

مقاله پژوهشی

افزایش بیان ژن BIM در بیماران مبتلا به Multiple Sclerosis با روش Real Time PCR

نسترن گودرزی^۱، خدیجه عنصری^{۲*}، غلامرضا بخشی خانیکی^۳

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه پیام نور، واحد شهر ری، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

۳- دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۴/۰۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۱۱

چکیده

مقدمه و هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS)، به‌عنوان یک بیماری خودایمن سیستم اعصاب مرکزی شناخته می‌شود. یافته‌های به‌دست‌آمده حاکی از نقش سیستم ایمنی و عوامل مرتبط با تنظیم عملکرد این سیستم در بروز بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی مانند مالتیپل اسکلروزیس است. در این میان، ژن BIM به‌عنوان یکی از ژن‌های دخیل در تنظیم فعالیت‌های زیستی سلول مانند آپوپتوز، از جمله ژن‌های کاندید مرتبط با این بیماری گزارش شده است. مطالعه حاضر به بررسی ارتباط بین میزان بیان ژن BIM و خطر ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس عودکننده-فروکش‌کننده در جمعیت ایرانی پرداخته است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه شاهد-موردی، شرکت‌کنندگان شامل ۵۰ فرد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس از نوع عودکننده-فروکش‌کننده و ۱۰ فرد سالم مراجعه‌کنندگان به بیمارستان سینا تهران، در سال ۱۳۹۴ بوده‌اند. میزان بیان ژن BIM در بیماران توسط روش Real Time PCR بررسی و با گروه کنترل مقایسه گردیده است.

نتایج: نتایج به‌دست‌آمده حاکی از افزایش بیان ژن BIM در مبتلایان به مالتیپل اسکلروزیس عودکننده-فروکش‌کننده در مقایسه با افراد سالم بوده که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار بوده است ($P < 0.003$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش ژن BIM در تنظیم فعالیت‌های حیاتی سلول مانند آپوپتوز و ارتباط آن با بروز بیماری مالتیپل اسکلروزیس عودکننده-فروکش‌کننده؛ می‌توان از این ژن به‌عنوان یک مارکر مولکولی به‌منظور شناسایی افراد مستعد ابتلا به این بیماری استفاده نمود.

کلمات کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، آپوپتوز، ژن BIM

مقدمه

علائم اولیه ظهور می‌یابد، در فاز دوم سازگاری با این علائم و ظهور ناتوانی‌های جسمی صورت می‌گیرد، در فاز سوم فرد دچار ناتوانی‌های شدید می‌شود و در نهایت در فاز چهارم این بیماری منجر به کاستن علائم حیاتی فرد بیمار می‌گردد (۲). از میان چهار زیرمجموعه شناخته‌شده برای این بیماری، ۶۵ الی ۸۹ درصد از موارد مالتیپل اسکلروزیس را انواع عودکننده-فروکش‌کننده تشکیل می‌دهند که با تشنج‌های مداوم همراه است (۳). از جمله مشخصه‌های آسیب‌شناسی این بیماری می‌توان به تخریب اولیگودندروسیت‌ها و غشاء میلینی و ظهور ضایعات مجزا و متعدد به شکل پلاک در مناطق مختلف سیستم عصبی مرکزی شامل نخاع، ساقه مغز، مخچه، نیمکره‌های مغز و عصب بینایی اشاره نمود. علاوه بر این در برخی از موارد، نفوذ سلول‌های ایمنی از اندوتلیوم سد خونی-مغزی و ورود آن‌ها به

بیماری مالتیپل اسکلروزیس، یک بیماری خودایمن محسوب می‌شود که به‌وسیله دوره‌های کلینیکی عود و خاموشی شناخته می‌شود که معمولاً ۱۰ الی ۱۵ سال بعد از ظهور اولیه بروز پیدا می‌نمایند. این بیماری مناطق متعددی از سیستم اعصاب مرکزی همچون ماده سفید مغز و نخاع را هدف قرار می‌دهد که این امر در نهایت سبب ایجاد ضایعاتی بانام اسکلروز در مغز و یا نخاع می‌شود. از این‌رو از این بیماری به‌عنوان یکی از شایع‌ترین علل ناتوانی ناشی از بیماری‌های نورولوژیک نامبرده می‌شود که می‌تواند منجر به بروز اختلال در هدایت پیام عصبی، اختلال در عملکرد بیمار و به دنبال آن بروز حملات (عود) در فرد مبتلا می‌شود (۱). این بیماری مشتمل بر چهار فاز بوده که در فاز اول

