

## گزارش جهش نقطه ای جدید در ژن فاکتور انعقادی شماره ۸ انسانی در فردی با هموفیلی A شدید

محمد علی حسین پور فیضی<sup>۱</sup>، حبیب عنصری<sup>۲\*</sup>، سمیه اکرمی<sup>۳</sup>، مهدی حقی<sup>۴</sup>، عباسعلی حسین پور فیضی<sup>۵</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** هموفیلی A یک بیماری خونریزی دهنده با الگوی وراثتی مغلوب و وابسته به کروموزوم X می‌باشد. شیوع آن در جهان ۱ در ۱۰ هزار نفر در بین مردان می‌باشد. این بیماری یک نقص وراثتی فاکتور انعقادی شماره ۸ می‌باشد. ژن فاکتور ۸ در نزدیکی انتهای بازوی بلند کروموزوم X (Xq28) واقع شده و در حدود ۱۸۰ کیلو باز طول دارد. این ژن دارای ۲۶ اگزون بوده و یک زنجیره پلی پپتیدی با ۲۳۵۱ اسید آمینه را کدگذاری می‌کند. در این مقاله به معرفی یک جهش جدید در ژن فاکتور ۸ بیمار مبتلا به هموفیلی A مراجعه کننده به بیمارستان کودکان تبریز در سال ۸۵ پرداخته می‌شود.

**معرفی بیمار:** بیمار پسر ۶ ساله‌ای بود (HA10) که به علت خونریزی‌های مکرر لثه در سال ۱۳۸۵ به بیمارستان کودکان تبریز آورده شده بود. وجود خونریزی شدید در بیمار، پایین بودن میزان فاکتور ۸ و معاینات پزشکی احتمال ابتلا به هموفیلی شدید را نشان می‌داد. بنابراین برای بررسی نوع جهش عامل بیماری با استفاده از تکنیک PCR-SSCP اقدام شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** یک جهش جدید شناسایی شد که در لیست داده‌های بین‌المللی هموفیلی A گزارش نشده بود. این جهش جدید، جهش انتقالی C→T در اگزون ۴ می‌باشد که در موقعیت کدون ۱۵۳ رخ داده بود و باعث تغییر اسید آمینه سیستئین به آرژینین می‌شود. این جهش جدید در بانک ژنی NCBI به شماره EF581382 ثبت شده است. این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از تکنیک PCR-SSCP روش خوبی برای آشکار سازی انواع جهش‌های عامل هموفیلی A می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** هموفیلی A، فاکتور VIII، جهش نقطه‌ای، PCR-SSCP

۱- استاد دانشکده علوم دانشگاه تبریز

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند

۳- کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند

۴- کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تبریز

۵- دانشیار گروه خون و انکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

\* نویسنده مسوول: حبیب عنصری

آدرس: مرند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، گروه زیست‌شناسی

پست الکترونیک: onsori1356@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۴ ۴۹۱ ۶۳۳۷

دورنویس: ۰۴۹۱۲۲۶۰۵۶۶

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۱۲

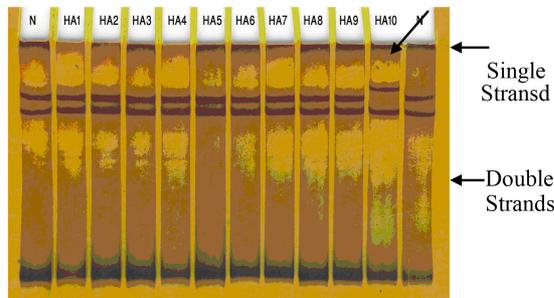
تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۱/۲۴

