بررسی پلی‌مورفیسم‌های M470V و IVS8 polyT در بیماران فیبروزکیستی و افراد سالم در استان مازندران

وحید خلقی اسگوئی،[۱] محمدرضا اسماعیلی دوکی،[۲] رضا طبری‌پور،[۳] رقیه پورباقر،[۱] جواد توکلی بزاز،[۴] باقر لاریجانی،[۵] هاله اخوان نیاکی[۱*]

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر اطفال، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
۳- گروه بیولوژی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، تهران، ایران.
۴- گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۵- مرکز تحقیقات غدد درون ریز دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۳۴۶۵۰
E-mail: halehakhavan@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۹/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: فیبروزکیستی بیماری ژنتیکی با الگوی توارثی اتوزوم مغلوبی است که باعث درگیر شدن چندین ارگان می‌شود. به‌کارگیری مارکرهای پلی‌مورفیک در ردگیری ژنی می‌تواند راه حلی مناسب در زمینه تشخیص پیش از تولد ارایه کند هم‌چنین می‌تواند در بررسی همراهی احتمالی هاپلوتیپ‌ها با جهش‌های خاص استفاده گردد. این تحقیق به بررسی پلی‌مورفیسم‌های IVS8 polyT و M470V در افراد سالم و کودکان مبتلا به فیبروزکیستی پرداخته است. ***روش بررسی:*** ۴۹ فرد سالم و ۵۳ فرد مبتلا به فیبروز کیستی طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۹۰ برای IVS8 polyT با روش Reverse dot blot و برای M470V با روش PCR-RFLP بررسی شدند. ***یافته‌ها:*** بررسی IVS8 polyT نشان داد که T7 شایع‌ترین آلل در افراد سالم و بیمار با فراوانی ۸۲/۸٪ و ۷۷/۴٪ است. آلل T9 با ۲۱/۷٪ فراوانی در افراد بیمار از شیوع بیش‌تری در مقایسه با افراد نرمال با ۷/۶٪ فراوانی برخوردار است (P=۰/۰۰۵). ژنوتیپ T9/T9 با فراوانی ۱۵/۱٪، از شیوع بیش‌تری در افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم با ۲٪ فراوانی برخوردار است (P=۰/۰۳۲). بررسی M470V نشان داد که افراد هتروزیگوت (M/V) با ۴۹٪ و ۴۰/۴٪ شایع‌ترین ژنوتیپ در افراد سالم و بیمار می‌باشند. هاپلوتیپ M-T9 به ترتیب با فراوانی ۱۹/۱٪ و ۲/۴٪ در بیماران و افراد سالم همراهی بالایی با بیماری نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱). ***نتیجه‌گیری:*** بر اساس توزیع آللی و میزان هتروزیگوسیتی مربوط به M470V, IVS8 polyT این دو پلی‌مورفیسم می‌توانند در تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های ایرانی با سابقه ابتلا به فیبروزکیستی استفاده گردند.

کلمات کلیدی: فیبروزکیستی، M470V، IVS8 polyT، هاپلوتیپ، مازندران.

مقدمه

فیبروزکیستی Cystic Fibrosis (CF) بیماری ژنتیکی با الگوی توارث مغلوب اتوزومی است که باعث درگیر شدن چندین ارگان می‌شود به‌طوری که با عفونت‌های مزمن ریوی، ناکارایی دستگاه گوارشی و درگیری سیستم مرتبط با تعریق و سیستم تناسلی در جنس مذکر می‌گردد. معمولا علایم بیماری از دوران کودکی ظاهر می‌شود و با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه درمان تنها ۱۳٪ از افراد می‌توانند تا بعد از ۳۰ سالگی زنده بمانند.[۱] این بیماری شایع‌ترین بیماری مغلوب اتوزومی در نژاد سفید پوستان اروپایی با فراوانی یک در ۲۵۰۰ می‌باشد[۲] که البته در ایران شیوع کم‌تری داشته و از هر ۶۴۰۰ نفر یک نفر به این بیماری مبتلاست.[۳] بیماری CF با جهش در ژن (CFTR) که یک گیرنده غشایی کانال عبور کلر را کد می‌کند ایجاد می‌گردد.[۴-۶] این ژن با اندازه 230kb در بازوی بلند کروموزم هفت قرار دارد و دارای ۲۷ اگزون است و یک پروتیین ۱۴۸۰ آمینواسیدی را کد می‌کند.[۷و۸] پروتیین CFTR علاوه بر این‌که به‌عنوان کانال عبور کلر عمل می‌کند نقش تنظیمی بر روی کانال سدیمی و کانال‌های ATP نیز اعمال می‌کند.[۹-۱۱] تشخیص بیماری CF علاوه بر علایم بالینی تیپیک مانند عفونت‌های سیستم تنفسی و اختلالات سیستم گوارشی مانند ایلئوس مکونیومی به کمک تست عرق و بررسی جهش‌های شایع انجام می‌گیرد[۱۲] چرا که برخی بیماری‌ها با وجود جهش در جایگاه متفاوت می‌توانند علایم شبیه CF را ایجاد کنند و باعث اشتباه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

