مقاله تحقیقی

مجله بیماریهای کودکان ایران
دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵

بیان و سکانس ژن الاستاز دو در لکوسیت‌های چندهسته‌ای گردش خون محیطی افراد سالم جهت تعیین Single neucleotide polymorphism (SNP) بروش RT-PCR

دکتر قاسم آهنگری* ؛ استادیار ایمونوژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
دکتر زهرا چاوش زاده؛ استادیار ایمونولوژی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
زهره لاری یزدی؛ کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه خاتم
موسی کیهانی؛ کارشناس ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
شیرین جمشیدی؛ کارشناس ارشد بیولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
دکتر ابوالحسن فرهودی؛ فوق تخصص ایمونولوژی و آلرژی، استاد گروه کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

هدف: ژن الاستاز دو کدکننده نوتروفیل الاستاز است. نوتروفیل الاستازیک سرین پروتئاز قوی است که در نوتروفیل‌ها یافت می‌شود و قادر به تخریب بیشتر پروتئین‌های بافت پیوندی می‌باشد. ژن الاستاز دو متشکل از ۵ اگزون و ۴ اینترون است. ژن الاستاز دو جایگاه ویژه‌ای در پاتوژنز بیماری‌های رده میلوئیدی و سایر بیماری‌ها دارد. با توجه به اینکه پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی دارای کاربرد فراوان در مطالعات فارماکوژنومیک هستند بنابراین شناخت پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی‌های جدید می‌تواند گامی در جهت پیشرفت این علم باشد.

روش مطالعه: خون محیطی از افراد سالم گرفته شد. سلول‌های چند هسته‌ای از خون تازه جدا شدند و RNA توسط روش استاندارد استخراج گردید. بیان ژن الاستاز توسط روش RT-PCR و بکارگیری ده پرایمر اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. سکانس هریک از اگزون‌ها توسط روش capillary sequencing شناسائی شد.

یافته‌ها: در این بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی جدیدی در اگزون ۲ این ژن در کدن ۴۴ یافت شد. در این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، G به A تبدیل شده اما هیچ تغییری در سکانس آمینو-اسیدی دیده نشد. سکانس کدن ۴۴ در نیمی از افراد نرمال مورد بررسی GCG است که مشابه سکانس بانک اطلاعات ژنی NCBI است و در نیمی دیگر GCG به GCA تغییر یافته است.

نتیجه‌گیری: با توجه به شناسائی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی خاص در افراد ایرانی می‌توان ارتباط آنها را با بیماری‌ها و پاسخ به درمان مورد ارزیابی قرار داد تا بتوان به بیماران تحت درمان کمک نمود.

*مسئول مقاله، آدرس: تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۳۴۳
E-mail:ghah@nrcgeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۴/۷/۲
تاریخ بازنگری: ۸۴/۱۱/۵
تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۱/۱۹

واژه‌های کلیدی: ژن الاستاز دو، نوتروفیل الاستاز، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، نوتروپنی

مقدمه

ژن الاستاز دو (ELA2) روی کروموزوم pl3.3 ۱۹ قرار دارد و متشکل از ۵ اگزون و ۴ اینترون است که تقریبا ۵۰۰۰ جفت باز از DNA ژنومی را در بر می‌گیرد. در سال ۱۹۹۹ موتاسیون‌های ژن الاستاز دو کدکننده الاستاز نوتروفیل در انسان توسط Dale و همکارانش گزارش شد. در سال ۲۰۰۰ Dale گزارش کرد که موتاسیون‌های ژن الاستاز دو در ایجاد نوتروپنی دوره‌ای (cyclic neutropenia) و نوتروپنی شدید مادرزادی (severe congenital neutropenia) نقش دارند. تنوع موتاسیون‌ها در این ژن در نوتروپنی مادرزادی بیشتر از نوتروپنی دوره‌ای است[۱، ۲، ۳]. در بیماران مبتلا به نوتروپنی شدید مادرزادی، موتاسیون‌ها در سراسر سکانس ژن گسترده شده‌اند و موجب تغییرات مولکولی در الاستاز بالغ، نواحی پرودمین و ناحیه پروموتور می‌شوند. موتاسیون هایی که موجب تولید پروتئین‌های کوتاه می‌شوند فقط در بیماران نوتروپنی شدید مادرزادی مشاهده می‌شوند. موتاسیون‌های مرتبط با نوتروپنی دوره‌ای ترجیحاً در اگزون-

www.SID.ir

های ۲ و ۳ و ۴ قرار دارند و محدود به جایگزینی‌های آمینواسیدی و نواقص در splicing در splice donor site اینترون ۴ می‌شوند[۴، ۵، ۶].

