروتئین واقع بر روی کروموزوم ۱۹ می‌باشد

^۱ -Axonal transport

^۲ -Apolipoprotein E

(۱۴، ۱۳ و ۱۵). آپولیپو پروتئین E(APOE)، لیپوپروتئین اصلی در مغز است که در نقل و انتقال لیپیدها و به ویژه کلسترول دخیل می‌باشد. ژن کد کننده پروتئین(APOE) سه آلل دارد همچنین توارث آلل (APOEε۴) قویترین فاکتور خطر برای بیماری آلزایمر تک‌گیر می‌باشد (۱۶). با توجه به این یافته‌ها و عدم وجود مطالعه خاصی در این مورد در ارتباط با جمعیت آلزایمری در جمعیت ایرانی هدف اصلی این پژوهش پاسخ به این سوال است که آیا بین فراوانی پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه در ژن MAPT (Microtubule-associated protein tau) و ژن APOE در جامعه بیماران آلزایمری و جامعه کنترل (افراد سالم) در جمعیت ایرانی تفاوت معناداری وجود دارد، به گونه‌ای که بتوان آن را به عنوان یک فاکتور خطر ابتلا به آلزایمر در جمعیت ایرانی محسوب کرد؟

۲-۵) نتیجه گیری

در بررسی حاضر ۵۰ نفر فرد بیمار و ۵۷ نفر فرد سالم برای بیماری آلزایمر اسپورادیک مورد مطالعه قرار گرفتند و نتایج زیر به دست آمد :

۱-۲-۵) نتایج پلی مورفیسم rs242557(G/A) مربوط به ژن MAPT

مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها ، در دو گروه بیمار و سالم نشان می‌دهد که ارتباط ژنوتیپ هتروزیگوت (AG) (در جمعیت بیماران و سالم معنادار بوده (P-Value ۰/۰۱) و بنا براین ژنوتیپ AG در این جمعیت دارای نقش ریسک فاکتوری برای بیماری آلزایمر است و در بررسی توزیع آلل‌ها ، فراوانی آلل G در دو گروه بیمار و سالم دارای تفاوت معنی‌داری بوده (P-Value ۰/۰۳). بنا براین آلل G می‌تواند به عنوان یک ریسک فاکتور برای بیماری آلزایمر اسپورادیک عمل کند.

نتایج مطالعه حاضر در مورد ژن MAPT با تعدادی از مطالعات صورت گرفته در سایر جمعیت‌ها همخوانی داشته است. در مطالعه‌ای که در سال (۲۰۰۳) صورت گرفته بود نشان داده است که ژن MAPT با بیماری آلزایمر ارتباط معناداری دارد و باید به عنوان یک ژن کاندید برای بیماری آلزایمر اسپورادیک در نظر گرفته شود. در مطالعه دیگری که در سال (۲۰۰۵) صورت گرفته بود نشان داده که هاپلوتایپ H1c از ژن MAPT

با ریسک ابتلا به بیماری آلزایمر دیررس ارتباط معناداری دارد. این مطالعه بر روی ۳۶۰ نمونه بیمار با سن بالای ۶۵ سال و ۲۵۲ نفر به عنوان گروه کنترل انجام شده است.

در مطالعه دیگری که در سال (۲۰۰۸) صورت گرفته بود نشان داده است که جهش در ناحیه آلل G/A (rs242557) باعث افزایش بیان ژن MAPT و ساختار غیرطبیعی آن می‌شوند. در نتیجه به جای میکروتو بولها به میکروفیلامنت ها متصل می‌گردد و این موجب بیماری آلزایمر می‌شود. در مطالعه دیگری که در سال (۲۰۱۳) صورت گرفته بود ارتباط پلی مورفیسم (rs242557) در ژن MAPT با بیماری آلزایمر دیررس بررسی شده است و ارتباط معناداری بین این پلی مورفیسم و بیماری آلزایمر وجود داشته و به عنوان یک ریسک فاکتور برای بیماری آلزایمر شناخته شده است (Pvalue). جدیدترین مطالعه در زمینه ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری آلزایمر، در سال (۲۰۱۴) صورت گرفته است و در آن حجم نمونه‌ای به تعداد ۱۴۱ نفر بیمار و ۱۷۹ نفر کنترل (شاهد) شرکت کننده مورد بررسی قرار گرفتند و پس از انجام آنالیزهای آماری لازم ارتباط معنادار این پلی مورفیسم با بیماری آلزایمر دیررس شناخته شد (Pvalue= ۰/۰۲).

