Ministry of Higher Education and Scientific research

University of Babylon

College of Science for Women

Interlukin-1 Beta +3953 Gene polymorphism in sample of Iraqi Population

A search Submitted by

Rasha Ahmed Ateia and Rusul Kareem obeys and Ridaa Ali Husain

For the year 2023/20224

Subervised by

Pro. Dr. Israa Adnan ALBaghdady

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة بابل

كلية العلوم للبنات/ قسم علوم الحياة

التغاير +3953 الانترلوكين-1 بيتا في عينة من العراقيين

بحث مقدم من قبل الطالبات

رشا احمد عطية سقف و رسل كريم عبيس سلطان و رضاء علي حسين

لنيل شهادة البكلوريوس في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل

العام الدراسي2023/2024

باشراف

ا.د. اسراء عدنان ابراهيم

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَوْزُونٍ﴾

صدق الله العظيم

سورة الحجر الآية 19

التغاير +3953 الانترلوكين-1 بيتا في عينة من العراقيين

الخلاصة:

اجريت الدراسة الحالية على 75 شخص عراقي صحيح البنية وخالي من الامراض من اعمار مختلفة ولكلا الجنسين اختيروا عشوائيا كعينة سيطرة لتحديد دور التغايرات الوراثية من في جين الانترلوكين -1 بيتا لتحديد نوع التغايرات الموجودة في العراقيين وتحديد النوع السائد منها فيهم لما له من تاثير على تركيز الانترلوكين -1 في الدم ودوره المناعي المؤثر.

كلمات مفتاحية: *IL-1* ، التغاير الوراثي، الاستعداد الوراثي ، انترلوكين-1

Interlukin-1 Beta +3953 Gene polymorphism in sample of Iraqi Population

ABSTRACT:

The present study was conducted on 75 Iraqi healthy subject selected randomly from different ages and geneder to detect INTERLUKIN-1 B +3953 gene polymorphism in Iraqi subjects to detect the common genepolymorphiss found in IRAQ and to detect the dominant polymorphism in the population due to the important role this gene polymorphim affecting the concentration of IL-1 concentration in blood and its role in requlating the immunity.

Key words: *IL-1B*, genepolymorphism, genetic susceptibility, interlukin-1

المقدمة:

يعد الانترلوكين1من اقدم السايتوكينات التي تم اكتشافها وتسميتها في حقبة ما قبل الكلونة عام 1979 ومنذ اكتشافه ولحد الان مازالت البحوث عليه مستمرة لاستكشاف ادواره المناعية المتعددة Mantovani وجماعته 2019.

يعمل الانترلوكين1 دورا رئيسيا محفزا للاستجابة المناعية من خلال تنظيمه للمناعة عبر تاثيره على خلايا الدم البيض وتحفيزه للخلايا اللمفاوية عن طريق انتاج العوامل المحفزة للخلايا اللمفاوية (LEA) التي تحفز كلا من الخلايا اللمفاوية البائية والتائية Kaneko وجماعته 2019.

يفرز الانترلوكين 1 من الخلايا اللمفاوية والشجيرية النشطة كبروتين اولي غير فعال وزنه 37 كيلو دالتون مؤلف من 266 حامض اميني ويتحول للشكل الفعال ذو 153 حامض اميني ووزن الجزيئي 17.5 بفعل انزيم CAPSASE 1 الذي يعرف ايضا بالانزيم المحول للانترلوكين1 Poyet واخرون 2002 وMartinon واخرون 2002.

يقع الجين المشفر للانترلوكين 1 في البشر على الكروموسوم الثاني ويتالف من 7 اكسونات ويبلغ حجمه 7.5 الف زوج قاعدة ويتم تنظيمه بالنهايتين 3 و 5 UTR المنظمتين ، يحتوي هذا الجين على 144 طفرة مسجلة لحد الان جميعها غير شائعة باستثناء 3954+ (سابقا 3953+)التي تقع في الاكسون الخامس من الجين وتسمى (rs1143634; C>T)، وطفرتين اخريين اساسيتين في منطقة الحفاز هما الطفرة في الموقع -31 من الحفاز وتعرف ايضا ب (rs1143627; T>C) والطفرة في الموقع -511 من الحفاز وتعرف ب (rs16944; C>T) Behzadi واخرون 2022.