غربالگری مولکولی ژن الاستاز دو در بیماران نوتروپنی دوره‌ای و نوتروپنی شدید مادرزادی سبب شناسائی حدود ۳۰ موتاسیون مختلف شده است. با توجه به ساختار سوم الاستاز، موتاسیون‌ها در نوتروپنی دوره‌ای در اطراف سایت فعال آنزیم تجمع یافته‌اند در حالیکه در نوتروپنی مادرزادی موتاسیون‌ها عمدتاً در سطح مقابل سایت فعال آنزیم قرار دارند. طی تحقیقات انجام شده در سال ۲۰۰۲ مشخص شد که ژن‌های الاستاز نوتروفیل موش و انسان سازمان یابی مشابهی دارند و الاستاز موش و انسان در سطح آمینواسیدی ۷۶٪ شباهت دارند[۲، ۴، ۵]. پاتوژنیسیته موتاسیون‌های ژن الاستاز دو هنوز مشخص نشده است. موش‌هایی که ژن الاستاز دو در آنها بصورت هموزیگوت یا هتروزیگوت تخریب شده است تعداد نوتروفیل‌هایشان طبیعی است و فقط موش‌هایی که ژن الاستاز دو در آنها به صورت هموزیگوت تخریب شده شدیداً به عفونت حساس هستند. موتاسیون‌های ژن الاستاز دو ساختار و خصوصیات بیولوژیکی الاستاز را تغییر می‌دهند. اخیراً شواهدی از پدیده موزائیسم برای موتاسیون ۱۹۲۹ T > C در پدری که از نظر خونی سالم است ولی دخترش به نوتروپنی شدید مادرزادی مبتلا است ارائه شده که قویاً نشان دهنده طبیعت بیماریزایی این موتاسیون در تولید میلوسیت‌ها از مغز استخوان است[۷، ۸، ۹].

در طی سال‌های اخیر مشخص شده که ژن الاستاز دو جایگاه ویژه‌ای در پاتوژنز بیماری‌های رده میلوئیدی و سایر بیماری‌ها دارد. بیان و نحوه عملکرد این ژن دارای کاربردهای فراوان در حالت سلامت و بیماری است. با توجه به تازگی موضوع و نقش کلیدی این ژن ابتدا لازم بود بیان این ژن در خون محیطی افراد سالم مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به اینکه پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی دارای کاربرد فراوان در مطالعات فارماکوژنومیک هستند بنابراین شناخت پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی‌های جدید می‌تواند گامی در جهت پیشرفت این علم باشد.

مواد وروش‌ها

این تحقیق در بخش پزشکی مولکولی و ایمونولوژی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و با همکاری بخش ایمونولوژی مرکز طبی کودکان انجام گردید.

تهیه خون محیطی از افراد سالم: با سرنگ 5^{cc} خون از افراد مورد آزمایش تهیه کرده و آنرا به فالکون 15^{cc} که حاوی $0/5^{cc}$ تا ۱ میل‌لیتر ماده آنتی‌کواگولانت EDTA ۱٪ بود اضافه کردیم و به مدت ۱ دقیقه به آرامی تکان دادیم. خون محیطی از ۲۰ فرد سالم تهیه شد.

استخراج RNA: در یک فالکون هم حجم خون از Polymorphoprep ریخته شد، سپس خون به آهستگی به دیواره فالکون وارد شد تا به‌صورت یک لایه کاملاً مجزا بر روی Polymorphoprep قرار گیرد، پلی‌مورفوپرپ برای جداکردن نوتروفیل‌ها به صورت اختصاصی بکار رفت. پس از جداسازی سلول‌های چند هسته‌ای با استفاده از کیت Roche (آلمانی)، سلول‌ها را لیز کردیم و RNA با استفاده از عبور از ستون‌های خاص استخراج شد. محلول را که حاوی RNA بود در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد و برای نگهداری طولانی مدت در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد قرار دادیم.

ژل الکتروفورز: بعد از استخراج RNA برای بررسی چگونگی کیفیت استخراج و میزان RNA استخراج شده، حدود ۲ تا ۳ میکرولیتر از RNA استخراج شده را روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده و الکتروفورز کردیم. بعد از الکتروفورز، ژل را با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی کرده و با لامپ ماورا بنفش مشاهده کردیم.

ساخت cDNA: در این مرحله با کمک آنزیم Reverse Transcriptase و با استفاده از کیت **RevertAid (Fermantas) First Strand cDNA Synthesis** از روی RNA، DNA دو رشته‌ای ساخته شد. روش کار شامل مراحل زیر بود:

در یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری استریل عاری از نوکلئاز که روی یخ قرار داشت ۷ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر پریمر و ۱ میکرولیتر آب Deionized به آرامی مخلوط و به مدت ۳ تا ۵ ثانیه اسپین کردیم. سپس ویال را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده، مجدداً روی یخ خنک کرده و قطرات پراکنده را با یک اسپین ملایم در ته ویال جمع کردیم. در حالی‌که ویال روی یخ قرار داشت ۴ میکرولیتر Reaction buffer 5x، ۱ میکرولیتر مهارکننده ریبونوکلئاز و ۱ میکرولیتر dNTp mix 10mM اضافه و به آرامی با نوک تیپ مواد را مخلوط کردیم و به مدت ۳ تا ۵ ثانیه دیگر اسپین کردیم. سپس ویال را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و بعد آنرا داخل یخ قرار دادیم. درنهایت ۱ میکرولیتر آنزیم Revert Aid M-Mulv reverse transcriptase اضافه و مواد را به آرامی با نوک تیپ مخلوط کردیم و ویال را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در تمامی مراحل با رعایت احتیاط لازم از آلودگی نمونه‌ها با نوکلئازها جلوگیری کردیم و CDNA به‌دست آمده را در برودت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کردیم.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- غلظت و مقدار هرکدام از مواد مورد نیاز برای یک reaction ۲۵ میکرولیتری