* نویسنده مسئول: خدیجه عنصری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
Email: onsory@gmail.com

عملکرد تنظیمی مهم این ژن در گزینش منفی لنفوسیت B در مغز استخوان و لنفوسیت T در تیموس است. همچنین مشخص گردیده است که ژن *BIM* نقش تنظیمی خاصی در آپوپتوز لنفوسیت‌های T در طول پاسخ ایمنی دارد (۱۱).

با توجه به نقش ژن *BIM* در تنظیم فرآیندهای حیاتی سلول همچون آپوپتوز و نیز شیوع روزافزون بیماری مالتیپل اسکلروزیس، مطالعه حاضر باهدف بررسی ارتباط بین میزان بیان ژن *BIM* و خطر ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت ایرانی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه مورد-شاهدی (Case-control) حاضر متشکل از ۵۰ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس عودکننده-فروکش‌کننده و ۱۰ فرد سالم بدون سابقه ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس است که از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان سینا، تهران، سال ۱۳۹۴ انتخاب شدند. بررسی نتایج MRI توسط پزشک متخصص به‌عنوان معیار ورود شرکت‌کنندگان در هر یک از دو گروه مورد و شاهد صورت گرفت. از سوی دیگر به‌منظور حذف اثر متغیرهای مخدوش‌گر در نتایج به‌دست‌آمده، جنس شرکت‌کنندگان در هر دو گروه یکسان (خانم) و بازه سنی نیز بین ۲۰ الی ۴۰ سال در نظر گرفته شد. پس از اخذ رضایت‌نامه‌ای منطبق بر رهنمود اخلاقی از تمام شرکت‌کنندگان، مقدار ۵ میلی‌لیتر خون وریدی به فالکون حاوی EDTA ۰/۵ مولار به آزمایشگاه انتقال یافت.

استخراج RNA و تهیه cDNA

استخراج RNA از خون طبق پروتکل کیت‌های RNX-PLUS (شرکت سیناژن) انجام گرفت. به‌منظور تعیین غلظت استخراج‌شده از اسپکتوفتومتر با استفاده از دستگاه Thermo NanoDrop (Scientific) و در ادامه ۱ میکرولیتر از RNA جهت سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت (RevertAid First Thermo Scientific (Strand cDNA Synthesis Kit, USA مورد استفاده قرار گرفت. محلول نهایی واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم قرار گرفت.

Real time PCR

پس از تهیه cDNA، میزان بیان ژن *BIM* به‌عنوان ژن هدف در هر دو گروه و ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجع مورد بررسی قرار گرفت. پرایمر اختصاصی برای دو ژن *BIM* و *GAPDH* با