در تشخیص بیماری گردند.[۱۳] بیش از ۱۸۰۰ جهش برای این ژن شناسایی شده است[۱۴] که فراوانی آن‌ها در بین کشورها و نژادهای مختلف متفاوت می‌باشد.[۱۵] جهش F508del به‌عنوان شایع‌ترین جهش مولد بیماری به‌طور میانگین در ۷۰٪ بیماران دیده می‌شود.[۱۶] البته این آمار در کشورهای اروپایی، به‌عنوان مثال دانمارک با ۸۸٪، بالاتر بوده[۳] و با بررسی کشورهایی مثل لبنان با ۳۷/۵٪[۱۷] و ترکیه با ۲۵٪؛[۱۸] ایران با ۱۸٪ شاهد کاهش جهش F508del در خاورمیانه می‌باشیم.[۱۹] در کشوری‌هایی که جهش‌های ژن CFTR هتروژنی بالایی نشان می‌دهند روش‌های تشخیص مستقیم جهش مفید نیستند چرا که در ابتدا هیچ یک ۱۰۰٪ حساس نیستند. ژن CFTR، ژنی بزرگ با تعداد زیادی واریانت‌های غیر پاتوژن است[۶،۷] و در نتیجه عموماً تکنیک‌های تشخیصی مالتی پلکس و توالی‌یابی کل ژن با هدف تشخیص جهش از لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه نبوده یا کارایی کافی را ندارند. در ایران نیز به‌دلیل شرایط ذکر شده در بهترین حالت در یک مطالعه با صرف وقت و هزینه زیاد، در ۸۱/۹٪ افراد، نوع جهش تشخیص داده شده است.[۱۹] بررسی پیوستگی ژنی به کمک جایگاه‌های پلی‌مورفیک پیوسته به ژن CFTR، در تشخیص پیش از تولد یا شناسایی ناقلین در خانواده‌های درگیر بیماری، می‌تواند به‌عنوان جایگزین برای تکنیک‌های تشخیصی مستقیم مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند برای بررسی همراهی بین جهش‌های به‌خصوص ژن CFTR با هاپلوتیپ خاصی به‌کار روند یا برای بررسی منشأ و مسیر تکاملی جهش مورد بررسی قرار گیرند. جایگاه پلی‌مورفیک IVS8 polyT، توالی تکراری تیمیدین، در انتهای '۳ اینترون هشت ژن CFTR قرار دارد و دارای سه آلل شایع T5، T7، T9 است. این جایگاه در پردازش صحیح mRNA مربوطه موثر است به طوری که آلل T5 با حذف اگزون ۹ در طی پردازش همراهی دارد و معمولا منجر به اتمام ناقص رونویسی می‌گردد و از طرفی همین آلل در جنس مذکر می‌تواند منجر به ناباروری با نفوذ ناقص شود.[۲۰-۲۲] جایگاه پلی‌مورفیک M470V، در اگزون ۱۰ این ژن قرار دارد و دارای دو آلل M و V بوده که طی جهش نابه‌جا کد مربوط به متیونین به کد مربوط به والین تغییر می‌یابد. آلل V توسط آنزیم HphI قابل شناسایی و برش است.[۲۳] کانال یونی کد شده توسط آلل M در مقایسه با آلل V کندتر تشکیل می‌شود ولی قابلیت انتقال یونی کانال کد شده ۱/۷ برابر آلل V می‌باشد.[۲۴] در برخی افراد مذکر نابارور، همراهی آلل V با آلل T5 جایگاه IVS8 polyT دیده می‌شود.[۲۵] این تحقیق به بررسی پلی‌مورفیسم‌های IVS8 polyT و M470V در بین افراد سالم و کودکان مبتلا به فیبروز کیستی با هدف یافتن مارکرهای مناسب برای تشخیص پیش از تولد و بررسی هاپلوتیپ احتمالی که با جهش‌های شایع در منطقه همراهی دارد، پرداخته است.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ۴۹ فرد سالم بالغ بارور و۵۳ فرد مبتلا به فیبروز کیستی که طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۹۰ به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان امیرکلا وابسته به دانشگاه علوم پزشکی بابل ارجاع داده شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. افراد مبتلا براساس علایم بالینی و تست عرق مثبت انتخاب شدند.