این نتایج با نتیجه به دست آمده در مطالعه حاضر در جمعیت ایرانی همخوانی داشته، ولی در جمعیت ایرانی به خاطر محدود بودن حجم نمونه نتایج نزدیک به معنادار بودند و احتمالاً در صورت موجود بودن نمونه‌های بیشتر این نتایج بیشتر همخوانی پیدا می‌کردند.

۲-۵) نتایج پلی مورفیسم (rs ۴۲۹۳۵۸) و (rs۷۴۱۲) مربوط به ژن APOE

مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و سالم نشان می‌دهد که ارتباط ژنوتیپ ۴۴/۴۴ در جمعیت بیماران و سالم معنادار بوده (P-Value ≤ ۰/۰۰۹). و بنا براین ژنوتیپ ۴۴/۴۴ در این جمعیت دارای نقش ریسک فاکتوری برای بیماری آلزایمر است و در بررسی توزیع آلل‌ها، فراوانی آلل ۴۴ در دو گروه بیمار و سالم دارای تفاوت معنی‌داری بوده (P-Value ≤ ۰/۰۲). بنا براین آلل ۴۴ می‌تواند به عنوان یک ریسک فاکتور برای بیماری آلزایمر اسپورادیک عمل کند.

نتایج مطالعه حاضر در مورد ژن APOE با تعدادی از مطالعات صورت گرفته در سایر جمعیت‌ها همخوانی داشته است و با برخی مطالعات دیگر در تضاد می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال (۲۰۰۰) صورت گرفته بود

نشان داده است که مطالعات هیستوشیمی، حضور پروتئین APOE را در رسوبات بتا آمیلوئیدی و بافت مغز افراد بیمار نشان داده بود به طوریکه افراد حامل آلل ε4 نسبت به افراد غیر حامل، دارای پلاک‌های آمیلوئیدی بیشتری بودند اما در مطالعه ای دیگر که در سال (۲۰۰۰) در آمریکا صورت گرفته بود نشان داده بود که وجود آلل ε4 برای ابتلا به بیماری آلزایمر کافی و لازم نیست به طوری که بیش از یک سوم از افراد مبتلا، فاقد حتی یک آلل ε4 هستند و خطر این عامل در جمعیت‌های مختلف، متفاوت است و حتی در برخی جوامع فراوانی این آلل در بین بیماران آلزایمری کمتر از افراد سالم گزارش شده است.

مطالعات مشابه در جمعیت ایرانی نتایج فوق را تأیید می‌کند به طور مثال: در مطالعه ای در سال (۲۰۱۰)

(

صورت گرفته در میان جمعیت ایرانی، تعداد ۱۵۴ بیمار آلزایمری اسپورادیک و ۱۶۲ فرد کنترل (شاهد) مورد بررسی قرار گرفته است که حاکی از ارتباط معنادار آلل ε4 با بیماری آلزایمر دیررس است ($Pvalue \leq 0.001$). این نتایج نیز با نتیجه به دست آمده در مطالعه حاضر در جمعیت ایرانی همخوانی داشته، ولی در جمعیت ایرانی به خاطر محدود بودن حجم نمونه نتایج نزدیک به معنادار بودند و احتمالاً در صورت موجود بودن نمونه‌های بیشتر این نتایج بیشتر همخوانی پیدا می‌کردند.

و در نتیجه بررسی اثر متقابل ژنوتیپ‌های دو ژن نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های ژن APOE اثر متقابل (اندرکنش) با ژن MAPT ندارد، به عبارت دیگر $Pvalue$ به دست آمده در این آزمون غیر معنی دار می‌باشد ($Pvalue \leq 0.04$).

۳-۵) پیشنهادات

برای حصول اطمینان و رسیدن به نتایج قابل تعمیم به همه جمعیت ایرانی پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بعدی با تعداد افراد بیشتری برای این پلی مورفیسم انجام شود.

