

بررسی واژگونی اینترون ۲۲ و مارکر *HindIII* در اینترون ۱۹ ژن فاکتور VIII انعقادی در بیماران هموفیل A

The study of intron 22 inversion and *HindIII* marker in intron 19 of FVIII gene in severe hemophilia A

سید رضا کاظمی نژاد^{۱*}، هانیه نجفی^۱، تینا شفاف^۱، رضا علی بخشی^۲

۱- به ترتیب دانشیار، کارشناس ارشد، دانشجوی دکتری، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم گروه ژنتیک، اهواز

۲- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی گروه بیوشیمی بالینی، کرمانشاه

Kazemi Nezhad SR^{*1}, Najafy H¹, Shaffaf T¹, Alibakhshi R²

1- Associate Professor, MSc Student, PhD Student, Department of Genetics, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Medical Biochemistry, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kazemi_reza@scu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

هموفیلی A یک بیماری وابسته به X مغلوب است که به دلیل نقص در فاکتور انعقادی VIII ایجاد می شود. واژگونی اینترون ۲۲ توسط روش های سادرن بلات و Long Distance-PCR و اخیراً توسط Inverse Shifting-PCR شناسایی شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی روش جدید IS-PCR به منظور شناسایی جهش شایع Inversion-22 و بررسی میزان همراهی پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ در بیماران هموفیل شدید و افراد کنترل برای شناخت هاپلوتایپ ها می باشد. به این منظور ۴۰ مرد هموفیل شدید غیر خویشاوند و ۴۰ فرد سالم برای این آزمایش انتخاب شدند. نتایج آزمایش IS-PCR نشان داد که ۱۷ نفر از ۴۰ بیمار هموفیل شدید (۴۲ درصد) دارای واژگونی در اینترون ۲۲ هستند. نتایج به دست آمده از همراهی پلی مورفیسم C/T نشان داد که هیچ گونه همراهی برای پلی مورفیسم C/T بین جمعیت بیمار و کنترل وجود ندارد. اینکه این نتایج می تواند به عنوان روش های تشخیصی استفاده شود یا نه، نیاز به بررسی بیش تر و توالی یابی قطعه تکثیر شده موتانت، تنظیم شرایط PCR و یا طراحی آغازگرهای جدید دارد. IS-PCR روشی قدرتمند و کم هزینه است که مدت زمان آزمایش را کاهش می دهد و می تواند جایگزین خوبی برای روش های قبلی باشد.

واژه های کلیدی

پلی مورفیسم

ژن *FVIII*

هموفیلی A

واژگونی در اینترون ۲۲
IS-PCR

BclI در دمای 55°C به مدت ۵-۴ ساعت در بن ماری قرار گرفت. سپس قطعات DNA هضم شده توسط آنزیم *BclI* با آنزیم-*T4* DNA Ligase به یکدیگر نزدیک شدند و DNA حلقوی تشکیل شد. در این مرحله از ۵۰-۱۰ ng از DNA خطی، $50\mu\text{L}$ آب دو بار تقطیر، پنج واحد *T4* DNA ligase و $5\mu\text{L}$ از *T4* DNA 10X buffer استفاده شد. محصول روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و نتایج قابل قبولی مشاهده شد. از DNA حاصل به- عنوان الگو برای انجام PCR استفاده شد.