استخراج DNA: DNA به روش Alkalin lysis از خون محیطی افراد مورد مطالعه استخراج گردید.

تکثیر DNA به روش PCR: توالی مربوط به پلی‌مورفیسم‌های M470V و IVS8 polyT با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) به کمک ترموسایکلر Creacon مدل TCY ساخت هلند تکثیر گردید. پرایمرهای مربوط به IVS8 polyT بیوتینیله بودند. تکثیر در حجم ۲۵µl با حضور ۲۰۰µM dNTPs، ۱/۵mM MgCl2، ۰/۲pM از هر یک از پرایمرهای چپ و راست، ۰/۵ واحد از Taq DNA Polymerase انجام گردید. شرایط تکثیر DNA در ترموسایکلر برای M470V، ۹۴ °C چهار دقیقه، سپس ۳۵ بار در ۹۴ °C سی ثانیه، ۵۵ °C سی ثانیه، ۷۲ °C سی ثانیه و در نهایت ۷۲ °C ده دقیقه بود. IVS8 polyT در شرایط ۹۴ °C سه دقیقه، سپس ۳۰ بار در ۹۴ °C یک دقیقه، ۵۵ °C یک دقیقه، ۷۲ °C چهل و پنج ثانیه و نهایتا ۷۲ °C پنج دقیقه تکثیر گردید.

برسی پلی‌مورفیسم M470V: برای مشخص شدن دو آلل M470V، ۱۵µl از محصول PCR در حضور ۱۰ واحد از آنزیم HphI در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید. نتیجه هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز ۲٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. طول محصول PCR به‌دست آمده ۴۹۱ جفت باز است که در صورت وجود آلل V پس از هضم آنزیمی به دو قطعه۳۰۰ و ۱۹۱ جفت بازی تبدیل می‌شود. آلل M توسط آنزیم HphI شناسایی نشده و در نتیجه پس از مواجهه با آن طول محصول PCR هم‌چنان ۴۹۱ جفت باز باقی می‌ماند. شکل ۱

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

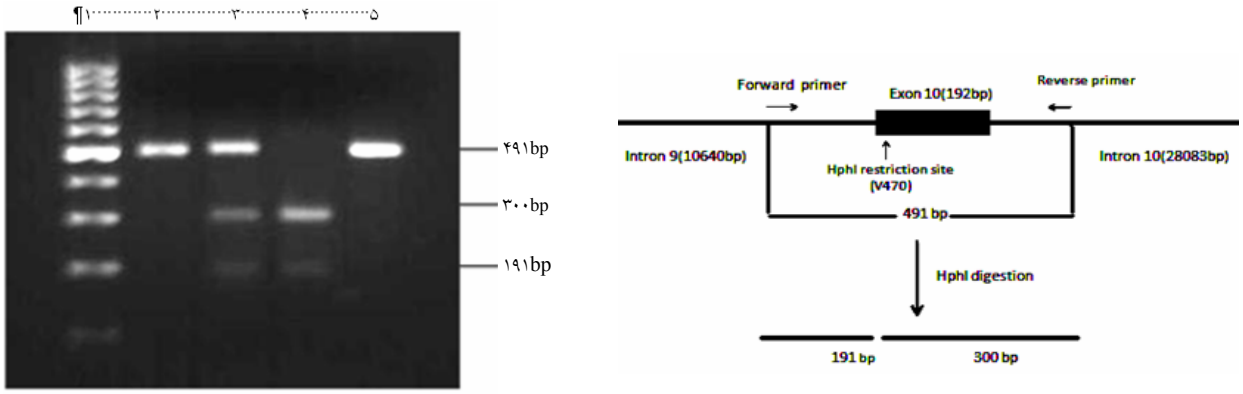
تصویر شماتیک ناحیه تکثیر شده و قطعات مورد انتظار پس از اثر آنزیم محدود کننده و نتایج به‌دست آمده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ را نشان می‌دهد.