منابع

REFERENCE:

1. 300 thousand people suffered from Alzheimer's disease in Iran [online] 2007 [cited 2007 June 18]; Available from: www.salamatnews.com.
2. Avella AMB. Chasing genes in Alzheimer's and Parkinson's disease Rotterdam. The Netherlands: Erasmus MC.2004.
3. Avila J, Cuadros R, J. Lucas J, Hern'andez F. GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in diffrent tau isoforms. *Neurobiol Aging* 2003; 1087- 1094.
4. Berr C, Hauw JJ, Delaere P, Duyckaerts C, Amouyel P. Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta- peptide A-beta in cases with or without Alzheimer's disease *Neuroscience Letters*. 1994 40; 174: 221-4
5. Bertram L, Tanzi RE. Alzheimer's disease: one disorder, too many genes ,*Hum Mol Genet* 2004, 29; 13(1) : R135-R41
6. Brandi. R, Hundelt.M, ShahaniN. Tau alteration and neuronal degeneration in taupathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta* 2005 ; 1739 : 331-354.
7. Brandt R, Hundelt M, Shahani N. Tau alteration and neuronal degeneration in taupathies: mechanisms and models. *Bichim Biophys Acta* 2004; 1739- (2-3) : 331-54.
8. Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. *Neurodegenerative Disease :An Overview of Environmental Risk Factors*. *Environmental Health Perspective*. 2005 , 25 :113(9):1250-6
9. Butterfield AD, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modification in pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Rad Biol Med* 2007; 43 (5): 658-77.
10. Caffery TC, Joachim C, Wade-Martns R. Haplotype-specific expression of the N-terminal exos 2 and 3 at the human MAPT locus. *Neurobiol Aging* 2007 ; 29: 193-1929.
11. Chauhan NB, Membrane dynamics, Cholestrol homeostasis, and Alzheimer's disease *Journal of Lipid Research* , 2003 6; 44:2019-29
- Conrad C, Vianna C, Freeman M, Davies P. A polymorphic gene nested within an intron of .¹² the tau gene :implications for Alzheimers disease. *Proc. Nat. Acad. Sci* 2002 ; 99: 7751
- 13.D. Schellenberg G, D'Souza I. Regulation of tau isoform expression and demention. *Biochim Biophys Acta* 2005 104-115.
14. Dermaut B, Kumar-Singh S, Rademakers R, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Tau is central in the genetic Alzheimer-frontotemporal dementia pectrum. *Trends Genet* 2005 Vol.21 , NO.12.

15. E Gozalpour, K Kamali, K Mohammadi, HR Khorram Khorshid, M Ohadi, M Karimloo, A Mirabzadeh, and A Fotouhi. Association between Alzheimer's Disease and Apolipoprotein E Polymorphisms. *Iran J Public Health*. 2010; 39(2): 1–6.
16. Ezquerra M, Campdelacreu J, Munoz E, Oliva R, Tolosa E. Sequence analysis of tau 3' untranslated region and tau gene in sporadic progressive supranuclear palsy. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75 (1): 155- 57.
17. Ezquerra M, Gaig C, Ascaso C, Munoz E, Tolosa E. Tau and tau gene 2007; 1145: 168-76.
18. Ezquerra M, Pastor P, Valldeoriola F, Lui S, Molinuevo J, Blesa R, Tolosa E, Oliva R. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the tau gene highly associated to progressive supranuclear palsy in humans. *Neurosci Lett* 1999, 275: 183-186 .
19. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, et al. Simvastatin Strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta amyloid peptides A beta 42 and A beta 40 in vitro and in vivo. *PNAS*. 2001 98; 98: 5856-61
20. Fidani L, Kalineri K, Bostantjopoulou S. From 1997 to 2007 : A decade journey through the H1 haplotype on 17 q21 chromosome. *Parkinsonism and Related Disorders* 2009; 15 : 2-5.
21. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 2005 ,23;115(5):1121-9.
22. Giotz J, Lottner LM, David DC. Role of the protein tau in Alzheimer's disease. *Drug discovery today Disease Mechanisms* 2005 ; Vol.2, No 4.
23. Haass C. molecular biology of Alzheimer's disease: Genes and mechanisms involved in amyloid generation. Harwood acad pub 1998
24. Hanin I, Cacabelos R, Fisher A. Recent progress in Alzheimer's and Parkinson disease. Taylor and Francis group. 2005
25. Higuchi M, Trojanowski JQ, Lee VM. Pathological features in neurodegenerative disease : an overview . *Inter . Cong . Series* 2004; 1260, 69-75
26. Higuchi M, Trojanowski JQ, Lee. –Y.V.M. Pathological features in neurodegenerative diseases: an overview. *Int Cong series* 2004; 1260: 69-75.
27. Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Sliemers AJ, Harskamp FV, et al. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *The Lancet* . 1997 350; 350: 151-4
28. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, et al. Apolipoprotein E isoform- dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*. 2000 97; 97(6): 2892-7.

