ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹
صفحه ۲۶-۲۱

بررسی ملکولی بیماری PKU در جمعیت ایرانی: گزارش موردی از شناسایی جهش جدید در ژن *PAH* در دو خانواده ایرانی

شهره زارع کاریزی[۱]، سیدمهدی حسینی مزینانی[۲]*، مژگان کوچمشگی[۳]، غلامرضا جوادی[۴]

۱- دانشجوی دوره دکتری ژنتیک ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
۲و۳- به ترتیب دانشیار و روانپزشک گروه ژنتیک ملکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۴- دکتری گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات- تهران
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hosseini@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

فنیل کتونوری شایع‌ترین اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه می‌باشد و فراوانی آن در جمعیت ایرانی یک نفر در هر ۳۶۲۷ تولد تخمین زده شده است. علت این بیماری با الگوی توارث اتوزوم مغلوب، جهش‌هایی است که در ژن *PAH* اتفاق می‌افتد. تا بحال صدها جهش مختلف در ژن *PAH* گزارش شده است که منجر به بیماری PKU می‌شود. طیف این جهش‌ها در جوامع مختلف متفاوت است. این مطالعه گزارشی از شناسایی یک جهش جدید در ژن *PAH* در دو بیمار مبتلا به PKU کلاسیک در طی تعیین طیف جهش‌های ژن *PAH* در ۱۵۰ بیمار ایرانی می‌باشد. این جهش یک تغییر تک نوکلئوتیدی در اگزون هفت ژن *PAH* بوده که در طی آن نوکلئوتید دوم کدون ۲۴۷ تغییر می‌یابد (G به A). در نتیجه این جهش - در قلمرو کاتالیتیک پروتئین- آسید امینه گلایسین (Gly) به آسپارتیک اسید (Asp) تبدیل می‌شود.

واژه‌های کلیدی

فنیل آلانین،
الگوی موتاسیون،
غربالگری،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.2.5]

مقدمه

هایپرفنیل آلانینمیا (HPA;OMIM 261600)، شایع‌ترین گروه بیماری‌های ارثی ناشی از نقص در متابولیسم اسیدهای آمینه می‌باشد. فراوان‌ترین شکل این گروه از بیماری‌ها، بیماری فنیل کتونوری (PKU) است (۱۴). فنوتیپ‌های HPA به سه دسته تقسیم می‌شوند: هایپر فنیل آلانینمیایی ملایم (HPAIII یا MHP) که میزان فنیل آلانین در پلاسمای خون بیمارانی که تحت درمان قرار نگرفته‌اند بین μM ۶۰۰-۱۲۰ است. فنیل کتونوری ملایم (HPAIIیا MPK) که میزان فنیل آلانین در پلاسمای خون این بیماران بین μM ۱۲۰۰ -۶۰۰ متغیر است. فنیل کتونوری کلاسیک (HPAI یا PKU) زمانی است که میزان فنیل آلانین در پلاسمای خون بیمارانی که تحت درمان قرار نگرفته‌اند، بیش از μM ۱۲۰۰ می‌باشد (۷). علت بیماری PKU با توارث اتوزوم مغلوب، جهش‌هایی است که در ژن کد کننده آنزیم کبدی فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) اتفاق می‌افتد. این آنزیم در حضور کوفاکتور تتراهیدروبیوپترین (BH4) باعث تبدیل L-فنیل آلانین به L-تیروزین می‌شود. بارزترین تظاهرات بالینی این بیماری عقب ماندگی شدید ذهنی است. تشخیص سریع بیماری و شروع رژیم درمانی، در پیشگیری از عوارض غیر قابل برگشت مغزی اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۲،۱۳،۱۶). فراوانی بیماری PKU در سفید پوستان حدود ۱/۱۰۰۰۰ نفر در هر تولد زنده است (۱۱،۶)، در حالی که این فراوانی در جمعیت ایرانی ۱/۳۶۲۷ نفر در هر تولد زنده گزارش شده است (۱۰). ژن کد کننده آنزیم PAH دارای ۱۳ اگزون و به طول تقریبی Kbp ۹۰ روی بازوی بلند کروموزوم ۱۲ قرار دارد و تولید یک رونوشت به طول ۲/۵ کیلو باز می‌کند (۲). مطالعاتی که روی ساختار سه بعدی آنزیم PAH انجام شده، نشان می‌دهد که این آنزیم شامل چهار زنجیره منومر است. هر منومر دارای سه قلمرو ساختاری است: قلمرو تنظیمی در انتهای آمین (اسید آمینه‌های شماره ۱۴۲-۱)، قلمرو کاتالیتیکی (اسید آمینه‌های شماره ۴۱۰-۱۴۳) و قلمرو تترامریزاسیون در انتهای کربوکسیل (اسید آمینه‌های شماره ۴۵۲-۴۱۱) (۱۲).