بررسی IVS8 polyT با روش Reverse Dot Blot: برای این منظور محصول بیوتینیله PCR جهت دورگه‌گیری با پروب‌های مخصوص توالی‌های تکرارهای T9, T7, T5 (جدول ۲) که بر روی نوارهای Biodyne C قرار داده شده‌اند استفاده شد. بعد از دورگیری استرپتاویدین متصل به آنزیم پراکسیداز به واکنش اضافه گردید. چنان‌چه دورگه‌گیری انجام شده باشد واکنش شیمیایی رنگ‌زا در حضور تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه که با تشکیل لکه آبی رنگ همراه است قابل مشاهده است.[۲۶]

یافته‌ها

بررسی ژنوتیپ IVS8 polyT: مطالعه فراوانی آلل‌های T5 و T7 و T9 و انواع ژنوتیپ‌ها در افراد سالم و بیمار نشان داد که تکرار T7 به ترتیب با ۸۶/۷ و ۷۷/۴ درصد بیش‌ترین فراوانی را در بین افراد سالم و بیمار دارد و آلل T5 با ۶/۱٪ و ۰/۹٪ به‌ترتیب در افراد سالم و بیمار کم‌ترین فراوانی را به خود اختصاص داده است و آلل T9 با ۲۱/۷٪ فراوانی در افراد بیمار از شیوع بیش‌تری در مقایسه با افراد نرمال با ۷/۶٪ فراوانی برخوردار است که این تفاوت معنی‌دار است (P=۰/۰۰۵). ژنوتیپ T7/T7 با فراوانی ۶۹/۸ و ۷۵/۵ درصد به ترتیب بیش‌ترین شیوع را در افراد سالم و بیمار به خود اختصاص داده است و ژنوتیپ T9/T9 با فراوانی ۱۵/۱٪، از شیوع بیش‌تری در افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم با ۲٪ فراوانی برخوردار است. که این تفاوت نیز معنی‌دار است (P=۰/۰۳۲). فراوانی افراد هتروزیگوت (ژنوتیپ‌های T7/T9 یا T7/T5)، ۲۴/۲٪ و ۱۵/۱٪ به‌ترتیب برای افراد سالم و بیمار می‌باشد.

بررسی ژنوتیپ M470V: فراوانی آللی و ژنوتیپی مربوطه در افراد مورد مطالعه نشان داد که در افراد بیمار آلل M با ۵۶/۷٪ فراوانی شیوع بیش‌تری نسبت به آلل V با ۴۳/۳٪ فراوانی دارد. در حالی که در افراد سالم آلل V با فراوانی ۵۵/۲٪ نسبت به آلل M با ۴۴/۸٪ فراوانی، شایع‌تر است. ژنوتیپ M/V با ۴۹٪ و ۴۰/۴٪ بیش‌ترین فراوانی را به‌ترتیب در افراد سالم و بیمار به خود اختصاص داده است. ژنوتیپ‌های M/M با ۳۶٪ و V/V با ۲۷/۵٪ فراوانی در افراد بیمار وجود داشتند. فراوانی این ژنوتیپ‌ها در افراد سالم به ترتیب ۲۰/۴٪ (M/M) و ۳۰/۶٪ (V/V) است. بررسی IVS8 polyT در افراد با ژنوتیپ V/V، نشان از همراهی ۸۶/۶٪ این ژنوتیپ با T7/T7، برای افراد سالم و ۱۰۰٪ برای افراد بیمار دارد و در بیماران CF ۱۰۰٪ افراد T9/T9 دارای ژنوتیپ M/M بودند.