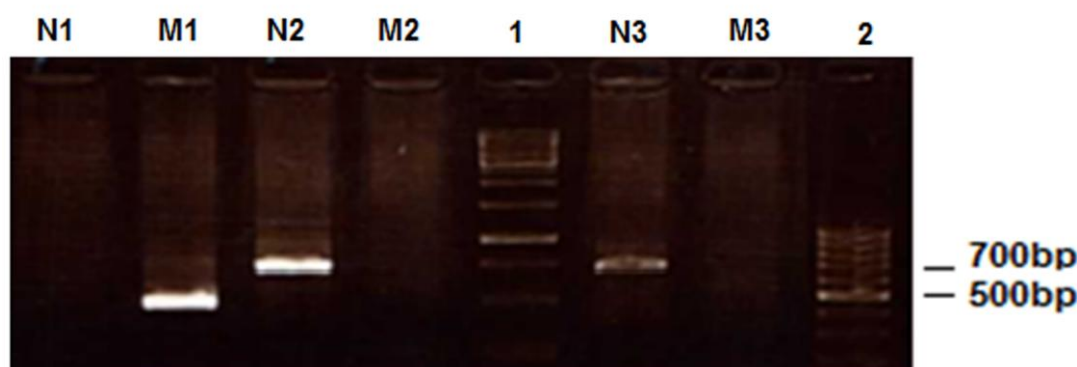
واکنش IS-PCR با استفاده از مواد اولیه طبق پروتکل ارائه شده توسط Roozafzay et al. (2013) با آغازگرهای ID و IU آغازگرهای نرمال، 2U و 3U آغازگرهای موتانت (جدول ۱)، در دستگاه ترموسایکلر گرادیانت مدل (AB) applied biosystems انجام شد. در ادامه، توالی‌های تکثیر شده در IS-PCR توالی‌یابی شدند. مواد وارد شده در واکنش PCR برای بررسی مارکر C/T در اینترون ۱۹ شامل ۲ تا ۴ میکرولیتر DNA ژنومی، یک میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت (شرکت Metabion، جدول ۱)، $2/5$ میکرولیتر مخلوط dNTP (شرکت KBC)، دو میکرولیتر MgCl_2 $2/5$ میکرولیتر بافر 10X و $0/2$ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمرز (سیناژن، ایران)، ۱۶ تا ۱۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. تعیین ژنوتیپ‌های مورد نظر به روش چند شکلی طولی قطعه هضم شده (RFLP) صورت گرفت. به منظور تعیین ژنوتیپ‌های مورد نظر، محصول PCR در معرض اثر آنزیم *HindIII* قرار گرفت. در این مرحله یک میکرولیتر از آنزیم *HindIII*، دو میکرولیتر بافر R، سه میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل و 20 میکرولیتر از محصول PCR استفاده شد. نتیجه حاصل پس از الکتروفورز روی ژل آگارز بر اساس وجود یا عدم وجود توالی اختصاصی برش آنزیم، که منجر به الگوی متفاوت باندها روی ژل می‌شود، برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از رگرسیون لجستیک، Odd Ratio و P-value برای هر ژنوتیپ سنجیده شد. در واکنش IS-PCR جهت تجزیه و تحلیل اینترون ۲۲، پس از انجام مراحل برش ژنوم با آنزیم و تهیه DNA حلقوی و در نهایت انجام PCR، قطعات تکثیر شده روی ژل $1/5$ درصد الکتروفورز بارگذاری شدند (شکل ۱).

هموفیلی (A(HA: OMIM 306700) یا نقص در فاکتور VIII انعقادی رایج ترین شکل ناهنجاری خونی است که یک در هر ۵۰۰۰ مرد و یک در هر ۱۰۰۰۰ زن رخ می دهد (Hedner et al. 2000). این بیماری یک اختلال وابسته به X مغلوب است که توسط موتاسیون در ژن فاکتور VIII (*FVIII*) ایجاد می‌شود (Renault et al. 2007). ژن *FVIII* تنها ژن مرتبط با هموفیلی A، در انتهای دور بازوی بلند کروموزم (Xq28) X قرار دارد و ۱۸۶ کیلو باز از DNA ژنومی را در بر می گیرد (Husain 2009). یکی از مارکرهای رایج در ژن *FVIII* که توسط PCR و برش با آنزیم شناسایی شد، مارکر *HindIII* در اینترون ۱۹ (G/A) بود (Graham et al. 1990). کروموزوم X شامل سه کپی از *F8A* است که یکی از آن‌ها در اینترون ۲۲ (*int-22h-1*) و دوتای دیگر (*int-22h-2* و *int-22h-3*) نزدیک تلومر و با فاصله حدود 500 kb بالادست منطقه شروع رونویسی ژن *FVIII* قرار دارند. (Freije and Schlessinger 1992). جهش واژگونی اینترون ۲۲ در ژن *FVIII* معمولاً از طریق نوترکیبی درون کروموزومی بین توالی واقع در اینترون ۲۲ (*int-22h-1*) و یکی از کپی های این توالی (*int-22h-2* یا *int-22h-3*) رخ می‌دهد (Antonarakis et al. 1995). هدف از انجام این مطالعه بررسی روش IS-PCR برای شناسایی جهش شایع واژگونی اینترون ۲۲ و بررسی همراهی مارکر پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ در جمعیت نرمال و بیمار هموفیل شدید می‌باشد.