ژن *PAH* بسیار هتروژن می‌باشد به طوری که تا به حال بیش از ۵۲۰ جهش مختلف در این ژن گزارش شده است. در بسیاری از جمعیت‌های مطالعه شده، ۲۰ و یا حتی بیشتر، جهش‌های مرتبط با بیماری PKU شناسایی شده است که فراوانی و پراکنش این جهش‌ها در هر جمعیت متمایز از جمعیت دیگری است. علاوه بر این، در هر جمعیتی چند جهش با فراوانی بسیار بالا دیده می‌شود (۳).

این مطالعه گزارشی است از شناسایی جهشی جدید در ژن *PAH*در دو خانواده ایرانی که در جریان تعیین طیف جهش‌ها ی بیماری PKU در جمعیت ایرانی شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

هر دو بیمار مورد مطالعه به علت عقب ماندگی ذهنی در مراکز بهزیستی نگهداری می‌شوند.

الف- گزارش بالینی

بیمار اول، پسری ۲۰ ساله با ضریب هوشی کمتر از ۵۵ بود. میزان فنیل آلانین در سرم بیش از μM ۱۲۰۰ بود و به مدت ۲ سال از شیر مادر تغذیه کرده است. والدین بیمار غیر خویشاوند، اهل تبریز و دارای یک فرزند PKU دیگر نیز می‌باشند.

بیمار دوم، پسری ۲۳ ساله با ضریب هوشی کمتر از ۵۵ که به مدت دو سال از شیر مادر تغذیه کرده است و میزان فنیل آلانین در سرم بیش از μM ۱۲۰۰ بود. والدین بیمار خویشاوند و اهل سراب، دارای سه فرزند مبتلا به بیماری PKU هستند.

ب- آنالیز ژنتیکی آلل‌های *PAH*

پس از مشاوره با خانواده بیماران و اخذ رضایت نامه، ۵ سی سی خون در لوله‌های حاوی EDTA از بیماران و والدین آنها گرفته شد. استخراج DNA از خون محیطی براساس روش نمک اشباع صورت گرفت (۱۴). جهت تعیین جهش در بیماران، ابتدا ۱۰موتاسیون نقطه‌ای IVS10-11g>a(DdeI)، R261Q(HinfI) (DdeI)، L333F(BanII)، 364LdelG(HindIII) IVS11+1g>c(DdeI)، S67P(XbaI) R408W(StyI)، R261X و R408Q(HaeIII) به روش PCR-RFLP برای هر بیمار بررسی شد. آنزیم مربوط به هر جهش در پرانتز نوشته شده است (۱۴).

در مرحله بعد، از روش SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) برای بیمارانی که فاقد این جهش‌ها بودند یا

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.2.5]

برای یکی از این جهش‌ها هتروزیگوت بودند، استفاده شد. جهت انجام آزمایش SSCP، تمام اگزون‌های ژن *PAH* هر یک از نمونه-های مورد بررسی تکثیر یافتند. پس از واسرشت کردن محصولات PCR بوسیله گرما، روی ژل آکریلامید ۱۲ درصد غیر دناتوره کننده با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت در دمای ۸ درجه سانتیگراد بارگذاری و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت نمونه‌هایی که دارای الگوی باندی متفاوت با نرمال بودند تعیین توالی شدند.

جهت تعیین هاپلوتیپ در این دو خانواده، سه مارکر پلی مورف در ژن *PAH* شامل STR در اینترون سوم، XmnI-RFLP در اینترون هشت و مینی ساتلیت چند آللی VNTR، در اینترون ۱۳ با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت (۵). میزان اطلاع رسانی (PIC) حاصل از مجموع این سه مارکر در حدود ۹۵ درصد می‌باشد (۴، ۸).