يعد الانترلوكين 1 من السايوكينات الالتهابية proinflamatory التي تلعب دورا مهما في تنظيم الاستجابة المناعية الجسم Mantovani وجماعته 2019، واي خلل في الزيادة او النقصان في انتاجه يؤدي الى خلل التنظيم المناعي مما يؤدي الى زيادة الاستعداد الوراثي الاصابة بالامراض الفايروسية Abd Alrahman وجماعتها 2020 والاخماج البكتيرية والفطرية Cauci وجماعته 2007 و Kalsoom وجماعته 2020 وShakhatreh و جماعته 2020 ونشوء امراض المناعة الذاتية المختلفة Rashad وجماعته2019 وHeidari و جماعته 2021 و Giri وجماعته 2024 . فضلا عن امراض القلب المختلفة كفشل القلب heart failure والتهاب عضلات القلب و احتشاء عضلة القلب myocardial infarction

و التهاب شغاف القلب و عدم انتظام دقات القلب و myocarditis و انتان الدم الناتج عن اعتلال عضلة القلب .Szekely و Arbel (2018) .

نظرا للدور الكبير الذي يلعبه الانترلوكين1 في تنظيم الاستجابة المناعية والدور الذي تلعبه التغايرات الوراثية لهذا الانترلوكين في الاستعداد الوراثي للامراض المايكروبية المختلفة (الفايروسية والبكتيرية والفطرية) والستعداد الوراثي لبعض الامراض المزمنه كامراض المناعة الذاتية المختلفة وامراض القلب هدفت هذه الدراسة الى التحري عن تكرار احد انواع تغايرات الجين المشفر للانترلوكين 1 وهو التغاير 3954+ الشائع عالميا والمسجل بالتسلسل (rs1143634; C>T) في عينة عشوائية من سكان مدينة بابل لمعرفة نوع التغاير الشائع فيها وبالتالي دوره المحتمل في ارتفاع نسبة الاصابة بامراض المناعة الذاتية فيها.

طريقة العمل:

اجريت الدراسة على عينات دنا مجموعة من عينات السيطرة لطلبة الدراسات العليا الماجستير ومحفوظة بدرجة - 20.

تم استخلاص الدنا من دم الاشخاص بواسطة سحب 2.5 مل من الدم الوريدي وضعها في انابيب حاوية على مادةEDTA المضادة للتخثر وحفظت العينات بدرجة حرارة -20 لحين استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA . لغرض استخلاص الدنا اذيبت العينات في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م وتمت عملية الاستخلاص في درجة حرارة مختبر لاتتجاوز 25 مئوي باستخدام عدة استخلاص الدنا المجهزة من شركة Favrogen وحسب تعليمات الشركة المجهزة لغرض الحصول على 100 مايكروليتر من الدنا النقي الذي تم التحقق من نوعيته بالترحيل الكهربائي تحت فرق جهد 100 فولت لمدة 10 دقائق في هلام الاكاروز المحضر بتركيز 0.8 % ثم حفظ الدنا النقي بدرجة حرارة -20 لحين الاستخدام.

تمت دراسة الطرز الوراثية للجين باستخدام تقانة تضخيم الدنا المتسلسلPCR والبادئين الامامي

5′- GTGTTGTCATCATCAGACTTTGACCGTA -3′ والخلفي 5′- GAGAGCTTTCAGTTCATATCGACCA -3′ المستخدم من قبل .Balding واخرون (2004) وباستخدام نفس ظروف Abd Alrahman وجماعته 2020 المتمثلة بتضخيم من 35 دورة من المسخ بدرجة94 م لمدة 20 ثانية والتحام بدرجة 59 مئوي لمدة 55 ثانية و استطالة بدرجة 72 م لمدة 25 ثانية ومسخ ابتدائي بدرجة حرارة 94 لمدة 3 دقائق واستطالة نهائية بدرجة حرارة 72 م لمدة 7 دقائق. اجريت

عملية تضخيم الجين باستخدام خليط مكون من 12.5 مايكروليتر من 2X GO Taq Green mastermix من شركة Promega الامريكية و1 مايكروليتر من كل من البادئ الامامي والخلفي بتركيز 10 بيكومول المصنعين من شركة الفا دنا الكندية و5 مايكروليتر من الدنا و 4.5 مايكروليتر من المام المقطر الخالي من الايونات والانزيمات المحللة للدنا باستخدام جهاز التضخيم من نوع Verti96 Thermo cycler من شركة Applied biosystem الامريكية. لتضخيم قطعة من الدنا بحجم 249 زوج قاعدة ثم عومل ناتج التفاعل بالانزيم القاطع tagI وذلك باضافة 0.2من مصل البقر و 0.5 من الانزيم القاطع(TagI) و 2 من المحلول الدارئ الخاص بالانزيم لكل 10 مايكروليتر من العينة وحضن بدرجة حرارة لمدة 6 ساعات.