## مقدمه

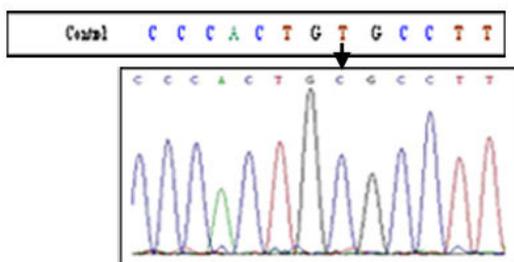
[۵، ۴، ۳]. بیش از ۹۰۰ جهش مختلف شامل جهش‌های نقطه‌ای، الحاق‌ها، حذف‌ها و وارونگی‌ها در ژن فاکتور ۸ شناخته شده‌اند که باعث هموفیلی A می‌شوند [۶]. جهش‌های نقطه‌ای، فراوان‌ترین نوع آسیب می‌باشند که در مبتلایان هموفیلی A دیده می‌شوند و شامل جهش‌های missense و nonsense می‌باشند [۷]. چندین روش غربال‌گری جهش برای آشکارسازی جهش‌ها از جمله SSCP (single strand conformational polymorphism) و CSGE (conformational sensitive gel electrophoresis) وجود دارند که بیش از ۹۰ درصد جهش‌ها را می‌توان با این

هموفیلی A یک بیماری خونریزی دهنده با الگوی وراثتی مغلوب و وابسته به X می‌باشد که با شیوع تقریبی ۱/۱۰۰۰۰ مورد در بین مردان در تمامی جمعیت‌ها دیده می‌شود [۱]. این بیماری به وسیله جهش‌هایی در ژن فاکتور انعقادی ۸، که بر روی کروموزوم X در موقعیت Xq28 قرار دارد، حاصل می‌شود [۲]. فاکتور ۸ یک گلیکو پروتئین پلاسمایی است که به عنوان کوفاکتور برای فعالیت سرین پروتئاز فاکتور ۹ فعال و در جهت تبدیل فاکتور ۱۰ غیر فعال به فاکتور ۱۰ فعال عمل می‌کند

قطعه مورد نظر، یک جهش نقطه‌ای را در محل کدون شماره ۱۵۳ (TGC) نشان داد. این جهش نقطه‌ای به صورت انتقال T به C در این موقعیت می‌باشد که باعث تغییر اسید آمینه سیتئین به آرژینین می‌شود (Cysteine → Arginine) (شکل ۳).



شکل ۲- آنالیز PCR-SSCP اگزون ۴ ژن فاکتور ۸ در ۱۰ بیمار مبتلا به هموفیلی A. در فرد شماره ۱۰ تغییر در مهاجرت تک رشته‌ها به وسیله پیکان نشان داده شده است. N: فرد نرمال.



شکل ۳- تعیین توالی محصول PCR اگزون ۴ فرد شماره ۱۰ (HA10) مقایسه توالی فرد بیمار با توالی فرد نرمال، تغییر نوکلئوتیدی T به C (TGC → CGC) را نشان می‌دهد.

### بحث

جهش انتقالی C → T که موجب تغییر اسید آمینه سیتئین به آرژینین می‌شود باعث نقص در عملکرد دومین A1 در فاکتور ۸ و در نتیجه موجب بروز هموفیلی A شدید می‌شود. در بین داده‌های هموفیلی A یک نوع جهش دیگر در کدون ۱۵۳ در دو بیمار گزارش شده است که در هر دو مورد آنها تغییر اسید آمینه سیتئین به تریپتوفان باعث هموفیلی شدید شده است [۳].

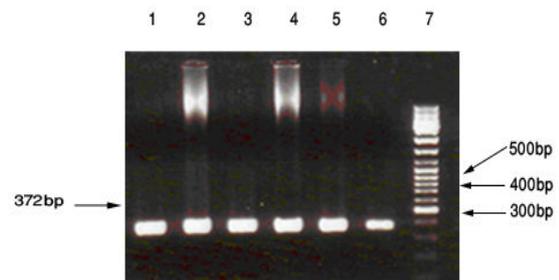
### نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه هموفیلی A یک بیماری خطرناک و کشنده می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد که تکنیک PCR-SSCP روش خوبی برای بررسی جهش‌های عامل بیماری می‌باشد.