نتایج و بحث

فنیل کتونوری شایع‌ترین اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه و یکی از مهمترین علل شناخته شده عقب ماندگی ذهنی است. این مطالعه، گزارشی از شناسایی موتاسیون جدید در ژن *PAH* در دو بیمار مبتلا به PKU کلاسیک می‌باشد. هر دو بیمار به علت عقب ماندگی ذهنی در مراکز بهزیستی نگهداری می‌شوند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فنیل آلانین سرم در زمان تشخیص بیماری قبل از درمان، نشان می‌دهد که هر دو بیمار مبتلا به PKU کلاسیک هستند. ضریب هوشی بیماران (IQ) به عنوان یکی از فنوتیپ‌های مبتلایان به PKU در جدول۱ ارائه شده است. در جدول‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب سایر فنوتیپ‌های متاثر از بیماری PKU اعم از خصوصیات ظاهری، اختلالات حرکتی و اجتماعی در دو بیمار مورد مطالعه، ارائه شده است. در بررسی-های ژنتیکی ابتدا هر دو بیمار برای ۱۰ جهش شایع ژن *PAH* مورد بررسی قرار گرفتند. هیچ یک از دو بیمار مورد مطالعه جهش‌های فوق را نداشتند. این جهش‌ها بیش از نیمی از جهش-های جمعیت ایرانی را در برمی‌گیرد (۱).

نتایج حاصل از آزمایش SSCP بر روی هر دو بیمار حاکی از وجود تفاوت در الگوی حرکت قطعات DNA با فرد نرمال در اگزون شماره ۷ ژن *PAH* بود. لذا این اگزون در هر دو بیمار تعیین توالی شد. در نتیجه تعیین توالی، هر دو بیمار دارای جهش G247D (c.740 G>A) به صورت هموزیگوت در اگزون ۷ بودند که باعث جایگزینی اسید آمینه آسپارتیک اسید به جای گلایسین می‌گردد (شکل ۱). دیگر فرزندان بیمار در هر دو خانواده دارای این تغییر نوکلئوتیدی به صورت هموزیگوت و والدین به صورت هتروزیگوت بودند. باتوجه به اینکه در این جهش، جایگاه برش برای آنزیم *Hae*III از بین می‌رود، وجود جهش فوق با روش PCR-RFLP و برش با آنزیم *Hae*III تایید شد.

به منظور اطمینان از پلی مورفیسم نبودن این تغییر نوکلئوتیدی، ۱۳ اگزون و نواحی مرزی اینترون‌های ژن *PAH* در هر دو بیمار تعیین توالی شد و تغییر نوکلئوتیدی دیگری در این دو بیمار مشاهده نشد. در ضمن اگزون شماره هفت ۵۰ فرد نرمال که موردی از بیماری PKU در شجره خانوادگی آنها مشاهده نمی‌شد، از طریق PCR-RFLP با آنزیم *Hae*III مورد بررسی قرار گرفت که در هیچیک از این افراد تغییرنوکلئوتیدی مذکور دیده نشد.

در نبود تست‌های کارکردی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در حضور تغییر نوکلئوتیدی جدید، از روش‌های دیگری که مشابه بررسی-های فوق باشد یعنی حفظ شدگی فیلوژنتیکی توالی‌های اسید آمینه‌ای، تاثیر جهش برساختار بیوشیمیایی و همچنین فنوتیپ کلینیکی بیماران استفاده می‌شود. به این منظور جهت تعیین میزان حفاظت فیلوژنتیکی توالی اسیدهای آمینه، اسید آمینه شماره ۲۴۷ و چند اسید آمینه قبل و بعد از آن در رده‌های مختلف موجودات بررسی شد و مشاهده گردید که این اسید آمینه در رده‌های مختلف موجودات زنده ثابت و بدون تغییر بوده است که خود موید حفظ شدگی بسیار بالای آن می‌باشد (جدول ۶). از لحاظ ساختار پروتئنی نیز اسید آمینه ۲۴۷ در قلمرو کاتالیتیکی آنزیم *PAH* قرار دارد که حفاظت بالای آن قابل پیش بینی می‌باشد.

در نتیجه این جهش – در موقعیت ۲۴۷ – اسید آمینه آسپارتیک اسید (با بار منفی) جایگزین گلایسین (با بارخنثی) شده است. تغییر بار الکتریکی احتمالا مانع اتصال BH4 – به عنوان کوفاکتور– به جایگاه فعال آنزیم می‌شود (۵،۹).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.2.5]

در همین ریشه اسید آمینه‌ای تغییرات نوکلئوتیدی دیگری در جمعیت چین گزارش شده است که شامل: G247R، G247V و G247S می‌باشد. این جهش‌ها نیز منجر به بروز فنوتیپ PKU کلاسیک می‌شوند (۹).