دستگاه عصبی مرکزی نیز مشاهده می‌شود (۴). بررسی‌های انجام‌یافته در زمینه‌ی اپیدمیولوژی این بیماری حاکی از نرخ بروز متفاوت این بیماری در جمعیت‌های گوناگون بوده، به‌طوری‌که سالانه این میزان بین ۱/۵ تا ۱۱ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر متغیر است (۵). طبق گزارش‌های انتشاریافته توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO)، ایران با نرخ شیوع ۵ تا ۷۴ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر جزء مناطق با شیوع کم، طبقه بندی شده است (۶). از سوی دیگر بر مبنای داده‌های انتشاریافته توسط انجمن MS ایران، استان اصفهان دارای بالاترین میزان شیوع (۹۳) در هر ۱۰۰ هزار نفر) در سطح کشور است (۷). با توجه به شیوع روزافزون بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت‌های گوناگون از یک‌سو و نیز تحمیل هزینه‌های سنگین بر سیستم‌های بهداشتی به‌منظور درمان افراد مبتلا، به‌منظور شناسایی هر چه دقیق‌تر عوامل مؤثر بر بروز این بیماری تاکنون تحقیقات متعددی انجام پذیرفته است. از جمله می‌توان به مطالعات همبستگی گسترده ژنوم در جمعیت‌های گوناگون اشاره نمود که باهدف شناسایی عوامل ژنتیکی مؤثر بر بروز بیمارهای گوناگون انجام می‌پذیرد. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعات منجر به شناسایی لوکوس‌های ژنی مرتبط با بیماری مالتیپل اسکلروزیس گردیده است که از جمله آن‌ها می‌توان ژن *BIM* را نام برد (۸). این ژن که بانام *BCL2L11* نیز شناخته می‌شود، بر روی کروموزوم ۲q۱۲ واقع شده و در مجموع از ۱۱ اگزون تشکیل یافته است (۹). این ژن از سه ایزوفرم مختلف تشکیل شده است که توسط جایگزینی متناوب پدید می‌آیند. پروتئین کد شده توسط این ژن بانام BCL-2 L11، به‌عنوان یکی از پروتئین‌های متعلق به خانواده پروتئین‌های BCL-2 شناخته می‌شود که در میان پستانداران دارای ۱۹ عضو است (۱۰). از سوی دیگر، پروتئین‌های این خانواده به‌عنوان پروتئین غشایی که اساساً در غشای خارجی میتوکندری قرار دارند شناخته می‌شوند. این خانواده دارای چهار موتیف حفاظت‌شده بانام‌های BH1-BH2-BH3-BH4 بوده که با توجه به فعالیت و ساختار به دودسته مهم شامل اعضاء ضد آپوپتوز و اعضاء پرو آپوپتوز طبقه‌بندی می‌شوند. در این میان BCL-2 L11 که با اسامی دیگری چون BAM, BIM, BOD نیز شناخته می‌شود، به‌صورت یک هترو یا هومودایمر و نقش تنظیمی آنتی یا پرو آپوپتیکی را در بسیاری از عملکردهای سلولی بر عهده دارد. بر این اساس، ژن *BIM* نقشی کلیدی در بروز بیماری‌های اتوایمیون و دژنره ایفا می‌کند. شواهد به‌دست‌آمده حاکی از

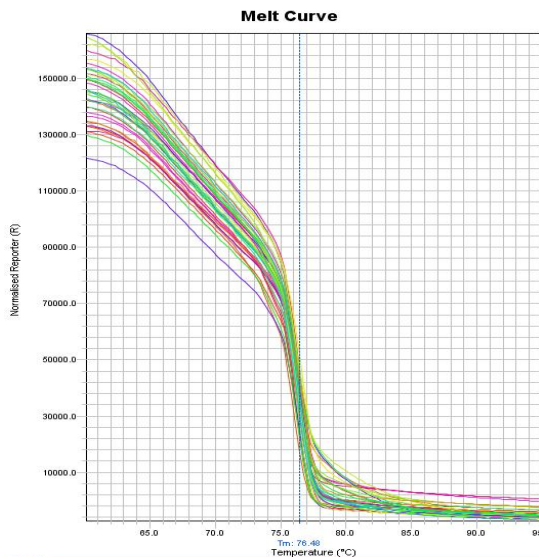
استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی شد (جدول ۱) و بیان درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام گرفت. کل واکنش در

جدول ۱- مشخصات پرایمر های طراحی شده

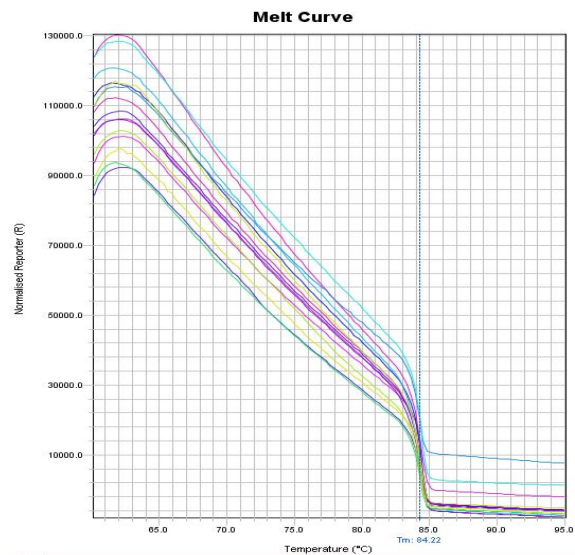
نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر (bp)	CG%	Tm (°C)	طول محصول (bp)
BIM-F	ACAAAGAAGCATATCTCGGA	۲۰	۴۰	۵۴/۳	۱۲۰
BIM-R	ACAGATGAAGTAAAAGTTGG	۲۰	۴۰	۵۴/۳	
GAPDH-F	TGGCACCCAGCACAAATGAAG	۲۰	۵۰	۵۸/۴	۹۰
GAPDH-R	GAAGTGTGACGTGGACATCC	۱۹	۵۳	۵۷/۵	

۴۵ چرخه تکرار شد. واکنش‌ها به صورت سه‌تایی به همراه یک واکنش بدون الگو برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد.