تکنیک‌ها آشکار کرد. روش SSCP که معمولا برای قطعات با طول کمتر از ۴۰۰ جفت باز استفاده می‌شود، یک روش تقریبا ساده و ارزان می‌باشد [۸]. در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تعیین توالی مستقیم، جهش عامل بیماری در فرد مبتلا به هموفیلی A مورد شناسایی قرار گرفت.

### معرفی بیمار

بیمار پسر ۶ ساله ای بود که به علت خونریزی‌های لثه در سال ۱۳۸۵ به بیمارستان کودکان تبریز آورده شده بود. وجود خونریزی شدید در بیمار، پایین بودن فاکتور ۸ و معاینات پزشکی احتمال ابتلا به هموفیلی شدید را نشان می‌داد. نمونه‌گیری خونی از بیمار صورت گرفت. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA از گلبول‌های سفید خون در یخچال نگه‌داری شدند. استخراج و تخلیص DNA ژنومی از نمونه‌های خون به روش SDS-Proteinase K انجام شد [۹]. پس از استخراج DNA ژنومی از افراد مبتلا و شاهد، با استفاده از روش PCR و بکارگیری پرایمرهای 5-CATGTTTCTTTGAGTGTACAGTGG و F8EX4:5-TTCAGGTGAAGGAACACAAATG و F8EX4R، اگزون ۴ تکثیر شد. توالی پرایمرها از سایت اختصاصی مربوط به هموفیلی گرفته شد [۶]. قطعه مورد انتظار از PCR اگزون ۴ ژن فاکتور ۸ به طول ۳۷۲ جفت باز با استفاده از پرایمرهای F8EX4F و F8EX4F به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱- ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، نشان دهنده محصولات PCR اگزون ۴ به طول ۳۷۲ جفت باز: چاهک (۱) محصول PCR فرد نرمال، چاهک‌های ۲ الی ۶ محصولات PCR افراد مبتلا، چاهک (۷) DNA Ladder (Fermentas SM0333)

پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، محصولات PCR با تکنیک SSCP و رنگ آمیزی با نترات نقره آنالیز شدند [۱۰]. هنگامی که محصولات PCR به وسیله تکنیک SSCP آنالیز شدند، تغییر در الگوی باندهای فرد شماره ۱۰ با فرد نرمال و سایر افراد مبتلا مشاهده شد (شکل ۲). پس از واکنش PCR و آنالیز SSCP، تعیین توالی

## References:

- [1] Miyoko H, Stylianos E, Laura K, Johannes O. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8307-11.
- [2] Habart D. Molecular diagnosis of hemophilia A in clinical practice. *Cas Lek Ces* 2005;144:795-800.
- [3] Geoffrey KC, Edward GDT, Adam IW. The factor VIII Structure and mutation resource site: HAMSTERS Version 4. *Nucleic Acids Res* 1998;26(1):216-9.
- [4] Barry LS. Optimization of factor VIII replacement therapy: Can structural studies help in evading antibody inhibitors? *Br J Haematol* 2002;119:310-22.
- [5] Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, van Mourik JA, Mertens K. The interaction between human blood coagulation factor VIII and von Willebrand factor. *Biochem J* 1989; 257:679-84.
- [6] Berber E, Fidanci ID, EL-Maarrid C, Aktuglu G, Gurgey A, Celkan T. Sequencing of the factor 8 (F8) coding regions in 10 Turkish hemophilia A patients reveals three novel pathological mutations, and one rediagnosis of von Willebrand's disease type 2N. *Haemophilia* 2006;12:398-400.
- [7] Bhopale GM, Nanda RK. Blood coagulation factor VIII: An overview. *J Biosci* 2003;28:783-9.
- [8] Dalal L, Pradhan M, Agarwal S. Genetics of Bleeding Disorders. *Int J Hum Genet* 2006;6(1):27-32.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; PP: 914-923.
- [10] Chinchang W, Viprakasit V, Pung-Amritt P, Tanphaichitr VS, Yenchitsomanus P. Molecular analysis of unknown  $\beta$ -globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with  $\beta$ -thalassemias and  $\beta$ -globin variants. *Clin Biochem* 2005;38:987-96.