هموزیگوسیتی برای جهش‌های نادر را می‌توان با ۲ مکانیسم ازدواج‌های فامیلی و همچنین اثر بنیانگذار (Founder effect) در جمعیت‌های چند نژادی در ایران توجیه کرد. به منظور پی بردن به علت هموزیگوسیتی دراین جهش جدید، الگوی هاپلوتیپ بیماران را تعیین نمودیم. هر دو بیمار دارای هاپلوتیپ یکسان بودند (جدول ۵). با توجه به اینکه هر دو بیمار متعلق به استان آذربایجان بوده و هاپلوتیپ مشابه داشتند، احتمالا اثر بنیانگذار در هموزیگوسیتی موثر می‌باشد.

با توجه به محل اختصاصی اسید آمینه ۲۴۷ در جایگاه فعال آنزیم، حفظ شدگی فیلوژنتیکی ریشه مذکور در رده‌های مختلف موجودات زنده و مطالعات جمعیتی انجام شده بر روی ۵۰ فرد نرمال از جمعیت ایرانی، می‌توان نتیجه گرفت که تغییر G247D یک جهش بیماریزا می‌باشد که می‌تواند سبب ایجاد فرم کلاسیک بیماری PKU شود.

تشکر و قدردانی:
این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری در قالب انجام طرح تحقیقاتی شماره ۳۰۹ انجام گرفته است.

جدول۱- ضریب هوشی و میزان فنیل آلانین سرم در دو بیمار مورد مطالعه

	ضریب هوشی(IQ)	میزان فنیل الانین در سرم
خانواده ۱	35<IQ<55	>20 mg/dl
خانواده ۲	<55	>20 mg/dl

جدول۲- مقایسه فنوتیپ بیماران

	دندان‌های با فاصله	فک برجسته	اگزما	میکروسفالی	رنگ چشم	رنگ مو	رنگ پوست
خانواده ۱	-	-	-	-	قهوه ای روشن	بور	بی رنگ
خانواده ۲	-	-	+	-	قهوه ای روشن	بور	بی رنگ

جدول۳- مقایسه اختلالات حرکتی دو بیمار

	راه رفتن	سفتی عضلانی	رعشه	حرکات پیچشی	بیش فعالی	حرکات غیر طبیعی
خانواده ۱	+	-	-	+	-	-
خانواده ۲	+	-	-	-	+	-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

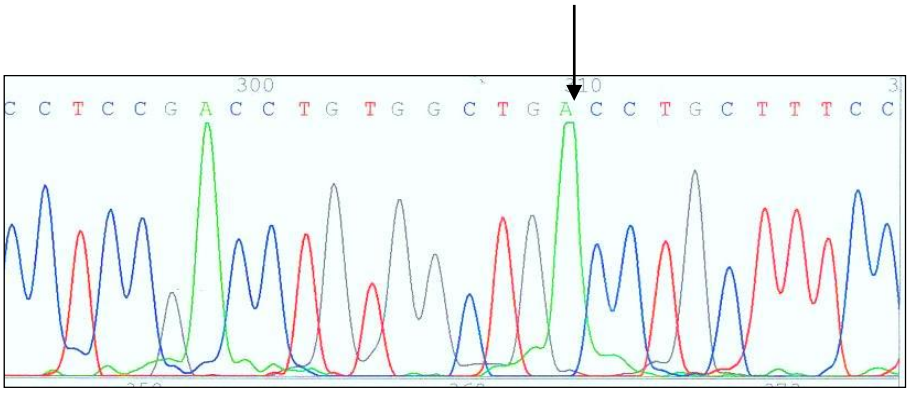
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.2.5]

جدول۴- مقایسه اختلالات اجتماعی دو بیمار

	تهوع	مصرف دارو	سابقه تشنج	اختیار ادرار ومدفوع	برقراری ارتباط اجتماعی	دیگر آزاری	خود آزاری	در خود فرورفتگی	تکلم
خانواده ۱	–	–	–	+	+	–	–	+	+
خانواده ۲	–	دیازپام	+	+	+	–	–	–	+