نمونه‌گیری از ۴۰ مرد هموفیل شدید غیر خویشاوند و دارای پرونده ثبت شده هموفیلی در بیمارستان محمد کرمانشاهی شهرستان کرمانشاه انجام شد و از ۴۰ نمونه ی DNA افراد مذکر غیر خویشاوند بومی به عنوان کنترل استفاده شد. ۱۰-۵ میلی لیتر از خون محیطی بیمار گرفته و در داخل یک فالتون حاوی EDTA ریخته شد. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم صورت گرفت (Miller et al. 1998). برای تجزیه و تحلیل اینترون ۲۲ از روش ذکر شده در تحقیقات Rossetti et al. (2011) استفاده شد. ابتدا DNA ژنومیک به صورت حلقوی در آورده شد، سپس IS-PCR روی آن انجام گرفت. هضم آنزیمی توسط کیت (Fermentase Canada) انجام گرفت. برای تهیه DNA حلقوی $3\mu\text{g}$ -۰/۵ از DNA ژنومی همراه با $20\mu\text{L}$ -۱۶ آب دوبار تقطیر و $2\mu\text{L}$ -۰/۵ از

جدول ۱- نام و توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش IS-PCR در بررسی اینترون‌های ۱۹ و ۲۲

اینترون ۲۲	آغازگرهای نرمال	ID (F): 5'-ACATACGGTTTGTAGTCACAAGT-3' IU (R): 5'-CCTTTCAACTCCATCTCCAT-3'
	آغازگرهای موتانت	2U (R): 5'-ACGTGTCCTTTGGAGAAGTC-3' 3U (R): 5'-CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC-3'
اینترون ۱۹	آغازگر Forward	5'-GAGCATCTACATGCTGGGATG-3'
	آغازگر Reverse	5'-GTCCAGAAGCCATTCCAG-3'



شکل ۱- الکتروفورز محصولات به دست آمده از PCR در روش IS-PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. N پرایمر نرمال و M پرایمر موتانت برای هر نمونه است (چاهک شماره ۱ مارکر ۱ Kb و چاهک ۲ مارکر ۱۰۰ bp).

پس از هضم محصول PCR با آنزیم *HindIII* برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه و با توجه به توالی جایگاه شناسایی آنزیم ژنوتیپ هر نمونه تعیین شد (شکل ۲). محصول PCR با طول ۶۹۳ bp دارای دو جایگاه برش بود، جایگاه برش اول در ژنوم همه ی افراد وجود داشت اما جایگاه برش دوم به صورت پلی مورفیسم C/T بود (AAGYTT). با هضم محصول PCR، قطعه ۴۶۱ bp در همه نمونه‌ها دیده شد. برای افرادی که فقط همین جایگاه برش را داشتند قطعه‌های ۴۶۱ bp و ۲۳۲ bp حاصل شد اما افرادی که دارای نوکلئوتید C بودند، جایگاه برش دوم برای آنزیم را نیز فراهم کرده و قطعه ۲۳۲ bp به دو قطعه ۱۵۲ bp و ۸۰ bp برش خورد.