- 29.Hooijmans CR, Kiliaan AJ. Fatty acids, Lipid metabolism and Alzheimer pathology. *Eu J Pharmacol* 2008 ; 585: 176-96.
- 30.Hyman BT, Augustinack JC, Ingelsson M. Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005, 24; 1739:150-7.
- 31.Hyman BT, Augustinack LC, Ingelsson M. Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1739 (2-3) : 150-7.
- 32.Isbir TB, Agachan H, Yilmaz M, Aydin I, Kara E, Eker D. polipoprotein- E gene Polymorphism and lipid profiles in Alzheimer's disease . *American Journal of Alzheimer's disease and other Dementias*. 2001; 16:77-81.
- 33.J.Barraw C, H.Small D. Abeta peptide and Alzheimer's disease. Springer- Verlag London Limited 2007
- 34.Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia.*The Lancet* , 2000 ; 356: 1627-31
- 35.Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10. *PNAS*. 2001 48; 98(10): 5815-20
- 36.Kwok J.B.J, Loy C.T, Hamilton G, Lau E, Hallupp M, Williams J, Owen M.J, Broe G.A, Tang N, Lam L, Powell J.F,etal. Glycogen synthase kinase-3 and tau genes interact in Alzheimers disease. *Ann. Neurol* 2008 ;64: 446-454
- 37.Lees AJ, Wood NW, Martin ER, Morris HR, Weiler M, de Silva R, strong association of a novel Tau promoter haplotype in progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 2001; 311(3): 145-8.
- 38.Lees AJ, Wood NW, Martin ER, Morris HR, Weiler M, de Silva R.Strong association of a novel Tau promoter haplotype in progressive supranuclear palsy. *Nerurosci Lett* 2001; 5; 311(3): 145-8.
- 39.Liang Y, Lin S, P. Beyer T, Zhang Y, Wu X, Bales KR, et al. A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *J Neurochem* 2004; 88 623-34.
- 40.Liu QY, Yu JT, Miao D, Ma XY, Wang HF, Wang W, Tan L. An exploratory study on STX6, MOBP, MAPT,and ELF2AK3 and late -onset Alzheimers disease. *Neurobiol Aging* 2013 May; 34(5) : 1519 e13-7.
- 41.M. Cole G, A. Frautschy S. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. *Exp Gerontol* 2007: 10-21
- 42.M.Goate A, Mukherjee O, SK Kauwe J, Mayo K, C MorrisJ. Haplotype-based association analysis of the MAPT locus in Late Onset Alzheimer's disease. *BMC Genet* 2007.