ژن توسط Real-Time PCR (ABI 7300) به روش غیراختصاصی و استفاده از SYBR Green به‌عنوان رنگ



نمودار ۲- منحنی ذوب ژن GAPDH



نمودار ۱- منحنی ذوب ژن BIM

آنالیز آماری

مقایسه میزان بیان ژن در دو گروه مورد و شاهد بر مبنای آزمون آماری t-test برای دو گروه مستقل و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۸ انجام شد که در آن مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

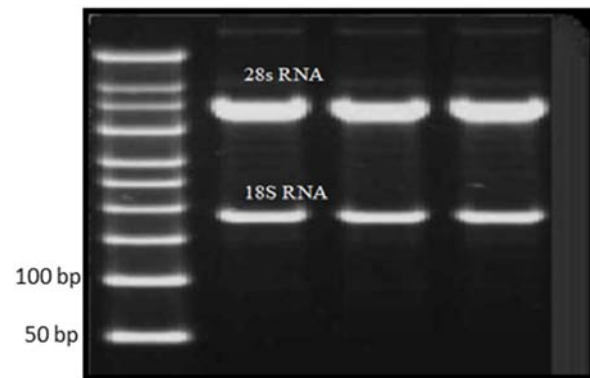
نتایج

کیفیت RNA استخراج با استفاده از اسپکتوفتومتر مورد سنجش قرار گرفت که کیفیت مطلوب RNA نشان‌دهنده عدم آلودگی RNA به DNA و پروتئین است. باین حال جهت حصول اطمینان از عدم آلودگی، الکتروفورز RNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۲٪ صورت گرفت که عدم مشاهده باندهای DNA در بالای ژل تأیید کننده کیفیت RNA بوده است (شکل ۱). میزان Ct ژن BIM در ۵۰ فرد بیمار مورد بررسی در این مرحله نشان

فلورسانت استفاده شده است. پس از انجام واکنش، داده‌های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج و اندازه‌گیری میزان بیان با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Graph pad نمودار بیان ژن رسم گردید.

تأیید اختصاصی بودن عملکرد پرایمرهای طراحی‌شده و نیز عدم آلودگی به DNA ژنومی، با بررسی پیک منحنی ذوب اختصاصی در دمای ۹۰ و ۹۱ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب برای BIM و GAPDH) انجام پذیرفت (نمودارهای ۱ و ۲). به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مذکور در هر دو گروه، محلول نهایی واکنش در حجم نهایی ۲۲ μL تهیه گردید. شرایط بهینه واکنش پس از فعال‌سازی آنزیم پلیمرز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، به ترتیب مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۶۰