CDNA	آب استریل	PCR buffer 10X	$Mgcl_2$ (50mM)	dNTp (۱۰mM)	پرایمر رفت ۱۰Pmol	پرایمربرگشت ۱۰Pmol	Taq μl 5u/
۲ μL	۱۸/۲۵ μL	۲/۵ μL	۰/۷۵ μL	۰/۵ μL	۰/۵ μL	۰/۵ μL	۰/۱ μL

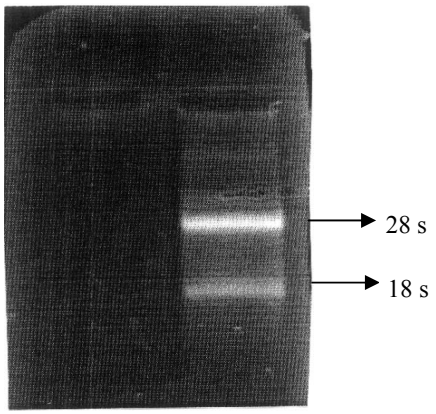
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: پس از ساخت CDNA از آن به‌عنوان الگو استفاده کردیم. واکنش PCR در لوله های ۲۵ میکرو لیتری مطابق جدول ۱ صورت گرفت. پژوهش انجام شده بر روی ژن الاستاز دو بود. این ژن دارای ۵ اگزون می‌باشد بنابراین برای all exon، اگزونهای ۱ و ۲ با هم و اگزونهای ۳، ۴ و ۵ بصورت جداگانه طراحی پرایمر انجام شد. یک جفت پرایمر برای اگزونهای ۱ و ۲ درنظر گرفته شد که علت این امر کوچک بودن این قسمت از ژن و GC-rich است. بعد از انجام ۳۰ سیکل میلیونها کپی از DNA اولیه بدست می‌آید.

بعد از انجام واکنش PCR محصول می‌بایستی روی ژل آگارز برده شود و الکتروفورز گردد تا کیفیت عمل PCR بدست آید. برای الکتروفورز محصولات PCR معمولاً از ژل ۲٪ و برای الکتروفورز RNA از ژل ۱/۵٪ استفاده می‌شود. برای تهیه ژل از پودر آگارز و بافر ۳ روی کاغذ پارافیلم به تعداد نمونه‌ها Loading buffer به میزان ۱ میکرولیتر قرار داده و ۵ میکرولیتر محصول PCR به آن اضافه و کاملاً مخلوط کردیم و در چاهک وارد نمودیم. سپس ارتباط بین منبع تغذیه (power supply) و تانک را با سیم برقرار کردیم و الکتروفورز در ۱۰۰ ولت به مدت حدود یک ساعت انجام شد. پس از عمل run کردن محصولات، ژل را با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی کرده و با لامپ ماورا بنفش باندها را مشاهده کردیم. پس از اطمینان از تکثیر ژن و مشاهده باند مربوطه مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR توسط کیت DNA recovery شرکت کیاژن بازیافت شده و برای تعیین سکانس به روش capillary sequencing انجام شد.