43. Mukherjee O, Kauwe JS, Mayo K, Morris JC, Goate AM. Haplotype-based association analysis of the MAPT Locus in late Alzheimer's disease. *BMC Genet* 2007; 8:3.
44. Myers A.J, Kaleem M, Marlouwe L, Prttman A.M, Lee A.J, Fung H.C, Duckworth J, eung D, Gibson A, Morris C.M, Desilva R, Hardy J. The H1c haplotype at the MAPT locus in associated with Alzheimers disease . *Hum.Molec. Genet.*2005 ; 14: 2399-2404
45. Newman M, Musgrave FI, Lardelli M. Alzheimer's disease: Amyloidogenesis, the Presenillins and animal models. *Biochim Biophys Acta* 2007:285-297
46. Ohm TG, Kirca M, Bohl J, Scharnagl H, Gross W, Marz W. . Apolipoprotein E polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer- type neurofibrillary tangle formation . *Neuroscience*. 1995 41; 66: 583-7
47. Pericak-Vancea MA, Grubbera J, Balileyb LR, Hedgesa D, Westa S, Santoroa L, etal. Identification of Novel Genes in Late-onset Alzheimer's Disease . *Experimental Gerontology*. 2000 35;37: 1343-52
48. Puglielli, Taniz RE, K OVACS DM Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 2003; 6(4): 345-51.
49. Puglilli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease : Cholesterol connection. *Nature Neuroscience*. 2003; 6(4): 345-51
50. Puglilli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease : Cholestrol connection. *Nat Neurosci* 2003; 6(4):345-51
51. Rademakers R, Dermaut B, Peeters K, Cruts M, Heutink P, Goate A, Van Broekhoven C. Tau(MAPT) mutation arg 406 trp presenting Clinically with Alzheimers disease dose not share a common founder in western Europe. *Hum. Mutat* 2003 ; 22: 409-411 .
52. Richard F, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eu J Pharmacol* 2001, 27; 412: 1-12
53. Runz H, Rietdorf J, Tomic I, Bernard Md, Beyreuther K, Pepperkok R, etal. Inhibition of intracellular cholesterol transport alters persinillin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *Journal of Neuroscience*. 2002 47; 22: 1679-89.
54. S. Sisodia S, E. Tanzi R. Alzheimer's disease: Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology. Springer Scince Business Media, LLC 2007
55. Sadigh-Eteghad S¹, Talebi M, Farhoudi M . Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer's disease. A meta-analysis. *Neurosciences (Riyadh)*. 2012 Oct;17(4):321-6

56. Salminen A, Suuronen T, Kaarniranta K. ROCK, PAK, and Toll of synapses in Alzheimer's disease . *Biochem Biophys Res Communications*. 2008: 587-590
57. Sassi C, Guerreiro R, Gibbs R, Ding J, Lupton MK, Troakes C, Al-Sarraj S, Niblock M, Gallo JM, Adnan J, Killick R, Brown KS, Medway C, Lord J, Turton J, Bras J; Alzheimer's Research UK Consortium, Morgan K. . Investigating the role of rare coding variability in Mendelian dementia genes (APP, PSEN1, PSEN2, GRN, MAPT, and PRNP) in late-onset Alzheimer's disease.(2014)
58. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid beta- peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in Late-onset Alzheimer's disease .*PNAS*. 1993 45; 90: 9649-53
59. Schweitzer K, Decker E, Zhu L, et al. Aberrantly regulated proteins in frontotemporal dementia. *Biochem Biophys Res Communications* 2006;348: 465-472.
60. Scott WK, Saunders AM, Gaskell PC, Locke PA, Grouwdon JH, Farrer LA, et al. Apolipoprotein E ϵ 2 does not increase risk of early-onset sporadic Alzheimer's disease . *Annual Neurology*. 1997 36; 42: 376-6
61. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease : Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews* 2001 , 28;81 : 741-66
62. Sergrat N, Delacourte A, Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005 ; 1739 : 179-197.
63. Seripa D, Panza F, Franceschi M, D'Onofrio G, Solfrizzi V, Dallapiccola B, et al. No-apolipoprotein E and apolipoprotein E genetics of sporadic Alzheimer's disease. *Aging Res Rev* 2009.
64. Serjeant N, Delacourte A, Buee L. Tau protein as a a differential biomarker of taupathies. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1739: 179-87.
65. Shibata N, Kawarai T, Lee JH, Lee H-S, Shibata E, Sato C, et al. Association studies of cholesterol metabolism genes (CH25H, ABCA1 and CH24 H) in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2006;391:142-6.
66. Smith JD. Apolipoprotein e4 : an allele associated with many diseases. *Annual Medicine* . 2000 : 32: 118-27
67. St George- Hyslop PH, Petit A. Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *Compt Rend Biol* 2004; 328: 119-30.

