مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۹ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۶ صفحات ۱۴۲- ۱۳۹

گزارش مورد

گزارش جهش نادر Cd 25/26 (+T) ژن بتاگلوبین

دکتر عباسعلی حسینپورفیضی: استادیار هماتولوژی انکولوژی اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمدعلی حسینپورفیضی: استاد رادیوبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز: نویسنده رابط
E-Mail: info@eastp.ir
ناصر پولادی: کارشناس ارشد سلولی و مولکولی ،گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان
مهدی حقی: کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
پروین آذرفام: کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

دریافت: ۸۵/۶/۷، پذیرش: ۸۵/۱۱/۲

چکیده

بتا تالاسمی شامل گروه ناهمگونی از اختلالات تک ژنی می باشد که بافقدان زنجیره بتا گلوبین(β^o تالاسمی) یا کاهش آن (β^+ تالاسمی) مشخص می گردد. جهش هایی از نوع β^o تالاسمی موجب بروز شدید بیماری در افراد می گردند که نیاز به دریافت خون دارند. در این گزارش خانواده ای معرفی می شود که دارای جهش β^o تالاسمی Cd25/26(+T) بوده ولی نیازمند به دریافت خون نیستند. بررسی‌ها، مقدار هموگلوبین تقریبا نرمال (حدود۱۲/۷ g/dl- ۱۰/۴) و درصد بالایی از هموگلوبین جنینی ($HbF(\alpha_2\gamma_2)$ (حدود ۹۸٪) را در افراد هموزیگوت نشان می دهدکه برای اولین بار در مورد این جهش گزارش می شود.

کلید واژه ها: Cd25/26(+T) ، بتا تالاسمی، هموگلوبین

مقدمه

بتا تالاسمی شامل گروه ناهمگونی از اختلالات تک ژنی می باشد که بیشتر در اثر جهش در ژن بتا گلوبین ایجاد می شود. تاکنون بیش از۲۰۰ نوع جهش که اکثراً نقطه ای هستند در سر تا سر جهان گزارش شده است (۱)

برخی از این جهش ها موجب کاهش بیان ژن بتاگلوبین می گردد. مثلاً جهش در نوکلئوتید (A-C)28- که در ناحیه پروموتر ژن بتاگلوبین قرار دارد موجب کاهش اتصال فاکتورهای رو نویسی به این ناحیه شده و میزان RNA و در نتیجه مقدار زنجیره بتاگلوبین کاهش می یابد و یا جهش (G-C)IVSI-5 که موجب کاهش میزان پردازش های صحیح بر روی hnRNA و در نتیجه کاهش میزان mRNA صحیح و زنجیره بتاگلوبین می شود. این نوع جهش ها را β^+ تالاسمی می نامند که در این بیماران زنجیره بتاگلوبین کمتر تولید شده و علائم خفیفی ایجاد می کند. با توجه به نوع جهش و زمینه ژنتیکی افراد مختلف شدت بیماری متغیر است. مثلاً جهش هموزیگوت (A-G)29- در سیاه پوستان آمریکایی با علائم فنوتیپی ملایم یا بدون علائم ولی در بیماران چینی علائم بتا تالاسمی ماژور وابسته به دریافت خون را ظاهر می کند. بررسی ها نشان دهنده تغییراتی در پروموتر ژن گاما گلوبین در سیاه پوستان آمریکایی بود که موجب بیان بیشتر ژن گاماگلوبین و در نتیجه افزایش هموگلوبین جنینی ($HbF(\alpha_2\gamma_2)$ در این افراد شده و کاهش نسبی بتاگلوبین این افراد را جبران می نماید (۲).

تغییرات مختلفی در نواحی پروموتر ژن گاماگلوبین گزارش شده مثلاً تغییر در نوکلئوتید (C-T) 114- موجب افزایش بیان ژن گاما گلوبین می شود (۳).

تغییر (C-T) 158- نیز در ناحیه بالا دست ژن گاما گلوبین همراه با افزایش بیان گاما گلوبین است البته خود این تغییر عامل افزایش بیان ژن نیست بلکه الل حاوی (C-T) 158- احتمالا با تغییرات دیگری بر روی کروموزوم پیوسته است که آن تغییرات موجب تعدیل بیماری می گردند (۴). همچنین در حالتی که بتا تالاسمی با آلفا تالاسمی خفیف همراه باشد نسبت زنجیره آلفا به بتا در این افراد مناسب بوده و در نتیجه از علائم بیماری کاسته می شود. جهش های نوع β° حالت دیگری از جهش های بتا گلوبین می باشد که موجب می شود هیچ زنجیره بتا گلوبینی ساخته نشده و بیمار علائم شدیدی نشان دهد که نیاز مند در یافت خون می باشد. مثلا جهش Cd25/26(+T) که در آن یک تیمین بین کدون 26,25 اضافه شده موجب تغییر قالب خواندن در اگزون شماره یک می شود و کدون 26 تبدیل به کدون پایان (UGA) می گردد و در نتیجه هیچ زنجیره بتاگلوبین صحیحی ایجاد نشده (۵) و در الکترو فورز هموگلوبینی این افراد باند($HbA(\alpha_2 \beta_2$ مشاهده نمی گردد.