به‌علاوه مجموعه آسیب اکسیداتیو و رهایی سیتوکین‌های پیش التهابی به‌نوبه خود می‌تواند منجر به آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها و تخریب بیشتر میلین شود (۱۲). مطالعات انجام‌گرفته در یک دهه گذشته حاکی از شیوع نسبتاً بالا و رو به افزایش این بیماری در منطقه خاورمیانه و ایران است. بر این اساس میزان بروز بیماری در هر صد هزار نفر از ۰/۶۸ در سال ۱۹۸۹ به ۲/۹۳ در سال ۲۰۰۸ افزایش یافته است و نرخ ابتلا در میان زنان ۱/۳ تا ۱/۴ برابر بیشتر از مردان گزارش شده است. از سوی دیگر، پاتوژنز دقیق بیماری مالتیپل اسکلروزیس همانند سایر بیماری‌های اتوایمون همچنان به‌درستی مشخص نیست، از این‌رو شناسایی عوامل مرتبط با بروز این بیماری به‌منظور شناسایی زودهنگام افراد مستعد ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس از یک‌سو و بررسی مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با آن به‌منظور دستیابی به روش‌های درمانی هرچه کارآمدتر از اهمیت فراوانی برخوردار است. شواهد به‌دست‌آمده در این زمینه حاکی از ارتباط میان کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌واسطه افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) و افزایش شانس ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس است. بر این اساس ورود آسیب اکسیداتیو به اجزاء سلولی الیگودندروسیت‌ها (شامل پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک)، سبب بروز تغییر ساختاری در این سلول‌ها می‌شود. این تغییر، منجر به فعال شدن لنفوسیت‌های T کمکی نوع ۱ (Th-1) توسط سلول‌های گلیال می‌گردد. در ادامه، سلول‌های Th-1 تکثیر یافته سبب تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی به‌ویژه TNF- α ، IFN- γ و IL-12 می‌شوند. این فرآیند در نهایت به تحریک لنفوسیت‌های نوع B و پلاسماسل‌ها جهت تولید آنتی‌بادی علیه غشاء میلینی و در نتیجه دمی‌لیناسیون منجر می‌شود (۱۳). نتایج تحقیقات حاکی از نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مهار رشد لنفوسیت‌های B در شرایط آزمایشگاهی است (۱۴). شواهد به‌دست‌آمده در این زمینه بیانگر نقش فاکتورهای محلول و یا احتمالاً ارتباط سلول-سلول در مهار رشد این سلول‌ها است. اگرچه ممکن است این اثرات از طریق واکنش متقابل بین گیرنده مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (Programmed Cell Death) و لیگاندهای آن نیز صورت پذیرد. بر این اساس یافته‌های به‌دست‌آمده به نحو قابل توجهی حاکی از مهار عملکرد سلول‌های B توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی است (۱۵). ازجمله ژن‌های شناخته‌شده در این زمینه ژن *BIM* است که تغییر در بیان آن می‌تواند نقش بسزایی در ایجاد این بیماری



شکل ۱- RNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز، (مارکر ۵۰ bp)

می‌داد که میانگین Ct در گروه مورد ۳۵/۰ است. از سوی دیگر در این گروه کمترین میزان Ct به‌دست‌آمده، ۲۶/۸ و بیشترین میزان ثبت‌شده از آن ۴۱/۳ بود. میزان Ct ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجع در گروه مورد محاسبه شد و میانگین Ct ژن مرجع در گروه مورد ۲۹/۹ است. بر این اساس، کمترین میزان محاسبه‌شده (۲۱/۳) و حداکثر میزان آن (۳۷/۳) واحد بود. میزان Ct ژن هدف که در ۱۰ فرد سالم مورد محاسبه قرار گرفت نشان داد که کمترین میزان Ct محاسبه‌شده در گروه شاهد ۲۸/۹ و بیشترین میزان آن ۳۱/۸ بود. پس از محاسبه میزان Cts ژن هدف در گروه سالم، میزان Ct ژن مرجع در این گروه محاسبه گردید. کمترین و بیشترین میزان Ct به‌دست‌آمده در گروه مورد به ترتیب عبارت بودند از ۲۲/۴ و ۲۵/۴. سپس اختلاف Cts ژن هدف نسبت به Cts ژن مرجع در گروه شاهد محاسبه گردید. پس از محاسبه اختلاف Cts ژن هدف نسبت به Cts ژن مرجع در گروه مورد و نیز برآورد اختلاف Cts ژن هدف نسبت به Cts ژن مرجع در گروه شاهد، به‌منظور محاسبه میزان افزایش و یا کاهش بیان ژن *BIM* در گروه افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در مقایسه با افراد سالم از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. یافته‌های به‌دست‌آمده حاکی از افزایش میزان بیان ژن *BIM* در گروه بیماران در مقایسه با افراد سالم بود که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار بوده است ($P < 0.03$).

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری خود ایمن بوده که به‌واسطه تخریب پیش‌رونده میلین بروز می‌نماید. این بیماری مزمن، دمی‌لینه‌کننده دستگاه عصبی مرکزی بوده که با کاهش برگشت‌ناپذیر توان عملکردی همراه است و از این‌رو به‌عنوان یک بیماری خودایمن سیستم اعصاب مرکزی شناخته می‌شود.