یافته‌ها

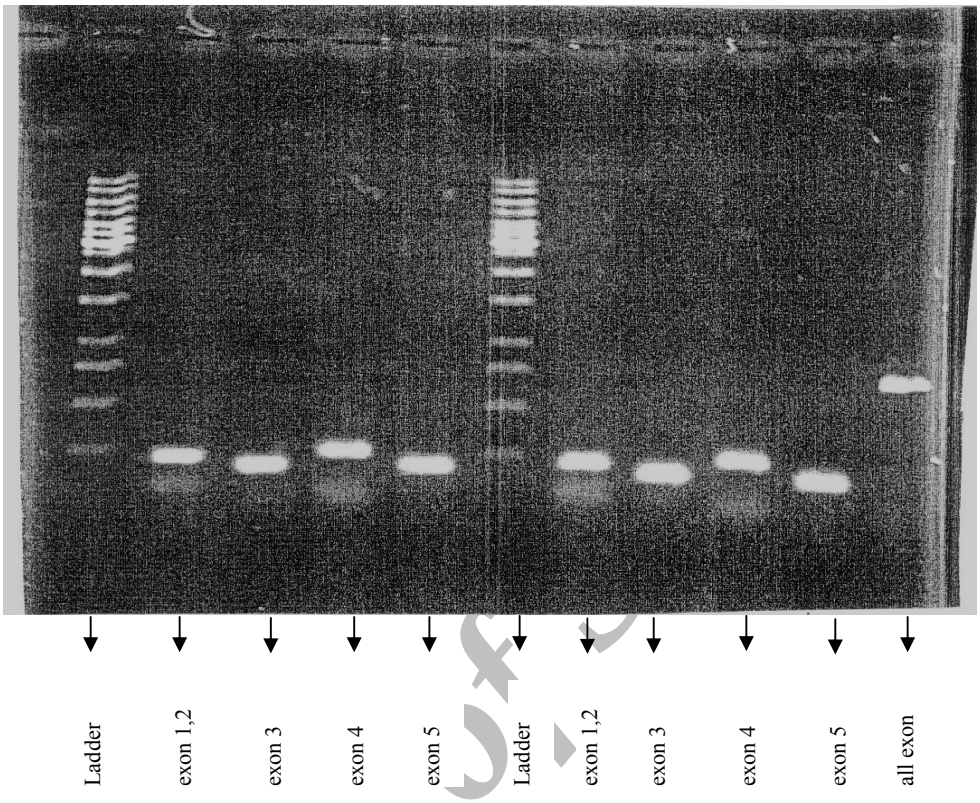
برای بررسی چگونگی کیفیت استخراج و میزان RNA استخراج شده هر نمونه باید الگوی الکتروفورز RNA را از خود نمایان کند. یعنی یک حالت اسمیر و دوباند مربوط به ۱۸۶ و ۲۸۶ دیده شود. شکل ۱ نمایانگر تصویر ژل الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل ۱/۵٪ اگاروز می‌باشد. پس از اطمینان از حصول صحیح استخراج RNA با استفاده از cDNA تولیدی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر یک از اگزون‌های ژن الاستاز دو صورت گرفت. شکل ۲ نمایانگر نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز می‌باشد که در آن اگزون‌های مختلف ژن الاستاز دو پس از تکثیر و الکتروفورز به‌صورت باندهایی بر روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده می‌شود. به ترتیب از سمت چپ مارکر DNA، اگزون ۱و۲ (۲۱۱bp)، اگزون ۳ (۱۴۶bp)، اگزون ۴ (۲۴۷bp) و اگزون ۵ (۱۷۶ bp) قابل مشاهده می‌باشد.

پس از انجام الکتروفورز و اطمینان از حصول تکثیر ژنی هر یک از اگزون‌های ژن الاستاز دو، اگزون‌های مختلف بر روی ژل بازیافت شدند و پس از خالص سازی توسط روش capillary sequencing توالی آنها مشخص گردید. شکل ۳ تصویر مربوط به Sequencing اگزون دو ژن الاستاز دو یک فرد سالم هموزیگوت ایرانی است که کدون ۴۴ در انتهای اگزون ۲ دارای سکانس GCG می‌باشد و این سکانس مشابه

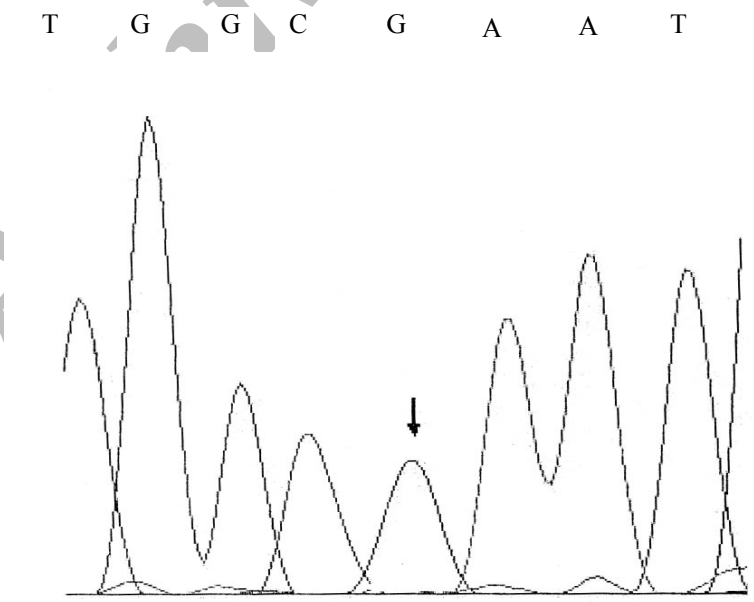


شکل ۱ ـ تصویر ژل الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل ۱/۵٪

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲ ـ ژل الکترفورز محصولات PCR اگزون‌های ۲،۱، ۳، ۴، ۵ و all exon. (به‌ترتیب از سمت چپ به راست ladder، اگزونهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مربوط به یک فرد سالم و دوباره ladder، اگزونهای ۱و ۲، ۳، ۴، ۵ و all exon در یک فرد سالم)