شکل- ۱: بررسی پلی‌مورفیسم M470V با استفاده از روش PCR/RFLP

a تصویر شماتیک مربوط به جایگاه تکثیر شده اطراف اگزون ۱۰ ژن CFTR برای بررسی پلی‌مورفیسم M470V با استفاده از آنزیم HphI

B نتایج به‌دست آمده پس از اثر آنزیم HphI بر روی محصول PCR. ستون ۱ مربوط به 100bp size marker است. ستون ۲ و ۳ و ۴ به‌ترتیب مربوط به افراد دارای ژنوتیپ M/M و M/V و V/V می‌باشد. ستون ۵: محصول PCR قبل از اثر آنزیم محدود کننده.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

جدول- ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی پلی‌مورفیسم M470V و IVS8 polyT در ژن CFTR

Locus	Primer	Sequence	PCR product
M470V (Exon 10)	F	5'- GAAACACCAAAGATGATA-3'	۴۹۱bp
	R	5'-GGAAACACCAATGATATT-3'	
IVS8 polyT (Intron 8)	F	5′- CATAAAACAAGCATCTATTGAAAAT -3′	۴۱۳bp
	R	5′- CACTACACCCATACATTCTCCT -3	

جدول- ۲: توالی پروب‌های مورد استفاده جهت بررسی تکرارهای IVS8 polyT در اینترون ۸ ژن CFTR

IVS8-5T	5′- GTGTGTGTTTTTAACAGG -3′
IVS8-7T	5′- TGTGTGTTTTTTTAACAGG -3′
IVS8-9T	5′- TGTGTGTTTTTTTTTAACAG -3′

جدول- ۳: فراوانی هاپلوتیپ‌های IVS8 polyT - M470V در افراد سالم و بیماران مبتلا به فیبروز کیستی

هاپلوتیپ	M-T7	V-T7	M-T9	V-T9	M-T5	V-T5	مجموع
افراد سالم	۳۴(٪۴۱/۵)	۴۳(٪۵۲/۵)	۲(٪۲/۴)	۱(٪۱/۲)	٪۰	۲(٪۲/۴)	۸۲(٪۱۰۰)
افراد بیمار	۳۶(٪۳۸/۳)	۴۰(٪۴۲/۶)	۱۸(٪۱۹/۱)	٪۰	٪۰	٪۰	۹۴(٪۱۰۰)

در هشت فرد سالم و شش بیمار CF به‌دلیل این‌که افراد برای هر دو مارکر هتروزیگوت بودند هاپلوتیپ مربوطه مشخص نشد.

هاپلوتیپ‌های M470V –IVS8 polyT: با بررسی دو پلی‌مورفیسم IVS8 polyT و M470V در بین افراد سالم و بیماران CF، پنج هاپلوتیپ برای افراد سالم و سه هاپلوتیپ برای بیماران CF مشخص گردید. (جدول ۳) هاپلوتیپ V-T7، به‌ترتیب با ٪۵۲/۴ و ٪۴۲/۶، بیش‌ترین فراوانی را در بین افراد سالم و بیمار نشان داد. مقایسه فراوانی هاپلوتیپ M-T9 در بیماران CF با افراد سالم نشان داد که این هاپلوتیپ به ترتیب با فراوانی ٪۱۹/۱ و ٪۲/۴ حدود هشت برابر فراوانی بیش‌تری در افراد CF دارد که این تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). محاسبه Odds ratio برای هاپلوتیپ‌های M-T9 و M-T7 و V-T7 نشان می‌دهد که این شاخص به‌ترتیب برابر ۹/۴ و ۰/۸ و ۰/۶ می‌باشد. هاپلوتیپ‌های V-T5 و M-T5 و V-T9 در افراد سالم نادر و در بیماران CF مشاهده نشد.

بحث

در این مطالعه ۴۹ فرد سالم و ۵۳ بیمار مبتلا به فیبروز کیستی ساکن استان مازندران، برای دو پلی‌مورفیسم IVS8 polyT و M470V مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعه پلی‌مورفیسم IVS8 polyT که با سه آلل شایع T5, T7, T9 گزارش شده نشان داد که آلل T7 بیش‌ترین فراوانی را در بین افراد سالم و بیمار (به‌ترتیب ٪۸۶/۷ و ٪۷۷/۴) دارد و آلل T5 کم‌ترین فراوانی را در افراد بیمار و سالم (به‌ترتیب ٪۶/۱ و ٪۰/۹) نشان می‌دهد. آلل T9 فراوانی بیش‌تری در بین بیماران CF (٪۲۱/۷) در مقایسه با افراد سالم (٪۷/۱) دارد. در مطالعات مشابه در جمعیت‌های اروپایی و آسیایی آلل T7 بیش‌ترین فراوانی را در افراد سالم نشان می‌دهد اما در بیماران CF، T9، آلل شایع در سفیدپوستان اروپایی می‌باشد در بیماران هندی آلل T7 همانند جمعیت ایرانی حاضر بیش‌ترین فراوانی را دارد.[۲۷و۲۸] این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به تنوع و منشأ متفاوت جهش‌های شایع در شبه قاره هند و T7/T7 با ٪۷۵/۵ و ٪۶۹/۸ بیش‌ترین فراوانی را به ترتیب در بین افراد سالم و بیمار دارا است. فراوانی افراد هتروزیگوت (T7/T9 یا T7/T5) به‌ترتیب ٪۲۲/۴ و ٪۱۵/۱ در افراد سالم و بیمار می‌باشد.