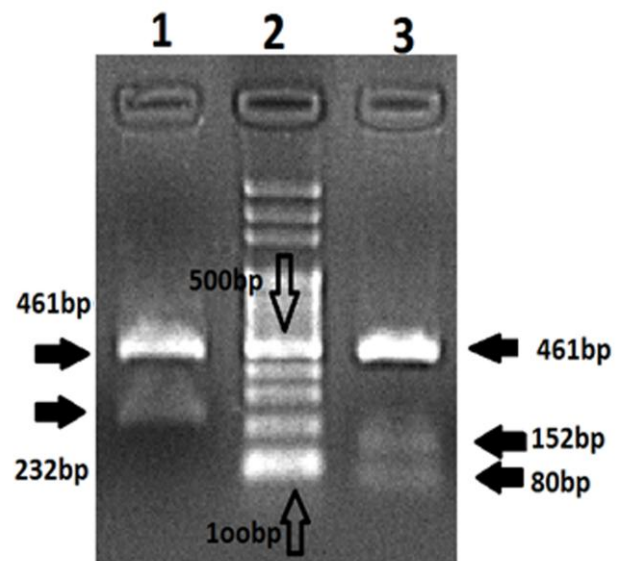
در جمعیت کنترل فراوانی C=29% و T=11% و در جمعیت بیمار فراوانی C=27% و T=13% محاسبه شد. فراوانی مورد انتظار تحت فرض استقلال با فراوانی مشاهده شده، تفاوت چندانی نداشت، بنابراین پذیرش فرض استقلال فرضی منطقی

طول قطعات تکثیر شده با آغازگرهای نرمال (ID, IU) حدود ۷۰۰ bp و طول قطعه تکثیر شده با آغازگرهای موتانت (2U, 3U) حدود ۴۵۰ bp مشاهده شد. قطعه ی دارای ۷۰۰ bp طول در سایت NCBI همتراز شد و مشاهده شد که توالی تکثیر شده ی ۷۰۰ bp با توالی تکثیر شده برای آغازگرهای ID و IU مطابقت داشت، اما قطعه ۷۰۰ bp حدود ۲۰۰ نوکلئوتید بزرگتر از توالی مورد انتظار به دست آمد. پس از بررسی در اطراف توالی تکثیر شده مشخص شد که برش ژنوم توسط *BclII* و اتصال قطعات برش خورده با آنزیم T4-DNA Ligase به درستی صورت گرفته و در نتیجه، محصولات به دست آمده از لحاظ صحت تکثیر توالی مورد نظر مشکلی نداشته و تنها دارای ۲۰۰ اضافه برای اتصال قطعه صحیح می‌باشد. میان بیماران هموفیل شدید مورد مطالعه، ۱۷ بیمار (۴۲٪ درصد) واژگونی اینترون ۲۲ را نشان دادند. واکنش PCR برای بررسی پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ انجام گرفت. محصول تکثیر شده با آغازگرهای رفت و برگشت برای این پلی مورفیسم، ۶۹۳ bp طول داشت.

مصری دارای واژگونی ایترون ۲۲ هستند (Abou-Elew et al. 2011). در ایران در سال ۲۰۱۱ روش IS-PCR و LD-PCR بر روی ۲۰ فرد هموفیل شدید و برای شناسایی واژگونی ایترون ۲۲ انجام گرفت. ۱۴ نفر از ۲۰ نفر (۶۳ درصد) دارای Inv22 بودند که نشان دهنده شیوع بالای جهش Inv22 در بین ایرانیان می باشد (Mousavi et al. 2011). همچنین ۳۰ فرد هموفیلی شدید از اصفهان برای شناسایی واژگونی ایترون ۲۲ و ۱ با استفاده از روش IS-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند که ۱۲ نفر دارای واژگونی نوع یک در ایترون ۲۲ و ۲ نفر دارای واژگونی ایترون یک بوده اند (Roozafzay et al. 2013). درصد واژگونی ایترون ۲۲ در بیماران هموفیل شدید از جمعیت کرمانشاه در مطالعه حاضر (۰/۴۲ درصد)، با اختلاف پنج درصد تایید کننده نتایج حاصل از بررسی بیماران هموفیل شدید در اصفهان (۰/۴۷ درصد) می باشد، ولی با توجه به بررسی انجام شده در کل کشور و قومیت های مختلف، اختلافی به میزان ۲۱ درصد بین نتایج حاصل دیده می شود که می توان آن را به اختلاف های ژنتیکی اقوام و نژادهای مختلف در سرتاسر ایران نسبت داد. با افزایش تعداد بیماران هموفیل شدید مورد مطالعه در آزمایش های بعدی می توان این اختلاف را دقیق تر مطالعه کرد.