در موش‌های دارای نقص در عملکرد ژن *BIM* در مقایسه با موش‌های نوع *Wild* بوده است. بر این اساس، میزان mRNA رونویسی شده در مدت زمان دو ساعت پس از بروز تشنج و میزان پروتئین کد شده در بازه زمانی ۴ الی ۲۴ ساعت در موش‌های نوع *Wild* افزایش یافته است. این یافته نشان‌دهنده نقش پروتئین‌های خانواده *BCL-2*، از جمله پروتئین کد شده توسط ژن *BIM* در مرگ سلول‌های عصبی است (۱۸). از دیگر مطالعات انجام‌یافته در این زمینه می‌توان به تحقیق Aguilu و همکاران در سال ۲۰۱۴ اشاره نمود. این مطالعه به بررسی نقش باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به‌عنوان عامل اصلی ابتلا به بیماری توبرکلوزیس و بروز آپوپتوز در ماکروفاژهای عفونی‌شده و در دو سطح *in vitro* و *in vivo* صورت گرفت. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از توقف فرآیند مرگ سلولی در موش‌های *knockout* شده برای ژن‌های *Bak*، *Bax* و کاسپاز ۹ بود. از سوی دیگر شواهد به‌دست‌آمده نشان داد که توقف در عملکرد ژن‌های کد کننده پروتئین‌های *BCL-2* نیز می‌تواند به نتایج مشابه منجر شود. بر این اساس، پروتئین‌های خانواده *BCL-2*، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل القاء کننده فرآیند آپوپتوز معرفی شدند (۱۹). در آخرین تحقیقی که توسط Ramezani در سال ۲۰۱۷ صورت پذیرفت، تغییر بیان ژن *BIM* در بیماران مبتلا به لوسمی سلول‌های T در بزرگسالان مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق نشان داده شده است که بیان این ژن در بیماران به‌طور قابل‌توجهی افزایش نشان می‌دهد که با تحقیق حاضر هم‌راستا است (۲۰). همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شده است که با کاهش بیان ژن *BIM* ارتباط مستقیمی با افزایش درصد مرگ‌ومیر در بیماران مبتلا به سرطان گاستریک ($P=0.010$) وجود داشته است، از این‌رو از ژن *BIM* به‌عنوان یک بیومارکر در تشخیص به‌موقع این بیماری یاد شده است (۲۱). بر این اساس و با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات پیشین می‌توان از ژن *BIM* و پروتئین کد شده توسط آن به‌عنوان یکی از عوامل مهم در بروز آپوپتوز نام برد. تاکنون تحقیقی بر روی بیان این ژن در دیگر انواع MS صورت نگرفته است و مطالعه حاضر برای نخستین بار به بررسی ارتباط میان میزان بیان ژن *BIM* و خطر ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس از نوع عودکننده-فروکش‌کننده پرداخته است، ولی به دلیل حجم کم نمونه‌ها، مطالعات دیگری با تعداد نمونه وسیع‌تر و بررسی نقش این ژن بر روی دیگر انواع بیماری ضروری به نظر می‌رسد. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه پیش رو،