شکل ۳ ـ تصویر مربوط به sequencing فرد سالم هموزیگوت ایرانی است که کدن ۴۴ در انتهای اگزون ۲ دارای سکانس GCG می‌باشد و این سکانس مشابه سکانس بانک اطلاعات ژنی NCBI است.

www.SID.ir

توالی ثبت شده دربانک اطلاعات ژنی NCBI است. تصویر ۴ مربوط به تعیین توالی یا Sequencing فرد سالم هتروزیگوت دیگر ایرانی است که در آن N می‌تواند A یا G باشد. این تصویر مربوط به کدن ۴۴ در انتهای اگزون ۲ می‌باشد. شکل ۵ نمایانگر اگزونهای مختلف ژن الاستاز II و جایگاهی است که پلی‌مورفیسم ژن الاستاز II در انتهای اگزون دو در جمعیت ایرانی مشاهده گردیده است.

جدول ۲ نمایانگر نوع ژنوتیپ، فراوانی هر ژنوتیپ توالی کدن ۴۴ که کد کننده اسید آمینه آلانین است که تغییر در این جایگاه در سطح نوکلئوتید که موجب پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی گردیده است را مشاهده می‌نمائیم این تغییر در نوکلئوتید موجب تغییر در اسید آمینه این آنزیم نمی‌گردد.

بحث

هدف از انجام این مطالعه پیدا کردن پلی‌مورفیسم یا پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن الاستاز دو درلکوسیت های چندهسته‌ای افراد سالم بود. بطور کلی چندین تنوع در ژنوم انسان وجود دارد از جمله پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی، میکروستلیت‌ها یا پلی‌مورفیسم‌های حذفی/ درجی. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی فراوانترین فرم تنوع ژنتیکی در ژنوم انسان هستند که مسئول بیش از ۹۰٪ تفاوت‌ها در میان افراد می‌باشند. بسیاری از فنوتیپ‌های پیچیده در انسان دارای یک جزء ژنتیکی مهم هستند و بیشترین تنوع احتمالاً ناشی از تفاوت در الگوی پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشد[۱۰]. اولین پلی‌مورفیسم در انسان در سال ۱۹۰۱ گزارش شد و بعد از گذشت یک نسل دومین پلی‌مورفیسم نیز شناسایی شد.

هفده گروه خونی پلی‌مورف در دهه ۱۹۶۰ شناخته شد[۱۱]. در سال‌های اخیر توجه زیادی به پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی شده است و تلاش‌ها در حال حاضر به میزان زیادی در جهت شناسایی و بایگانی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژنوم انسان می‌باشند. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ابزارهایی قوی در مطالعات ژنتیک پزشکی هستند و بعنوان مارکرهای ژنتیکی برای شناسایی ژنهایی که در بیماری‌ها نقش دارند، نیز بعنوان مارکر در مطالعات افتراق جمعیت‌ها و در مطالعه بیماری‌های پیچیده و فارماکوژنومیک بکار می‌روند[۱۲، ۱۳]. امروزه اصطلاح پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی برای مکان‌های متغیری بکار می‌رود که باز کمیاب‌تر در داخل جمعیت با فراوانی بیش از ۱٪ وجود داشته باشد، در حالیکه پلی‌مورفیسم‌های لایه زایشی با فراوانی کمتر از ۱٪ را اصطلاحاً موتاسیون می‌گویند. در واقع پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی جایگزینی‌های ساده تک‌بازی هستند که در داخل ژن‌ها یا خارج از آنها رخ می‌دهند[۱۳]. جمع شدن سریع سکان‌های mRNA و نیز ژنوم انسان در طی چند سال آینده موجب شناسایی هزاران پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی برای مطالعات ارتباطی در سراسر ژنوم خواهد شد[۱۵].

برای شناسایی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی انواعی از تکنیک‌ها از جمله high-throughput screening، تکنیک‌های بر پایه منحنی ذوب، تکثیر حلقه غلتان و oligonucleotide ligation assay بوجود آمده‌اند. تا به امروز تقریباً ۱/۴ میلیون پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در NCBI ثبت شده است. مارکرهای پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی برای مطالعه پاسخ دارویی و بیولوژی تکاملی بکار می‌روند و بسته به موقعیت وقوعشان بسیاری از آنها روی اعمال ژنها تأثیر می‌گذارند. اثر مضر آنها می‌تواند در سطح پایداری RNA و splicing، ترجمه و رونویسی باشد و می‌توانند ایجاد علائم بالینی کنند. اخیراً بررسی هاپلوتیپ بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هاپلوتیپ‌ها مجموعه‌ای از پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی کنار هم قرار گرفته بر روی یک کروموزوم هستند. به نظر می‌رسد که بررسی هاپلوتیپ از بررسی ژنوتیپ مؤثرتر باشد، چرا که در بررسی ژنوتیپ سایت‌های پلی‌مورفیک بین کروموزم‌های مادری و پدری قابل تمایز نیستند و به نظر می‌رسد که بیماران از نظر ژنتیکی مشابهند در حالی که در بررسی هاپلوتیپ آنها می‌توانند از نظر ژنتیکی متفاوت باشند. بسیاری از ژنهایی که به داروها پاسخ می‌دهند غالباً چندین پلی‌مورفیسم دارند.