اجريت عملية الترحيل الكهربائي للجين المضخم بعد معاملته بالانزيم القاطع بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2.5% الحاوي على مادة RED SAFE كصبغة غير مسرطنة للدنا و استخدام معلمات حجمية للدنا من نوع 100bp DNA ladderمن شركة Genedirex الكورية لاعطاء مدى لقياس حجم الدنا بين 100 الى 1000 زوج قاعدة تحت فرق جهد 100 فولت لمدة 10 دقائق تلاه 90 دقيقة من فرق جهد قدره 50 فولت باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي AgaroPower™ device من شركةBioneer الكورية وصور باستخدام كاميرا رقمية باستخدام جهاز توثيق الهلام Gel documentation system .

قراءة الطراز الوراثي او الشكلي للجين تكون كالاتي :

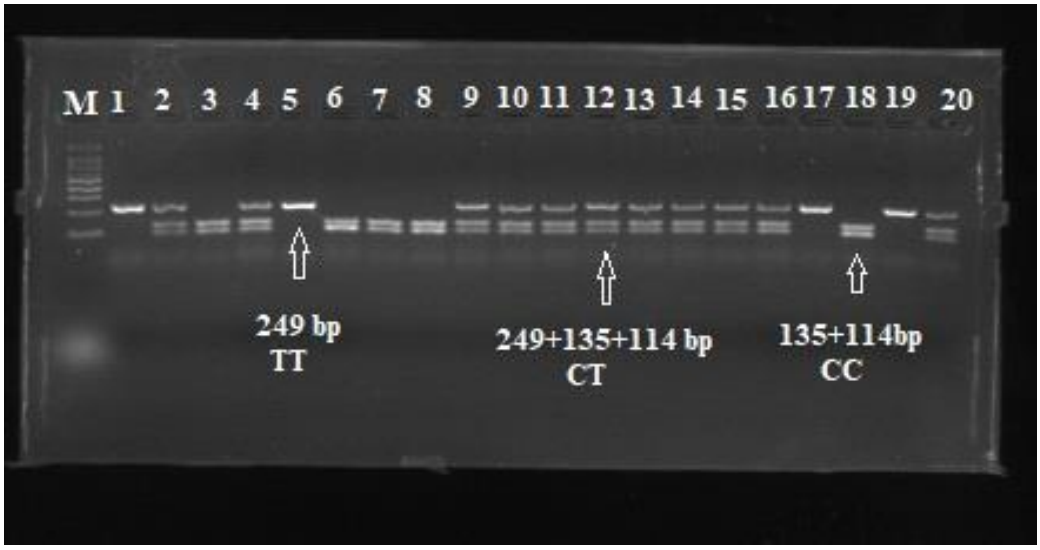
ظهور حزم غير مقطوعة بالانزيم قطع بحجم 249 زوج قاعدة تشير الشكل متماثل الاليل (Homozygote) للاليل (T) اي الطرازالوراثي TT

ظهور حزم مقطعة بحجم 135 و 114 زوج قاعدة تشير الى الشكل متماثل الاليل(Homozygote) للاليل (C) اي الطراز الوراثي CC

وجود حزم حاوية على ثلاث قطع باحجام 249 و 135 و 114 زوج قاعدة تمثل الشكل المتغاير (Heterozygote) اي الطراز الوراثي TC. Abd Alrahman وجماعته 2020.

النتائج والمناقشة:

اظهرت الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل بلمرة انزيم الدنا المتسلسل لعينات الدنا وجود ثلاث طرز جينية للطفرة 3954+ للجين المشفر للانترلوكين 1 الشائعة عالميا والمسجل بالتسلسل (;rs1143634 C>T) وهي: CC و CT و TT شكل 1 . اذ وجدت عينات من الناتج قطعت بالكامل الى حجم 114 و 135زوج قاعدة تمثل العينات ذات الطراز الوراثي CC ، وعينات حاوية على ثلاث قطع بحجم 114 و135 و249 زوج قاعدة تمثل العينات ذات الطراز الوراثي الهجين CT وعينات لم تتعرض للقطع بالانزيم القاطع Taq I بحجم 249 زوج قاعدة تمثل العينات الحاوية على الطراز الوراثي TT .