داشته باشد. نتایج یافته‌های به‌دست‌آمده از مطالعات انجام‌شده بر روی مدل‌های حیوانی حاکی از نقش این ژن به‌عنوان یک آغازگر کلیدی در بروز آپوپتوز لنفوسیت T است. بر این اساس پروتئین کد شده توسط این ژن به خانواده پروتئین‌های *BCL-2* تعلق داشته که در کنار دیگر اعضای این خانواده هترو دایمر و هومودایمرهای گوناگونی را تشکیل می‌دهند. از سوی دیگر یافته‌های به‌دست‌آمده حاکی از نقش پروتئین‌های ذکر شده در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی و از جمله آن‌ها آپوپتوز است (۱۶). با توجه به نقش سلول‌های لنفوسیت T در ایمنی سلولی از یک سو و نقش ژن *BIM* به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید در تنظیم فعالیت‌های زیستی سلول‌ها همچون آپوپتوز از سوی دیگر، می‌توان از این ژن به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید مرتبط با مالتیپل اسکلروزیس نام برد. تاکنون مطالعات محدودی به‌منظور بررسی ارتباط میان این ژن و شانس ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس انجام پذیرفته است. از جمله این مطالعات می‌توان به تحقیق انجام‌یافته توسط Biswas و همکاران در سال ۲۰۰۷ اشاره نمود. این تحقیق باهدف بررسی نقش عوامل مولکولی دخیل در فرآیند مرگ نورون‌ها و به دنبال بروز آلزایمر انجام پذیرفت. شواهد به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها حاکی از نقش پروتئین کد شده توسط ژن *BIM* به‌عنوان یک القاء کننده آپوپتوز بود. این نقش به‌واسطه برانگیخته شدن ارسال سیگنال‌های آپوپتوز به سلول‌های عصبی انجام می‌پذیرد که در نهایت مرگ نورون‌ها را به همراه دارد. از سوی دیگر یافته‌های به‌دست‌آمده نشان‌دهنده نقش β -amyloid ($A\beta$) به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین پپتیدهای مرتبط با مرگ سلولی که نقشی کلیدی در بیماری زای آلزایمر ایفا می‌کند است. بر این اساس افزایش میزان بیان ژن *BIM* به‌عنوان یک فاکتور بالینی به‌منظور شناسایی افراد مستعد ابتلا به آلزایمر و نیز به‌عنوان یک هدف بالقوه به‌منظور دستیابی به روش‌های درمانی نوین در بیماران مبتلا معرفی شده است (۱۷). در ادامه این تحقیقات و در سال ۲۰۱۰، Murphy و همکاران به بررسی نقش پروتئین‌های خانواده *BCL-2* به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین مولکول‌های القاء کننده آپوپتوز در بروز تشنج‌های طولانی‌مدت در مدل‌های حیوانی پرداختند. در این تحقیق ارتباط میان میزان بیان ژن *BIM* و مقدار آسیب ایجادشده به‌واسطه بروز تشنج در دو گروه موش‌های نوع *Wild* و موش‌های دارای نقص در عملکرد ژن *BIM* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از کاهش میزان مرگ نورون‌ها

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه مصوب در مقطع کارشناسی ارشد با تایید شورای تخصصی گروه آموزشی و پژوهشی رشته ژنتیک دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق مورخ ۱۳۹۴/۰۲/۰۲ است. بدین‌وسیله از تمام بیماران و کارکنان زحمتکش بیمارستان سینا تهران که در اجرای این پژوهش شرکت نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

حاکمی از افزایش معنی‌دار بیان ژن *BIM* در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با گروه کنترل است. از این‌رو، با توجه به نقش ژن *BIM* در مسیرهای تنظیم سیستم ایمنی بدن همچون آپوپتوز سلولی، می‌توان از این ژن به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید مرتبط با مالتیپل اسکلروزیس نام برد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق پیش‌رو و با تکیه بر نقش ژن *BIM* در تنظیم فعالیت‌های حیاتی سلول همچون آپوپتوز و ارتباط آن با بروز بیماری مالتیپل اسکلروزیس، انجام مطالعات تعقیبی در سایر اقوام ایرانی و در حجم وسیع‌تر به‌منظور دستیابی به یک جمع‌بندی مستدل امری اجتناب‌ناپذیر است.

References

1. Nasiri M, Hosseini S.H, Sakhaei S.Y, Tabrizi N, Yazdani Cherati J, Abedini M. Prevalence of Psychiatric Disorders in Patients with Multiple Sclerosis in Mazandaran, Iran. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2016;26(140): 60-70.
2. Van der Valk P, De Groot, C. Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2000;26(1):2-10.
3. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak, Z. Multiple sclerosis difficult answers to easy questions. *Neurol Neurochir Pol*. 2005;40(5):441-5.
4. Razeghi Jahromi S, Arrefhosseini SR, Ghaemi A, Alizadeh A, Moradi Tabriz H, Togha M. Alleviation of experimental allergic encephalomyelitis in C57BL/6 mice by soy daidzein. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13(4):256-64.
5. Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2004;788-94.
6. WHO/OMS, Official site for World Health Organization: <http://www.who.int/msa/mnh/ems/ratesold/sclerosi.htm> Multiple Sclerosis Resource Center, geography of Multiple Sclerosis World Distribution of Multiple Sclerosis <http://www.mscc.org.uk/index.cfm/fuseaction/show/pageid/23256>.
7. Etemadifar M, Sajjadi S, Nasr Z, Firoozeei TS, Abtahi SH, Akbari M, et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Iran: a systematic review. *Eur Neurol*. 2013;70(5-6):356-63.
8. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.
9. Bouillet P, Zhang LC, Huang DC, Webb GC, Bottema CD, Shore P. et al. Gene structure, alternative splicing,