جدول۵- هاپلوتیپ ژن *PAH* در بیماران مورد مطالعه

	XmnI	STR	VNTR
خانواده اول	–/–	۲۴۲	۸/۸
خانواده دوم	–/–	۲۴۲	۸/۸



شکل۱- تغییر نوکلئوتیدی c.740 G>A (G247D) در اگزون شماره ۷ ژن *PAH* (آغازگر رفت)

		244	245	246	247	248	249
Human	PAH	P	V	A	G	L	L
RAT	PAH	P	V	A	G	L	L
D.Melanogaster	PAH	P	V	A	G	L	L
C.Elegance	PAH	P	V	A	G	L	L
Myotis Lucifugus	PAH	P	V	A	G	L	L

شکل۲- اسید آمینه‌های حفاظت شده در قلمرو کاتالیتیکی آنزیم PAH در موجودات مختلف

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.2.5]

منابع

۱- سید مهدی حسینی مزینانی و همکاران، بررسی موتاسیون های ژن *PAH* عامل بیماری PKU در جمعیت ایرانی. گزارش طرح تحقیقاتی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

2. Aulehla-Scholz C, Heilbronner H (2003) Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency.Hum Mutat.21(4):399-400.

3. Effat LK, Essawi ML, Abd El Hamid MS, Hawari N, Gad YZ (2008) Screening for six Mediterranean mutations in 90 Egyptian patients with phenylketonuria. Bratisl Lek Listy,109(1):17-9.

4. Eisensmith RC, Goltsov AA, Woo SL (1994) A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. Prenat Diagn. 14(12):1113-8.

5. Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, Straub M, Stevens RC (2003) Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. Pediatrics. 112(6 Pt 2):1557-65. Review.

6. Kádasi L, Poláková H, Feráková E, Hudecová S, Bohusová T, Szomolayová I, Strnová J, Hruskovic I, Moschonas NK, Ferák V (1995) PKU in Slovakia: mutation screening and haplotype analysis.Hum Genet,95(1):112-4.

7. KaufmanS. Phenylketonuria: Biochemical mechanisms. Adv Neurochem. 1976; 2:1

8. Hosseini-Mazinani, S.M, Koochmeshgi, J. Khazaee-Kohpar, Z. Hosein-pur-Nobari, N. Seifati, S.M. 2008, Carrier detection of phenylketonuria in Iranian families by variable number tandem repeat polymorphism analysis. Eastern Mediterranean Health Journal, 14(8):1445-1451

9. Kim SW, Jung J, Oh HJ, Kim J, Lee KS, Lee DH, Park C, Kimm K, Koo SK, Jung SC (2006) Structural and functional analyses of mutations of the human phenylalanine hydroxylase gene. Clin Chim Acta. 365(1-2):279-87. Epub 2005 Oct 25.

10. Koochmeshgi J, Bagheri A, Hosseini-Mazinani SM (2002) Incidence of phenylketonuria in Iran estimated from consanguineous marriages. Inherit Metab Dis. 25(1):80-1.

11. Kozák L, Kuhrová V, Blazková M, Romano V, Fajkusová L, Dvoráková D, Pijácková A (1995) Phenylketonuria mutations and their relation to RFLP haplotypes at the PAH locus in Czech PKU families.Hum Genet,96(4):472-6.

12. Lee DH, Koo SK, Lee KS, Yeon YJ, Oh HJ, Kim SW, Lee SJ, Kim SS, Lee JE, Jo I, Jung SC (2004) The molecular basis of phenylketonuria in Koreans. J Hum Genet, 49(11):617-21. Epub 2004 Oct 16.

13. Lee YW, Lee DH, Kim ND, Lee ST, Ahn JY, Choi TY, Lee YK, Kim SH, Kim JW, Ki CS (2008) Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. Exp Mol Med; 40(5):533-40.

14. Luiz Carlos Santana da Silva,a,b Tiago Santos Carvalho,a,b Fernanda Britto da Silva,b Liana Morari,b ^AAngela Aguirres Fachel,b Ricardo Pires,b L_ılia Farret Refosco,b Robert J. Desnick,c Roberto Giugliani,a,b,d, and Maria Luiza Saraiva Pereiraa,b (2003) Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. Molecular Genetics and Metabolism, 79:17–24

15. Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Estivill X, Milà M (1999) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation.Hum Genet, 105(5):468-73.

16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.Nucleic Acids Res. 11;16 (3):1215.

Okano Y, Asada M, Kang Y, Nishi Y, Hase Y, Oura T, Isshiki G (1998) Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients.Hum Genet,103(5):613-8.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.2.5]