بررسی هاپلوتیپ اطلاعات بیشتری دربارهٔ ارتباط ژنها با بیماری‌ها و پیش‌بینی بهتر از پاسخ دارویی در اختیار می‌گذارد تا ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی هر فرد. تمام تنوع‌های سکانسی DNA موجب بروز بیماری

جدول ۲- نوع و فراوانی هرژنوتیپ و توالی کدن ۴۴ کدکننده اسید آمینه آلانین در افراد سالم ایرانی

اسید آمینه	کدن	توالی	تعداد (فراوانی)	ژنوتیپ
ALanin	۴۴	GCG	۱۰ (۵۰٪)	هموزیگوت
ALanin	۴۴	GCG GCA	۱۰ (۵۰٪)	هتروزیگوت

Archive of SID

www.SID.ir

نمی‌شوند، بنابراین قبل از استفاده باید ارزیابی شوند. از طرف دیگر بعضی از پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی برای مستعد بودن به انواع بیماری‌ها و متابولیسم دارویی دارای اهمیت هستند. بنابراین در آینده وقتی تعداد زیادی از پلی‌مورفیسم‌های عملکردی شناسایی شوند ایجاد مارکرهای ژنتیکی مفید و درمان اختصاصی برای هر فرد امکان‌پذیر می‌شود.

زمانی‌که درمان برای هر فرد یک درمان مفیدتر واقع شود در آن صورت احتمالاً هر بچهٔ تازه متولد شده در دوران نوزادی برای درمان بهتر تعیین ژنوتیپ خواهد شد[۱۶]. مطالب ذکر شده نشاندهنده اهمیت شناسایی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی هستند و اما در زمینه وجود پلی‌مورفیسم در ژن الاستاز دو، Ancliff و همکارانش در سال ۲۰۰۱ موتاسیون p228L را در ناحیه C ترمینال، انتهای اگزون ۵، در یک بیمار مبتلا به نوتروپنی شدید مادرزادی گزارش کردند و پیشنهاد کردند که این موتاسیون می‌تواند یک پلی‌مورفیسم کمیاب باشد. در این پلی‌مورفیسم جایگزینی تک‌بازی C5054T وجود دارد. این جایگزینی تک‌بازی که موجب تغییر آمینواسیدی می‌شود متعاقباً در پدری که از نظر خونی سالم است و در یک فرد از ۱۱۰ نمونهٔ کنترل سالم یافت شد[۷].

تحقیق فوق نشان‌دهندهٔ موقعیت پلی مورفیسم یافت شده در سال ۲۰۰۱ در انتهای اگزون ۵ است. در نتایج بدست آمده از بررسی خون محیطی ۲۰ فرد نرمال ایرانی که موضوع این پایان‌نامه می‌باشد یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی جدید در کدن ۴۴ در اگزون ۲ ژن الاستاز دو شناسایی شد. در ۱۰ نفر از ۲۰ فرد سالم مورد مطالعه سکانس کدن ۴۴ مشابه NCBI است یعنی بصورت GCG می‌باشد و این افراد هموزیگوت هستند. در حالی‌که در ۱۰ نفر دیگر یک الل کدن ۴۴ بصورت GCG و الل دیگر بصورت GCA می‌باشد که این افراد هتروزیگوت هستند. موقعیت این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی جدید در انتهای اگزون ۲ می‌باشد و این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی موجب تغییر آمینواسیدی نمی‌شود.