- and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Mamm Genome*. 2001;12(2):163-8.
10. Bassnett S. On the mechanism of organelle degradation in the vertebrate lens. *Exp Eye Res*. 2009;88(2):133-9.
11. Hughes P, Bouillet P, Strasser A. Role of Bim and other Bcl-2 family members in autoimmune and diseases. *Curr Dir Autoimmun*. 2006;9:74-94.
12. Kieseier BC, Hemmer B, Hartung H-P. Multiple sclerosis—novel insights and new therapeutic strategies. *Curr Opin Neurol*. 2005;18(3):211-20.
13. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. Association among serum and cerebrospinal fluid TNF-alpha level, gene polymorphisms of TNF-alpha and multiple sclerosis in Han nationality of southern China. 2006; 23(6):677-9.
14. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
15. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1482-90.
16. Zettl U, Kuhlmann T, Brück W. Bcl-2 expressing T lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998;24(3):202-8.
17. Biswas SC, Shi Y, Vonsattel JP, Leung CL, Troy CM, Greene LA. Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for β -amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 2007;27(4):893-900.
18. Murphy BM, Engel T, Paucard A, Hatazaki S, Mouri G, Tanaka K, et al. Contrasting patterns of Bim induction and neuroprotection in Bim-deficient mice between hippocampus and neocortex after status epilepticus. *Cell Death Differ*. 2010;17(3):459-68.



19. Aguiló N, Uranga S, Marinova D, Martín C, Pardo J. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Death Dis.* 2014;5(7): e1343.
20. Ramezani S, Shirdel A, Rafatpanah H, Akbarin MM, Tarokhian H, Rahimi H, Bari A, Jahantigh HR, Rezaee SA. Assessment of HTLV-1 proviral load, LAT, BIM, c-FOS and RAD51 gene expression in adult T cell leukemia/lymphoma. *Med Microbiol Immunol.* 2017;206(4):327-35.
21. Wu N, Huang Y, Zou Z, Gimenez-Capitan A, Yu L, Hu W, et al. High BIM mRNA levels are associated with longer survival in advanced gastric cancer. *Oncol Lett.* 2017;13(3):1826-34.



Original Article

Over Expression of *BIM* Gene in Multiple Sclerosis Patients Using Real Time PCRGoodarzi N¹, Onsory KH^{2*}, Bakhshi-Khaniki GH³

1. Department of Genetics, Payame Noor University, Shahre-Rey, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Branch of Parand, Islamic Azad University, Parand, Iran

3. Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 31 Mar 2017

Accepted: 28 Jun 2017

Abstract

Background & Objectives: Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disorder of the central nervous system that results in the destruction of the myelin sheath. Recent studies indicate that the immune system and factors related to its regulation play an important role in the incidence of central nervous disease such as MS. According to the recent findings, the BIM gene plays a key role in biological activities of cell such as apoptosis. This gene is an important candidate for this disease. Therefore, the current study was carried out to investigate the association between the BIM gene expression and returnee-remitting multiple sclerosis among Iranian population.

Materials & Methods: In this case-control study, samples were collected from of patients admitted to Sina hospital in Tehran. 50 patients with returnee-remitting multiple sclerosis aged 20 to 45 years and 10 healthy individuals were admitted to Sina Hospital, Tehran in 2015. Their BIM gene expression was evaluated using Real- Time PCR and was compared with that of the control group.

Results: The results revealed that the BIM gene expression was significantly higher in patients with returnee-remitting multiple sclerosis compared to those in the control group ($P < 0.03$).

Conclusion: Gene expression decreased in MS patients compared to healthy individuals. Since the BIM gene plays a key role in the regulation of vital activity of human cells and its association with MS disease, therefore, this gene can be introduced as a biomarker for early detection of individuals susceptible to MS.

Keywords: Multiple Sclerosis, Apoptosis, *BIM* gene

*Corresponding author: Khadijeh Onsory, Department of Biology, Branch of Parand, Islamic Azad University, Parand, Iran
Email: onsory@gmail.com