مواد وروش ها

مورد بیمار ۱۸ ساله ای می باشد که برای بار اول در سن ۳ سالگی به علت عفونت ادراری، مورد توجه سرویس پزشکی قرار می گیرد، و ضمن بررسی و درمان عفونت ادراری، بعلت آنمی هیپوکرومیک، میکروسیتیک و بزرگی طحال تحت بررسی های تکمیلی شامل الکتروفورز هموگلوبین، تشخیص β تالاسمی بینابینی داده می شود. بیمار به علت شروع تغییرات استخوانی، تحت ترانسفوزیونهای گاه به گاه از ۷ سالگی قرار می گیرد. در ضمن به علت بالا رفتن میزان Ferritin (در۱۶ سالگی ng/ml ۴۸۵۸) درمان Chelation آهن، با دیسفرال نیز در نظر گرفته می شود. بیمار وضعیت خانوادگی، شخصی و اجتماعی خوبی داشته و به غیر از تغییرات استخوانی خفیف صورت مشکلی ندارد. کلیه آزمایشات فعلی بعد از ۶ ماه از آخرین ترانسفوزیون خون انجام یافته اند. در۱۴ سالگی ، طحال برداری انجام می یابد و از آن به بعد نیاز به ترانسفوزیون نداشته است.

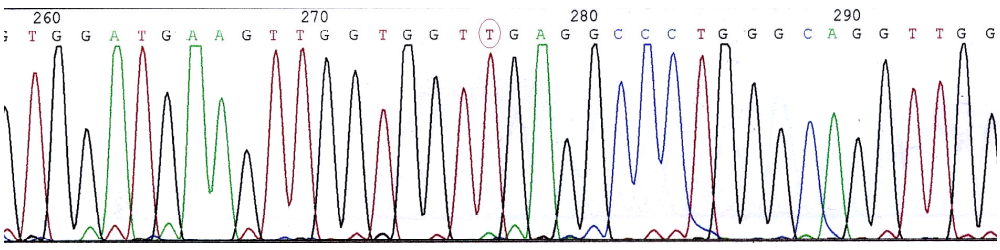
از تمام اعضاء خانواده به غیر از یکی از فرزندان بعلت عدم رضایت برای بررسی، نمونه‌گیری خون انجام گرفت و وجود جهش بر اساس روش PCR-SSCP در تمام اعضاء خانواده بررسی گردید. برای استخراج DNA از ۵ میلی لیتر خون دریافتی با روش پروتئیناز K، DNA استخراج ودر آب حل گردیدو ناحیه اگزون یک توسط PCR تکثیر شد سپس ۲/۵ میکرو لیتر از محصول PCR را همراه ۵ میکرو لیتر محلول بارگذاری SSCP در میکروتیوپ ریخته و در ترموسایکلر در دمای $^{\circ}C$ ۹۴ حدود ۱۰ دقیقه سپس درظرف پر از یخ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید۱۰٪ به مدت ۱۵ ساعت با ولتاژ V ۱۰۰ الکتروفورز و ژل با نیترات نقره رنگ آمیزی شد.برای تعیین توالی، ژن بتاگلوبین بیمار توسط روش PCR تکثیر و تعیین توالی گردید. میزان HbA، HbA_2 و HbF اعضاء خانواده نیز توسط روش HPLC در آزمایشگاه مرکزی استان انجام گرفت. بررسی ها در بهمن ۱۳۸۴ انجام گرفته است.

یافته ها

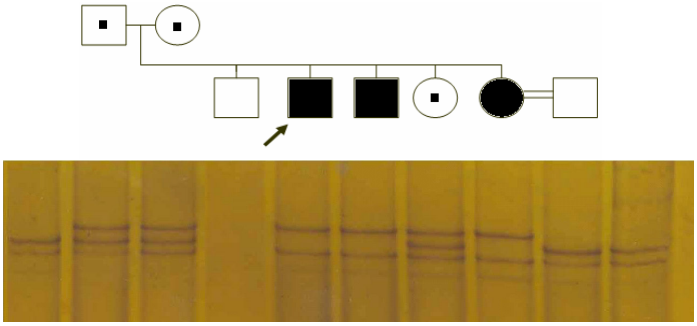
در این بررسی جهش جدید Cd25/26(+T) با روش توالی یابی مستقیم تشخیص داده شد (شکل۱). سپس با استفاده پرایمر های IVS1-5 نرمال وCommonC قطعهٔ حاوی جهش تکثیر والگوی SSCP آن با مقایسه فرد نرمال بدست آمد. با مراجعه به خانوادهٔ بیمار شجره نامه مربوطه رسم واعضای خانوادهٔ بیمار برای این جهش توسط تکنیک PCR-SSCP غربالگری گردید.