تصویر ۵ مربوط به نوع ژنوتیپ، فراوانی هرژنوتیپ، توالی کدن ۴۴ که کدکننده اسید آمینه آلانین است، در افراد سالم ایرانی بررسی شده می‌باشد. تاکنون بیشترین مطالعات انجام شده بر روی موتاسیون‌های ژن الاستاز دو بوده‌اند و یک گزارش درباره پلی‌مورفیسم در این ژن در سال ۲۰۰۱ داده شده است. بطور کلی هدف از شناسایی و استفاده از پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی افراد مستعد به بیماری‌های خاص و تجویز داروها بر پایه ژنوم هر فرد می‌باشد. چراکه چنین درمان‌هایی موثرترین و ارزنده‌ترین روش در عصر ژنوم هستند. فارماکوژنومیک مطالعه تنوع ژنتیکی است که این تنوع زیربنای پاسخ‌های متفاوت به داروها می‌باشد. پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی پایه فارماکوژنومیک هستند و در تمام مراحل تولید دارو نقش اساسی دارند. فارماکوژنومیک پزشکان را قادر می‌کند که از دادن داروهایی که اثرات جانبی دارند یا مؤثر نیستند اجتناب کنند و مناسبترین درمان را برای هر بیمار انتخاب کنند. رشته فارماکوژنومیک بسرعت در حال پیشرفت است و می‌تواند در آینده حرفه پزشکی را بگونه‌ای تغییر دهد که برای هر فرد دارویی جداگانه تجویز گردد[۱۰، ۱۶]. برای مثال APOE4 یک الل در لوکوس آپولیپوپروتئین E نه تنها با افزایش ریسک ابتلا به آلزایمر مرتبط است بلکه پاسخ ضعیف به درمان با مهارکننده کولین استراز را پیش‌گویی می‌کند. این مثال، مثالی از پلی‌مورفیسم در داخل یک ژن مرتبط با بیماری است که پیش‌گویی کننده پاسخ دارویی می‌باشد. بنظر می‌رسد که برای بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، آترواسکلروز و بیماری‌های مخرب سیستم عصبی علت‌های مختلف و بنابراین پاسخ‌های مختلف به درمان وجود دارد که این مساله پایهٔ فارماکوژنومیک می‌باشد. نتایج فنوتیپی پلی‌مورفیسم‌ها که روی پاسخ دارویی اثر می‌گذارند احتمالاً با تغییرات در سطح RNA و پروتئین مرتبط هستند. بررسی‌ها در سطح رونویسی راه دیگری را برای شناسایی مارکرهای فارماکوژنومیک در اختیار می‌گذارند [۱۵]. با توجه به تأثیر پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی روی سلامت افراد، صنایع بیوتکنولوژی توجه خود را به ایجاد متدهایی برای تعیین پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی معطوف کرده‌اند [۱۰]. با تکمیل نقشه ژنوم انسان و نقشه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم-های تک نوکلئوتیدی در مطالعات وسیع فارماکوژنومیک عنوان یک بخش مکمل در فرایند کشف و تولید دارو خواهد بود[۱۷].

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی هدف از شناسایی و استفاده از پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی افراد مستعد به بیماریهای خاص و تجویز داروها بر پایه ژنوم هر فرد می‌باشد. با توجه به شناسائی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی خاص در افراد ایرانی می‌توان ارتباط آنها را با بیماری‌ها و پاسخ به درمان مورد ارزیابی قرار داد تا بتوان به بیماران تحت درمان کمک نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

Sequencing and expression of Elastase II gene in Polymorphoneuclear leukocytes in healthy individuals for determination of single nucleotide polymorphism (SNP) by RT-PCR

G Ahangari*; MT, PhD Immunogenetic**,** National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran
Z Chavoshzadeh; MD, Clinical Immunologist, Shahid Behashti University of Medical Sciences
Z Lari; MSc Genetic, Khatam University, Tehran
M Keyhani; BS Genetic**,** National institute for Genetic engineering and Biotechnology, Tehran
Sh JamShidi; MSc Biology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran
A Farhoudi; MD, Clinical Immunologist, Professor of Pediatrics, Tehran University of Medical Sciences

Abstract

Background: ELA2 gene responsible for coding human neutrophil elastase, a powerful serine protease carried by blood neutrophils and capable of destroying most connective tissue proteins. The NE gene consist of 5 exons and 4 introns.

Methods: Peripheral blood obtained from healthy individuals. Total RNA was isolated using RNA standard techniques from fresh separated cells by polymorphoprep. RNA was analyzed by employing PCR amplification of reveres transcribed using a total of ten specific primers. We amplified five exon of ELA2 gene separately and sequenced each exon. Mutational analysis was performed by directed capillary sequencing method.

Findings: We have found new single nucleotide polymorphism (SNP) in exon II codon 44. It was a silent mutation G to A substitution but no changes in amino acid sequences were seen. The codon sequence was GCG that has changed to GCA.

Conclusion:

The purpose of SNP detection is mainly recognition of susceptible people to certain diseases and providing suitable drugs based on each person genetic information. SNP information in Iranian patients can be used for analysis of drug response to human diseases.

*Correspondence author, Address: National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,P.O.Box:14155-6343,Tehran,Iran
E.mail: ghah@nrcgeb.ac.ir

Received: 24/9/05
Revised: 25/1/06
Accepted: 8/2/06

Key Words: Elastase II gene (ELA2), neutrophil elastase (NE), single nucleotide polymorphism (SNP), capillary sequencing

REFERENCS:

1. Horwitz M, Benson KF, Person RE, et al. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological Clock in cyclic hematopoiesis. Nat Genet. 1999; 23: 433-6.
2. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. Blood. 2000; 96(7): 2317-22.

Archive of SID
www.SID.ir

3. Ahangari G, Farhoudi A, Chavoshzadeh Z, et al. RT-PCR based mutation detection of the inflammatory molecules elastase II gene encoding neutrophil elastase in cyclic neutropenia patients by capillary sequencing. Eur J Inflammation. 2006; 4(1): 43-9.

4. Bellanne-Chantelot C, Clauin S, Leblanc T, et al. Mutations in the ELA2 gene Correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. Blood. 2004; 103(11): 4119-25.