بررسی پلی‌مورفیسم M470V نشان می‌دهد که در افراد سالم و بیمار شیوع هر یک از آلل‌های M و V حدود ٪۵۰ می‌باشد که این وضعیت نشان‌دهنده پلی‌مورفیسم بالای این آلل‌ها در هر دو گروه است. افراد هتروزیگوت (M/V) با فراوانی ٪۴۹ و ٪۴۰/۴ به‌ترتیب در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

افراد سالم و بیمار مشاهده شدند. که این تفاوت‌ها معنی‌دار نمی‌باشد اما میزان بالای هتروزیگوتی در افراد سالم و بیمار اجازه می‌دهد تا بتوان از این پلی‌مورفیسم به عنوان یک مارکر مناسب برای دنبال کردن آلل‌های سالم یا جهش یافته در خانواده‌های درگیر این بیماری استفاده نمود. مطالعات مشابه در سفیدپوستان اروپایی نشان از همراهی اکثر آلل‌های پاتوژن CFTR با آلل M دارد.[۲۹و۳۰] با بررسی دو پلی‌مورفیسم IVS8 polyT و M470V در بین افراد سالم و بیماران CF، پنج هاپلوتیپ برای افراد سالم و سه هاپلوتیپ برای بیماران CF مشخص گردید. هاپلوتیپ V-T7، به‌ترتیب با ۵۲/۴٪ و ۴۲/۶٪، شایع‌ترین هاپلوتیپ در این دو گروه است. فراوانی هشت برابری هاپلوتیپ M-T9 در بیماران CF نسبت به افراد سالم و Odds ratio: ۹/۴ نشان از همراهی بالای M-T9 با جهش‌های پاتوژن CFTR دارد لذا به نظر می‌رسد که هاپلوتیپ M -T9 می‌تواند در روند تشخیص بالینی افراد CF که جهشی برای آن‌ها شناسایی نشده است موثر باشد. تاکنون بیش از ۱۸۰۰ جهش بیماری‌زا در بیماران CF شناسایی شده است[۱۴] و در کشور ما نیز مطالعات قبلی نشان از هتروژنی بالای آلل‌های پاتوژن آلل‌های پاتوژن CFTR دارد به‌صورتی که در کل از بررسی حدود ۲۰۰ بیمار، ۵۰ جهش بیمارزا شناسایی شد که تنها ۱۸٪ از جهش‌ها، مربوط به F508del به‌عنوان شایع‌ترین جهش بود و سایر جهش‌ها اکثرا فراوانی کم‌تر از ۲٪ را نشان دادند.[۳۱و۱۹و۳] لذا تشخیص مولکولی جهش به‌صورت مستقیم با هدف تشخیص پیش از تولد افراد مبتلا و شناسایی افراد ناقل در خانواده‌هایی که سابقه بیماری وجود دارد، از کارایی لازم برخوردار نیست. هم‌چنین با توجه به بزرگی ژن CFTR با ۲۷ اگزون[۷و۸] و وجود پلی‌مورفیسم‌های متعدد غیر پاتوژن در آن، بررسی کل ژن با روش‌های معمول، امری وقت‌گیر و هزینه بر می‌باشد. برای رفع این مشکل مارکرهای مولکولی شناخته شده برای ژن CFTR می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای ردیابی آلل سالم و جهش یافته در خانواده‌های با سابقه بیماری با هدف تشخیص پیش از تولد یا شناسایی ناقلین مورد استفاده قرار گیرد. بررسی هم‌زمان چندین مارکر می‌تواند به افزایش قدرت تشخیص مطالعات پیوستگی در جهت شناسایی افراد ناقل و تشخیص پیش از تولد کمک نماید.[۳۲] بررسی پلی‌مورفیسم M470V و IVS8 polyT در این مطالعه نشان داد که مارکر M470V با هتروزیگوسیتی ۴۹٪ و ۴۰/۴٪ به ترتیب در افراد سالم و بیمار و مارکر IVS8 polyT با هتروزیگوسیتی ۲۲/۵٪ و ۳۰٪ به ترتیب در افراد سالم و بیمار، می‌توانند به‌عنوان مارکرهای مناسبی برای ردیابی آلل سالم و جهش یافته جهت تشخیص پیش از تولد در جمعیت ایرانی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۸۹ و با کد ۱۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بابل اجرا شده است. نویسندگان از تمامی افراد شرکت‌کننده در این مطالعه نهایت قدردانی را دارند.