نتایج نشان داد الگوی SSCP فرد نرمال، افراد هموزیگوت بیمار و افراد هتروزیگوت، کاملا متفاوت و قابل تشخیص از هم هستند. پدر، مادر و یک خواهر، هتر وزیگوت و یک خواهر و یک برادر خانواده مانند پسر مبتلا، نسبت به جهش هموزیگوت بودند (شکل۲).

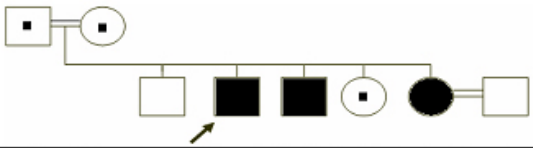
بررسی هماتولوژیکی مقدار هموگلوبین تقریبا نرمال (حدود 10.4-12.7g/dl) ودرصد بالایی از HbF (حدود 98٪) را در افراد هموزیگوت نشان می دهد (شکل۳).



شکل ۱: تعیین توالی ژن بتا گلوبین حاوی جهش Cd25/26 (+T)



شکل ۲: شجره نامه و نتایجSSCP افراد خانواده



Hemoglobin g/dl	12.9	11.6		10.4	10.9	11.6	12.7	17
HbA %	92.2	88.9		0	0	93.3	0	96.5
HbA_2 %	4.8	4.6		1.6	1.8	5.3	1.2	3
HbF %	3	6.5		98.4	98.2	1.4	98.8	0.5

شکل ۳: مقدار و درصد هموگلوبین هر یک از افراد خانواده

بحث

هر سال بیش از چهار میلیون کودک در جهان با اختلال ژنتیکی متولد می شوند که هموگلوبینوپاتی‌ها سهم عمده ای را به خود اختصاص داده اند. در حال حاضر ۵۰ درصد کشورهای دنیا دارای گروههایی بابیش از ۴درصد ناقل هموگلوبینوپاتی هستند وتالاسمی یکی از انواع این گونه اختلالات می باشد. برهمین اساس تخمین زده می شود در ایران حدود سه میلیون ناقل ژن تالاسمی در جامعه پراکنده باشند. درآذربایجان نیز مانند سایر مناطق کشور پس از گزارش جهش های شایع بتا تالاسمی بررسی جهش های نادر وناشناخته برای تشخیص قبل از تولد وپیشگیری از تولد فرزندان مبتلا بسیار ضروری به نظر رسید . لذا در بررسی جهش های نادر بتاتالاسمی در شمالغرب کشور وجود جهش نادر Cd 25/26(+T) با روش توالی یابی مستقیم در یک خانواده مشخص گردید.بررسی های مولکولی مختلفی در دنیا برای تشخیص جهش های ژن بتاگلوبین بکار می رود. مانند سایر کشورهای در حال توسعه روش های مولکولی مانند توالی یابی مستقیم مستلزم صرف هزینه وزمان بیشتری است لذا در این بررسی علاوه بر گزارش جهش جدید Cd 25/26(+T) در منطقه آذربایجان ،تکنیک سریع ومفید PCR-SSCP برای تشخیص جهش وغربالگری در خانواده بیمار مورد استفاده قرار گرفت(۶). نتایج نشان داد الگوی SSCP فرد نرمال ، بیمار هموزیگوت، والدین بعنوان ناقل کاملاً متفاوت وقابل تشخیص از هم هستند که این امر می تواند اهمیت این تکنیک سریع ومفید را در کاربرد های تشخیصی نشان دهد. جهش Cd 25/26 (+T); GGT GAG(Gly-Glu)→ GGT T GAG(Gly-Term)یک جهش نادرژن بتاگلوبین است . اضافه شدن یک باز تیمین بین کدون ۲۵و۲۶ موجب می شود که کدون ۲۶ تبدیل به کدون پایان و ختم زودرس پروتئین سازی در اگزون یک و موجب β° تالاسمی گردد. اولین گزارش این جهش در تونس همراه با الل HbS که میزان همو گلوبین در فرد مورد نظر ۷/۴ gr/dl و HbF ۱۴٪ که نیازمند به دریافت خون بود(۵). در خانواده‌ای که در این پژوهش بررسی شد میزان هموگلوبین بیمار مورد نظر در سه سالگی حدود ۹gr/dl بود که در سال ۱۳۶۷ به دلیل عفونت ادراری به مرکز آموزشی- درمانی کودکان تبریز مراجعه کرده بودو توسط CBC (HbF 98% , HbA 2%) شناسایی شد. با توجه به β° بودن این نوع جهش و داشتن بتا تالاسمی بینابینی در این بیمار، جهت بررسی بیشتر از تمام اعضاء خانواده به جز یکی از فرزندان خون دریافت شد. نتایج نشان داد دو فرزند دیگر همو زیگوت نسبت به جهش با فنوتیپ ظاهری سالم و بدون مراجعه قبلی به مراکز درمانی و بدون تشخیص بوده و نیز پدر و مادر و یک فرزند هترو زیگوت بودند که از طریق روش PCR-SSCPو مقایسه الگوی اعضاء خانواده با الگوی فرد نرمال و فرزند بیمار مشخص شد. آزمایشات هماتولوژیکی نشان می‌دهد مقدارهموگلوبین در فرزندان هموزیگوت نزدیک به حد پایین نرمال ۱۲ gr/dl می‌باشد و حتی یکی از دختر ها دارای مقدار