- 68.Sundar pd, Feingold E, Minster RL, Dekosky ST , Kamboh MI. Gender-specific association of ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2007 ; 28 (6) :856-62.
- 69.Sundar PD, Feingold E, Minster RL, DeKosky ST, Kamboh MI. Gender- specific association of A TP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobio1 Aging* 2007; 28: 856-62.
- 70.Takeda M, Tanaka T, Cacabelos R. Molecular neurobiology of Alzheimer's disease and related disorders. *KARGER* 2004
- 71.Tanzi RE, Bertram L.New Frontiers in Alzheimer's Disease Genetics.*Neuron* 2001 , 26 ; 32(25) : 181-4
- 72.Tolosa E, Ezquerra M, Gaig C, Ascaso C, Munoz E. Tau and saito hin gene expression pattern in progressive supranuclear palsy. *Brain Res* 2007: 168-176.
- 73.V.W. Johnson g, H. Sroothoff W. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 2005 280-29 7.
- 74.Vaisiraygani A, Rahimi z, Kharazi H, Tavalani H, Pourmotabbed T. Association between apolipoprotein E polymorphism and serum lipid and apolipoprotein levels with Alzheimer's disease .*Neuroscience Letters* 2006 ; 408 : 68-72
- 75.VaisiRaygani A, Zahraia M, VaisiRaygani A, Doostia M, Javadic E, Rezaeid M, etal.Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease in Tehran, Iran. *Neuroscience Letters* . 2005 58(N) ; 375 : 1-6
- 76.Wang F , Jia J. Polymorphisms of cholesterol metabolism genes CYP46 and ABCA1 and the risk of sporadic Alzeimwr's disease in Chinese *Brain Res* 2007; 1147: 348.
- 77.Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobio* 2008: 148-175.
- 78.Wang.J.Z, Liu.F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog neurobiol* 2008; 85 148- 175.
- 79.Wolozin B , Kellman w, Ruosseau P, Celesia GG, Siegle G. Decreased prevalence of Alzheimer's disease associated with 3- hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Archive of Neurology*. 2000; 57: 1439- 43
- 80.Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2008.
- 81.Zivkovis D, Boonen R, van Tijn P. Wnt signaling in Alzheimer' disease :Up or down, that is the question. *Aging Res Rev* 2009.

82.Zuo J, Van Dyck CH, Luo X, Kranzler HR, Yang.BZ, Gelernter J. Variation at APOE and STH Loci and Alzheimer's disease. Behavioral and brain functions. 2006 ; 2:13.

منابع پایه پرسشنامه

Introduction:

Alzheimer's disease (AD) is a genetically heterogeneous neurodegenerative disease and Late-Onset type (LOAD) is the most common form of dementia affecting people over 65 years old. AD is a complex disease with multifactorial etiology. One of the hallmarks of Alzheimer's disease is intracellular neurofibrillary tangles (composed of highly phosphorylated tau Fylamnt Hay) sets the MAPT gene encoding tau protein is the fact that this protein is therefore directly linked to Alzheimer's disease common polymorphism rs242557 (G / A) gene MAPT and APOE ϵ 4 associated with risk for Alzheimer's disease, therefore formation of NFTs and Alzheimer disease are in near interaction with each other.

Materials and methods: in this study genotypes for (rs 242557) polymorphism in MAPT and genotypes for (rs 429358), (rs7412) in APOE, were determined by Tetra-ArmsPCR method in 50 cases and 57 controls.

Results: In MAPT (rs 242557) polymorphism, the frequency of AG genotype and A allele in AD was significantly higher than controls (64% and 36% versus 42/1% and 22/8% respectively with $P < 0/01$). In APOE (rs 429358), (rs7412) polymorphism, the frequency of ϵ 4/ ϵ 4 genotype and ϵ 4 allele in AD was significantly higher than controls (38/4% and 57/7% versus 3/8% and 28/8%% respectively with $P < 0/009$).

Conclusions: It is suggested that in MAPT (rs 242557) polymorphism in Iranian population, AG genotype and G allele are risk factors for AD. It is suggested that in APOE (rs 429358), (rs7412) polymorphism in Iranian population, ϵ 4/ ϵ 4 genotype and ϵ 4 allele are risk factors for AD.

Key Words: Alzheimer's disease – APOE – MAPT – NFT - filament

منابع پارس پر وفه