شكل (1) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل بلمرة الدنا المتسلسل لجين انترلوكين 1 بيتا بعد المعاملة بالانزيم القاطع TagI

المسارM : معلم دنا بحجم 100 bp، المسارات 1و 5 و17 و19 : الطراز الوراثي TT ، المسارات 2 و4 و9 و 10 و11 و12 و13 و14 و15 و16 و 20 الطراز الوراثي CT، المسارات 3 و6 و7 و8 و18 الطراز الوراثي CC (اجري الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 2.5% الحاوي على صبغة RED SAFE لتصبيغ الدناعلى فرق جهد 100 فولت لمدة 10 دقائق تلاه 90 دقيقة على فرق جهد 50 فولت)

يلخص الجدول 1 نتائج التغاير الوراثي للعينات المدروسة والبالغة 75 عينة عشوائية لاشخاص اصحاء من مدينة الحلة باعمار تراوح ت بين 18 -55 ولكلا الجنسين .

جدول (1) تكرار الاليلات والجينات في العينات

التكرار	الطراز الجيني او الاليل
13(17.333%)	TT
41(54.666%)	TC
21(28%)	CC
75	Total
	Allele
67(44.666%)	T
83(55.333%)	C

حيث تظهر النتائج ان الطراز الوراثي الهجين CT هو الطراز الاكثر شيوعا في العينة المدروسة اذ تكرر بنسبة (54.666%) يليه الطراز الوراثي CC الذي تكرر بنسبة (28%) وعلى الرغم من كون الطراز TT كان بتكرار اقل من الطرازين السابقين الاان مجموع الطرازين TTو CT سوية يكون عالي جدا في العينة المدروسة مقارنة بانتشاره وتكراره في بقية المجتمعات. اذ ظهر اليل Tبتكرار (44.666%) وهذا التكرار عالي اذا ماقورن بعينات تابعة للمجتمعات الاخرى او للمجتمع العراقي بفترات سابقة Mahmood وجماعته 2018 و Abd Alrahmanوجماعته2020.

يرتبط الاليل T بزيادة انتاج الانترلوكين 1 بيتا من قبل الخلايا المناعية وبالتالي زيادة تركيزه في الدم مقارنة بالاليل C اذ تبلغ الزيادة في انتاجه 4 اضعاف الاليل C (Attar *etal*., 2010) ولهذه الزيادة تاثير على تنظيم السايتوكينات في الجسم لكون انترلوكين بيتا 1 من السايتوكينات الالتهابية المنظمة لافراز العديد من السايتوكينات الالتهابية (Behzadi et al., 2022 , Giri et al., 2024)، وغالبا ماترتبط بزيادة الاستعداد للاصابة بالامراض المناعة الذاتية كمرض التهاب المفاصل الرثواني Mahmood وجماعته

2018 و الربو والانواع المختلفة من الحساسية Zeyrek و جماعته 2008 و داء الذئب الاحمراري Rashad وجماعته 2019 والتهاب وانحساراللثة Ferreira وجماعته 2008 و التهاب الغدة الدرقية Lacka Hashimotos thyroiditis وجماعته 2014 وHeidari وجماعته 2021، فضلا عن ارتباطه بزيادة الاستعداد للاصابة ببعض الامراض الفايروسية وحدوث عاصفة السايتوكينات cytokine storm للبعض الاخر Alcendor وجماعته 2012 و Abd Alrahmanوجماعته2020.

لذلك قد تفسر هذه النتائج التي حصلنا عليها النسبة العالية لامراض المناعة الذاتية المنتشرة في المجتمع العراقي والتي من المحتمل ان يكون السبب في انتشارها امتلاك العراقيين لتكرار عالي من اليل T . فقد ربطت دراسات سابقة اجريت في العراق بين الطرازين الوراثيين TT و CT والاصابة بالتهاب المفاصل الرثواني Mahmood وجماعته 2018 واشارت دراسة Naif و Jemeel 2019 الى زيادة الاصابة بذات الرئة بين حديثي الولادة الحاملين للطرز الوراثية TT و CT .

المصادر:

Abd Alrahman, S, Tolaifeh, ZA., Ibraheam, IA (2020). Interleukin 1β and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen: role in susceptibility to cytomegalovirus infections. Eurasia J Biosci 14, 3321-3325.

Alcendor, DJ, Charest, AM, Zhu,WQ, Vigil, HE, and Knobel, SM.(2012)Infection and upregulation of proinflammatory cytokines in human brain vascular pericytes by human cytomegalovirus. Journal of Neuroinflammation 2012, 9:95. http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/95

Attar , R, Agachan, B, Kucukhuseyin, O, Toptas, B, Attar, E, and Isbir, T. (2010). Association of interleukin 1beta gene (+3953) polymorphism and severity of endometriosis in Turkish women. Mol Biol Rep. 37(1):369-374.