gr/dl ۱۲،۷هموگلوبین است (حد نرمال gr/dl ۱۸–۱۳،۵ برای مردان و gr/dl ۱۶–۱۲ برای زنان است)و 98.8% همو گلوبین را HbFتشکیل داده است که نبایستی در یک فرد بالغ بیشتر از ۲٪ کل همو گلوبین باشد. در حالیکه انتظار داریم این جهش، ایجاد تالاسمی شدیدβ° نماید. ولی بیماران ما فنوتیپ شدید بیماری را نشان نمی دهند، بطوریکه خود بیمار ، به طور اتفاقی و در بررسی عفونت ادراری تشخیص داده شده و دو نفر دیگر خانواده نیز تا موقع بررسی مشکلی کلینیکی نشان نداده اند.

وجود مقدار ودرصد بالایHbF در افراد مورد مطالعهٔ ما با جهش Cd 25/26 (+T) یک عامل تعدیل کنندهٔ بیماری می‌باشد. که درمورد جهش‌های دیگر نیز با مقدار و در صدهای مختلف HbF گزارش شده است(۷) ولی در مورد جهش Cd 25/26 (+T) ، این مقدار و درصد برای اولین بار گزارش می‌شود.

نتیجه گیری

جهش Cd25/26(+T) حالت بسیار نادری است که اولین بار در تونس گزارش شده و موجب β^{o} تالاسمی شدید می شود. با مقایسه این خانواده با خانوادهٔ تونسی، می‌توان به متفاوت بودن فنوتیپ یک جهش در افراد جمعیت‌های مختلف پی برد. بنابراین یک جهش می تواند در زمینه ژنتیکی متفاوت جمعیت‌ها، تفاوت فنو تیپی داشته باشد. حتی در بین فرزندان همو زیگوت این خانواده نیز می‌توان تفاوتهایی را مشاهده کرد. با توجه به اینکه این خانواده ساکن روستایی از آذربایجان شرقی هستند انتظار می رود در افراد فامیل و حتی فامیل دور دراین روستا جهش Cd25/26(+T) وجود داشته باشد.

References

1. Thein S L, Genetic modifiers of β- thalassemia. *Haematologica* 2005; **90**: 649-660
2. Kazazian HH. The thalassemia syndrome: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Seminars in Hematology*1990; **27**: 209-228.
3. Fucharoen S, Shimizu K, Fukumaki Y. A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the Gγ-globin in the Japanese HPFH: implication of factor binding in elevated fetal globin expression. *Nucleic Acids Research*1990; **18**(17)::5245-5253.
4. Labie D, Dunda-Belkhodja O , Rouabhi F, Pagnier J, Ragusa A, Nagel RL. The -158 Site 5' to the $^{G}\gamma$ Gene and $^{G}\gamma$ Expression .*Blood* 1985; **66**(6):1463-1465
5. Fattoum S, Guemira F, Oner C, Oner R , Li H W, Kutlar F, et al. Beta-thalassemia, HB S-beta-thalassemia and sickle cell anemia among Tunisians. *Hemoglobin* 1991;**15**:11-21.
6. Chin chang W, Viprakasit, V, Pung-Amritt, P,Tanphaichitr V S, Yenchitsomanus P. Molecular analysis of unknown β globin gene mutation using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with β-thalassemias and β-globin variants. *Clinical Biochemistry* 2005; **38**:987-996.
7. Stamatoyannopoulos G, Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental Hematology* 2005; **33**:259-271.