References

1. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Hauser D, Larry Jameson J, Loscalzo J, editor. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2008. p. 1632-5.
2. Moutou C, Gardes N, Viville S. Multiplex PCR combining deltaF508 mutation and intragenic microsatellites of the CFTR gene for pre-implantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2002;10(4):231-8.
3. Elahi E, Khodadad A, Kupershmidt I, Ghasemi F, Alinasab B, Naghizadeh R, et al. A haplotype framework for cystic fibrosis mutations in Iran. *J Mol Diagn* 2006;8(1):119-27.
4. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245(4922):1073-80.
5. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245(4922):1066-73. Erratum in: *Science* 1989;245(4925):1437.
6. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245(4922):1059-65.
7. McCarthy VA, Harris A. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol* 2005;40(1):1-8.
8. Akabas MH. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 2000;275(6):3729-32.
9. Izumikawa K, Tomiyama Y, Ishimoto H, Sakamoto N, Imamura Y, Seki M, et al. Unique mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene of three cases of cystic fibrosis in Nagasaki, Japan. *Intern Med* 2009;48(15):1327-31.
10. Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* 1994;269(32):20584-91.
11. Reddy MM, Quinton PM. Functional interaction of CFTR and ENaC in sweat glands. *Pflugers Arch* 2003;445(4):499-503.
12. Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, et al. Clinical practice and genetic counseling for

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med* 2008;10(12):851-68.
13. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2002;347(6):401-7.
14. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Database. [online] 2011 Apr 25 [cited 2012 Jan 12]; Available from: URL:http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html
15. Repetto GM, Puga AR, Delgado I. XV-2c and KM.19 haplotype analysis in Chilean patients with cystic fibrosis and unknown CFTR gene mutations. *Biol Res* 2007;40(2):223-9.
16. Deriy LV, Gomez EA, Zhang G, Beacham DW, Hopson JA, Gallan AJ, et al. Disease-causing mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determine the functional responses of alveolar macrophages. *J Biol Chem* 2009;284(51):35926-38.
17. Desgeorges M, Mégarbané A, Guittard C, Carles S, Loiselet J, Demaille J, et al. Cystic fibrosis in Lebanon: distribution of CFTR mutations among Arab communities. *Hum Genet* 1997;100(2):279-83.
18. Tuncer O, Julian Z, Ozlem T, Nalan G. Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Turkish cystic fibrosis Patients. *Hum Biol* 2001;73(2):191-203.
19. Alibakhshi R, Kianishirazi R, Cassiman JJ, Zamani M, Cuppens H. Analysis of the CFTR gene in Iranian cystic fibrosis patients: identification of eight novel mutations. *J Cyst Fibros* 2008;7(2):102-9.
20. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332(22):1475-80.
21. Radpour R, Gilani MA, Gourabi H, Dizaj AV, Mollamohamadi S. Molecular analysis of the IVS8-T splice variant 5T and M470V exon 10 missense polymorphism in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 2006;12(7):469-73.
22. Radpour R, Gourabi H, Gilani MA, Dizaj AV. Molecular study of (TG)m(T)n polymorphisms in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Androl* 2007;28(4):541-7.
23. Huang Q, Ding W, Wei MX. Comparative analysis of common CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in a healthy Chinese population. *World J Gastroenterol* 2008;14(12):1925-30.
24. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998;101(2):487-96.
25. Stuppia L, Antonucci I, Binni F, Brandi A, Grifone N, Colosimo A, et al. Screening of mutations in the CFTR gene in 1195 couples entering assisted reproduction technique programs. *Eur J Hum Genet* 2005;13(8):959-64.
26. Akhavan-Niaki H, Tabaripour R, Esmaeeli Douki M, Azizi M, Tavakoli J, Larijani B. Poly T polymorphism consideration in normal individuals and cystic fibrosis patients in Mazandaran province, Iran. *TUMJ* 2010;68(1):19-23.
27. Ashavaid TF, Kondkar AA, Dherai AJ, Raghavan R, Udani SV, Udwadia ZF, et al. Application of multiplex ARMS and SSCP/HD analysis in molecular diagnosis of cystic fibrosis in Indian patients. *Mol Diagn* 2005;9(2):59-66.
28. Huber K, Mirkovic B, Nersesian R, Myers A, Saiki R, Bauer K. Survey of CF mutations in the clinical laboratory. *BMC Clin Pathol* 2002;2(1):4.
29. Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetis M. Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet* 2003;63(5):400-9.
30. Ciminelli BM, Bonizzato A, Bombieri C, Pompei F, Gabaldo M, Ciccacci C, et al. Highly preferential association of NonF508del CF mutations with the M470 allele. *J Cyst Fibros* 2007;6(1):15-22.
31. Jalalirad M, Houshmand M, Mirfakhraie R, Goharbari MH, Mirzajani F. First study of CF mutations in the CFTR gene of Iranian patients: detection of DeltaF508, G542X, W1282X, A120T, R117H, and R347H mutations. *J Trop Pediatr* 2004 Dec;50(6):359-61.
32. Elce A, Boccia A, Cardillo G, Giordano S, Tomaiuolo R, Paolella G, et al. Three novel CFTR polymorphic repeats improve segregation analysis for cystic fibrosis. *Clin Chem* 2009;55(7):1372-9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 12, March 2012: 761-767