Balding, J, Livingstone, WJ, Conroy, J, Mynett-Johnson, L, Weir, G, Mahmud, N and Smith, OP.(2004). Inflammatory bowl disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. Med of inflam .13, 181-187.

Behzadi, P, Sameer, AS, Nissar, S, Banday, MZ, Gajdács, M, García-Perdomo, HA, Akhtar ,K, Pinheiro, M, Magnusson, P, Meysam Sarshar M, and Ambrosi C. (2022). The Interleukin-1 (IL-1) Superfamily Cytokines and Their Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Journal of Immunology Research. Volume 2022, Article ID 2054431, 25 pages.

Cauci, S, Santolo, MD, Casabellata, G, Ryckman, K, Williams, SM, and Guaschino, S. (2007) Association of interleukin-1b and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms with bacterial vaginosis in non-pregnant Italian women. Molecular Human Reproduction .13: 243–250.

Ferreira, SB, Trombone, AP, Repeke, CE, Cardoso, CR, Martins, W, Santos, CF, Trevilatto, PC, Campos, MJ, Campanelli, AP, Silva, J, and Garlet, GP.(2008). An Interleukin-1B (IL-1B) Single-Nucleotide Polymorphism at Position3954 and Red Complex Periodontopathogens Independently and Additively Modulate the Levels of IL-1B in Diseased Periodontal Tissues. Infection and Immunity.78(8): 3725–3734

Giri, P, Parmar, M, Ezhuthachan, DD, Desai, T, and Dwivedi, M.(2024). Promoter polymorphisms of *neuropeptide Y, interleukin-1B* and increased IL-1β levels are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in South Gujarat population. Human gene. . Volume 39: Article ID 201251,12 Pages.

Heidari, Z, Salimi, S, Rokni, M, Rezaei, M, Khalafi, N, Shahroudi, M J, Dehghan, A, and Saravani, M.(2021). Association of IL-1*β*, NLRP3, and COX-2 Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease Risk and Clinical Features in the Iranian Population. Biomed Res Int. Volume 2021: Article ID 7729238. 10 pges.

Kalsoom, F, Rahman, S, Mahmood, MS, and Tahir Zahoor, T.(2020). Association of Interleukin-1B gene Polymorphism with *H. pylori* infected Dyspeptic Gastric Diseases and Healthy Population. Pak J Med Sci. 36(4): 825–830.

Kaneko, N, Kurata, M, Yamamoto, T, Morikawa, S, and Masumoto, J. (2019).The role of interleukin-1 in general Pathology. Inflamm and Regener. 39:12. (2019). https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5

Lacka ,K, Paradowska-Gorycka , A, Maciejewski, A, Kramer, L, Herman, WA, and Lacki, JK.(2014). Interleukin 1 Beta (IL1beta) Gene Polymorphisms (SNP-511 and SNP + 3953) in Hashimoto's Thyroiditis among the Polish Population. Exp Clin Endocrinol Diabetes . 122: 544–547.

Mahmood, AS, Al-Kazaz, AA, Ad'hiah, AH. (2018).Single Nucleotide Polymorphism of *IL1B* Gene (rs16944) in a Sample of Rheumatoid Arthritis Iraqi Patients. Iraqi Journal of Science. 59(2): 1041-1045.

Mantovani, A,. Dinarello, CA, Molgora, M, and Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. Immun. 50:778–795.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β.Mol Cell. 10:417–26.

Naif, EB, and Gemeel, F. (2019).Polymorphism of IL-1β gene in Iraqi pediatric pneumonia patients. *International* Journal of Pharmaceutical Research.11(2);48-53.

Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, and Alnemri ES.(2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. J Biol Chem.277:21119–21122.

Rashad, NM, Soliman, MH, ELShal, AS, Said, D, and Samir GM.(2019). Effect of interleukin-1β gene polymorphisms on clinicopathological features and disease activity of systemic lupus erythematosus . *The Egyp J of Inte Med.* 31: 235–242.

Shakhatreh, MA, Khabour, OF, Alzoubi, KH, BaniHani, MN, Abu-Siniyeh, A, Bashir, NA, Sabi, SH, and Mahafdah, M. (2020). The Influence of *IL-1B* Gene Polymorphisms on *H. pylori* Infection and Triple Treatment Response Among Jordanian Population. Appl Clin Genet. 13: 139–145.

Szekely, Y. and Arbel, Y(2018). A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today? Cardiol Ther (2018) 7:25–44.

Zeyrek, D, Demir, E, Durmar, A, Ozkinary, F, Gulen, F,and Tanac, R. (2008). Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma. Allergy and Asthma Proceedings.29(5):468-474.