5. David S-Grenda, Sonja E. Johnson, jili R. Mayer, Morgan L. Mclemore., *et al* .Mice expressing a neutropil elastase mutation derived from patient with severe congenital neutropenia have normal granulopoiesis. Blood. 2002; 100(9): 3221-8.

6. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Cyclic neutropenia and other periodic hematological disorders: a review of mechanisms and mathematical models. Blood. 1998; 92: 2629-40.

7. Ancliff PJ, Gale RE, Liesner R, et al. Mutations in ELA2 gene encoding neutrophil elastase are present in most Patients with sporadic severe congenital neutropenia but only in some patients with familial form of disease. Blood. 2001; 98(9): 2645-50.

8. Hermans MH, Touw IP. Significance of neutrophil elastase mutations versus G-CSF receptor mutations for leukemic progression of congenital neutropenia. Blood. 2001; 97 (7): 2185-6.

9. Ancliff PJ, Gale RE, Watts MJ, et al. Paternal mosaicism proves the Pathogenic nature of mutations in neutrophil elastase in severe congenital neutropenia. Blood. 2002; 100(2): 707-9.

10. Twyman RM, Primrose SB. Techniques Patents for SNP genotyping. Pharmacogenomics. 2003; 4: 67-79.

11. A. Collins, C. Lonjou and N.E. Morton. Genetic epidemiology of single nucleotide polymorphism. PNAS. 1999, 96: 15173-15177

12. Kao SL, Chong SS, Lee CG. The Role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in understanding complex disorders and pharmacogenomics. Ann Acad Med Sing. 2000; 29: 376-82.

13. Stitziel NO, Tseng YY, Pervouchine D, et al. Structural location of disease-associated Single-nucleotide polymorphisms. J Mol Biol. 2003; 327(5): 1021-30.

14. Kirk BW, Feinsod M, Favis R, et al. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. Nucleic Acid Res. 30. 2002; 30(15): 3295-311.

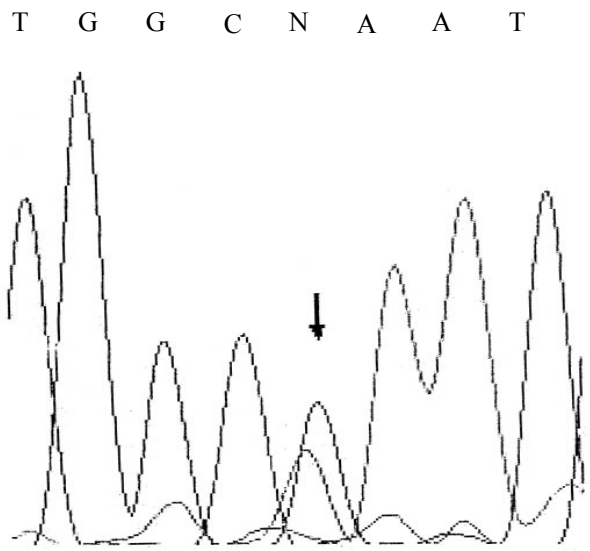
15. Kleyn PW, Vesell ES. Genetic variation as a Guide to drug development. Sci. 1998; 281: 820-1.

16. Shastry BS. SNPs and haplotypes: Genetic markers for disease and drug response. Int J Mol Med. 2003; 11(3): 379-82.

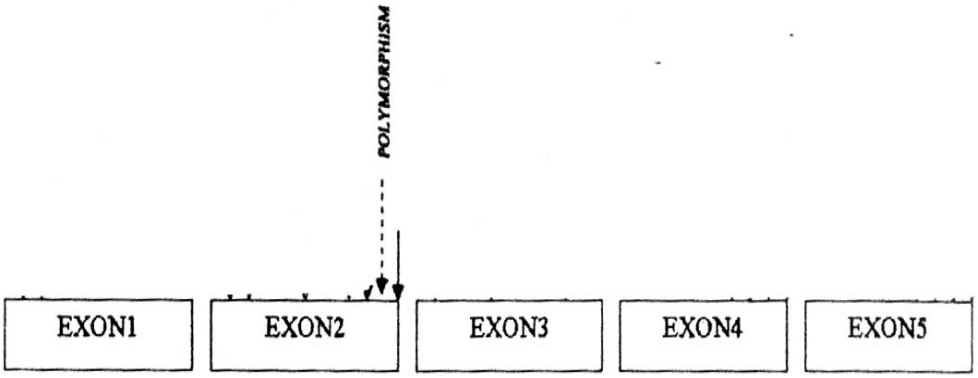
17. Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clin Chem. 2001; 47(2): 157-72.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- تصویر sequencing فرد سالم هتروزیگوت ایرانی که درآن N می‌تواند A یا G باشد. این تصویر مربوط به انتهای اگزون ۲ است.



شکل ۵- شکل شماتیک موقعیت پلی‌مورفیسم جدید یافت شده در انتهای اگزون ۲ در کدن ۴۴ ژن الاستاز II در افراد سالم ایرانی

www.SID.ir