IVS8 polyT and M470V polymorphisms in healthy individuals and cystic fibrosis patients in Mazandaran province, Iran

Vahid Kholghi Oskooei B.Sc.[1]
Mohammad Reza Esmaeeli Douki M.D.[2]
Reza Tabaripour M.Sc.[3]
Roghieh Pourbagher M.Sc.[1]
Javad Tavakkoly Bazzaz Ph.D.[4]
Bagher Larijani M.D.[4]
Haleh Akhavan-Niaki Ph.D.[1*]

1- Cellular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
2- Pediatric Non-Communicable Diseases Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
3- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Department of Genetics, School of Medicine Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5- Endocrinology and Metabolism, Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Cellular and Molecular Biology Research Center Babol University of Medical Sciences, Gandj Afrouz Ave, Babol, Iran.
Tel: +98- 111- 2234650
E-mail: halehakhavan@yahoo.com

Received: October 30, 2011 Accepted: December 19, 2011

Abstract

***Background*:** Cystic fibrosis (CF) is a multiorgan autosomal recessive disorder. As CF is highly heterogeneous in Iran and many mutations have a low frequency, routine molecular diagnostic methods are not very efficient. The use of highly polymorphic intragenic markers not only can facilitate phenotype prediction in prenatal diagnosis by gene tracking, but also can lead to the demonstration of possible associations between haplotypes and specific mutations. We determined IVS8 polyT and M470V polymorphisms in exon 10 of CFTR gene in this case-control study.

***Methods*:** Polymorphisms of IVS8 polyT in 53 patients with CF were referred to Amirkola children's Hospital of Babol University of Medical Sciences, 2007 to 2011 and 49 fertile healthy individuals were determined by reverse dot blot method. M470V polymorphism was analyzed by PCR-RFLP.

***Results*:** In IVS8 polyT study, T7 was the most frequent allele in healthy individuals than patients with CF (respectively, 82.8% *Vs.* 77.2%). T9 was more abundant in patients with CF than normal individuals (respectively, 21.7% *Vs.* 7.4%, P=0.005). T9/T9 genotype was more frequent in patients than healthy individuals (respectively, 15.1% and 2%, P=0.032). Study for M470V polymorphism showed that M/V was the most common genotype in normal individuals and patients with CF (respectively, 49% and 40.4%). M-T9 haplotype was highly associated with the disease in both patients with CF and normal individuals (respectively, 19.1% and 2.4%, (P<0.001)

Conclusion: The allelic distribution and heterozygosity results suggest that both M470V and IVS8 polyT can be helpful in the prenatal diagnosis of CF in Northern Iranians with a positive family history of the disease.

Keywords: Cystic fibrosis, haplotype, IVS8 polyT, M470V.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]