با توجه به محدودیت های روش های تعیین مستقیم نواقص مولکولی در بیماران هموفیل و امکانات آزمایشگاه های ژنتیک سطح کشور استفاده از روش PCR-RFLP به صرفه و عملی می باشد و استفاده از مارکرهای چند شکلی *HindIII* برای بررسی احتمال ناقل بودن در خانواده های هموفیل توصیه می شود (Hashemi et al. 2010). یکی از اهداف این مطالعه بررسی همراهی بین چندشکلی C/T در افراد بیمار هموفیلی و جامعه سالم با روش PCR-RFLP بود که از آن می توان برای تشکیل هاپلوتایپ جمعیتی استفاده کرد. مطالعات مشابه تا کنون در جایی ثبت نشده اند (Kogan et al. 1987). در مطالعه ای که در ایران انجام شده فراوانی های به دست آمده متفاوت با یافته های این مطالعه بودند (C=0.48 و T=0.52) در واقع فراوانی آلی چندشکلی T بیش تر از C بوده است. درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار حدود ۵۰ درصد است. به دلیل این که جمعیت ایران از نژادهای مختلف با زمینه ژنتیکی متنوع تشکیل شده است، بنابراین

است. برای تایید این نتیجه مقدار آماره کای دو محاسبه شد و این فرض را در سطح پنج درصد مورد آزمون قرار داد.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR پلی مورفیسم ایترون ۱۹ پس از هضم با آنزیم *HindIII* بر روی ژل آگاروز سه درصد؛ چاهک ۱، مرد همی زیگوت C (negative)؛ چاهک ۳، مرد همی زیگوت T (positive)؛ چاهک ۲، 100 bp ladder

مشاهده شد که مقدار آماره کای دو کم (۰/۲۳۸) بوده و مقدار *p*-value بیشتر از ۰/۰۵ است (۰/۶۲۶). بنابراین فرض استقلال دو متغیر در سطح پنج درصد پذیرفته می شود. در ادامه نسبت ORها و فاصله اطمینان برای آن ها (CI) به منظور تایید نتایج بخش قبلی محاسبه شد که مقدار OR برابر با ۱/۲۷، و میزان CI برابر ۱/۱۹۷ و ۰/۷۲۰- به دست آمدند. رگرسیون لجستیک با استفاده از نرم افزار SPSS محاسبه شد که نتایج معنی داری حاصل نشدند (*p*-value=0.633) در مطالعه حاضر ۱۷ نفر از ۴۰ بیمار هموفیل شدید مورد بررسی (۰/۴۲ درصد) دارای واژگونی ایترون ۲۲ بودند که این میزان در مطابقت با مطالعات انجام شده قبلی می باشد (Bagnall et al. 2005; Bagnall et al. Chorbah et al. 2001). در مصر میزان واژگونی ایترون ۲۲ با استفاده از IS-PCR روی ۳۰ بیمار هموفیل بررسی شده که هفت نفر از ۱۳ نفر هموفیل شدید (۲۳ درصد) دارای واژگونی ایترون ۲۲ بودند. مطالعه حاضر نشان داد درصد بالاتری از افراد هموفیل شدید مورد مطالعه (۰/۴۲ درصد) از جمعیت ایرانی نسبت به جمعیت

دارای سابقه هموفیلی بهره برد که شرط اولیه برای استفاده از این مارکرها وجود مادر هتروزیگوت برای ردیابی آلل معیوب می-باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و سایر همکاران و عزیزان یاری دهنده در انجام این پروژه، نهایت سپاس و امتنان را دارند.

منابع

Abou-Elew H, Ahmed H, Raslan H, Abdelwahab M, Hammoud R, Mokhtar D, Arnaout H (2011) Genotyping of intron 22-related rearrangements of F8 by inverse-shifting PCR in Egyptian hemophilia A patients. *Annals of hematology* 90:579-84.

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, De Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HJ, Negrier C, Vinciguerra C (1995) Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 86:2206-12.

Azimifar SB, Seyedna SY, Zeinali (2006) Allele frequencies of three factor VIII gene polymorphisms in Iranian populations and their application in hemophilia A carrier detection. *American journal of hematology* 81:335-9.

Bagnall RD, Ayres KL, Green PM, Giannelli F (2005) Gene conversion and evolution of Xq28 duplicons involved in recurring inversions causing severe hemophilia A. *Genome research* 15: 214-23.

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM (2006) Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4: 591-8.

Chorba TL, Holman RC, Clarke MJ, Evatt BL (2001) Effects of HIV infection on age and cause of death for persons with hemophilia A in the United States. *American journal of hematology* 66: 229-40.

Freije D, Schlessinger D (1992) A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *American journal of human genetics* 51:66.

Graham JB, Kunkel GR, Fowlkes DM, Lord ST (1990) The utility of a HindIII polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. *British journal of haematology* 76:75-9.

به دست آوردن اطلاعات کافی راجع به واریانتهای ژنتیکی در مناطق مختلف برای به حصول به تشخیص ناقلین هموفیلی و انجام اقدامات پیشگیرانه قبل از تولد ارزشمند است (Azimifar et al. 2006). این مطالعه در راستای شناسایی روشهای ممکن برای شناسایی ناقلین هموفیلی و انجام تشخیصهای قبل از تولد پایه گذاری شده است. این که نتایج حاضر می توانند به عنوان روشهای تشخیصی استفاده شوند، نیاز به بررسی بیشتر برای توالی یابی قطعه تکثیر شده موتانت و تنظیم شرایط PCR و یا طراحی آغازگرهای جدید دارد. همچنین با توجه به درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت می توان از مارکر HindIII در مطالعات پیوستگی برای شناسایی افراد ناقل در خانواده های

Hashemi SS, Hosseini KZ, Bagherian RM, Mohseni R, Siami E, Valizadeh F, Zakizadeh R (2010) Evaluation of hemophilia A families to detect carriers using gene linkage in Mazandaran province, *Journal of Babol university of medical sciences* 53:64-70.

Hedner U, Ginsburg D, Lusher JM, High KA (2000) Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the pathophysiology and treatment of hemophilia. *ASH Education Program Book* 2000:241-65.

Husain N (2009) Carrier analysis for hemophilia A: ideal versus acceptable. *Expert review of molecular diagnostics* 9:203-7.

Jenkins PV, Collins PW, Goldman E, McCraw A, Riddell A, Lee CA, Pasi KJ (1994) Analysis of intron 22 inversions of the factor VIII gene in severe hemophilia A: implications for genetic counseling. *Blood* 84:2197-201.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J (1987) An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *New England Journal of Medicine* 317:985-90.

Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J (1993) Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature genetics* 5:236-41.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16:1215.

Mousavi SH, Namin SA, Ala F (2011) Application of new molecular methods in detection of Intron 22 inversion mutation of factor VIII gene in patients with Hemophilia A. *Clinical Biochemistry* 44:S97.

Renault NK, Dyack S, Dobson MJ, Costa T, Lam WL, Greer WL (2007) Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. *European Journal of Human Genetics* 15:628-37.

Roozafzay N, Kokabee L, Zeinali S, Karimipoor M (2013) Evaluation of intron 22 and intron 1 inversions of the factor 8 gene using an inverse shifting PCR method in severe haemophilia A patients. *Science Asia* 39:174-8.

Rossetti LC, Radic CP, Abelleyro MM, Larripa IB, De Brasi CD (2011) Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. *International journal of molecular sciences* 12:7271-85.

Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD (2008) Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6:830-6.

Van-de-Water NS, Ridgway D, Ockelford PA (1991) Restriction fragment length polymorphisms associated with the factor VIII and factor IX genes in Polynesians. *Journal of medical genetics* 28:171-6.