

# طراحی آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و کارایی آنها به منظور شناسایی جهش‌های ژن FAH عامل بیماری تیروزینمی نوع یک

علی کشتکاری<sup>۱</sup>، سکینه سامانپور<sup>۱</sup>، سید ابراهیم حسینی<sup>۲</sup>، سجاد حسن زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، <sup>۳</sup> گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۱

## چکیده

**زمینه و هدف:** تیروزینمی نوع یک بیماری اتوزومی مغلوب به دلیل نقص آنزیم فوماریل استواسات هیدرولاز (FAH) می‌باشد، تا کنون حدود ۴۰ جهش پاتوژن برای این ژن معرفی شده است. هدف از این تحقیق تعیین و طراحی آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و کارایی آنها به منظور شناسایی جهش‌های ژن FAH عامل بیماری تیروزینمی نوع یک بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۲ نفر وارد مطالعه شدند و در دو گروه مساوی؛ اول شش نفر مبتلا به بیماری تیروزینمی نوع یک و گروه دوم شش نفر غیر مبتلا، پس از اخذ رضایت آگاهانه نمونه خون استخراج شد و سپس استخراج DNA از نمونه‌های خون انجام گرفت. برای قسمت‌هایی از ژن که در پژوهش‌های قبلی جهش گزارش شده بود، آغازگر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طراحی شد. اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده با بانک‌های اطلاعاتی آنلاین مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطعات ژن تکثیر شد. سپس قطعات تکثیر یافته پس از تخلیص تعیین توالی شدند و در نهایت آنالیز توالی به منظور پیدا کردن جهش عامل بیماری انجام گرفت.

**یافته‌ها:** آغازگرهای طراحی شده قطعات ژن FAH را به طور کاملاً اختصاصی تکثیر کردند. توالی‌یابی قطعات تکثیر شده منجر به شناسایی جهش بی‌معنی  $C>T$  709+ در اگزون ۱۰ ژن هر شش مورد بیمار مورد مطالعه گردید. والدین افراد بیمار ناقل این جهش ژنتیکی بودند. در هیچ یک از افراد گروه کنترل جهش ژنتیکی در ژن FAH یافت نشد.

**نتیجه‌گیری:** جهش بی‌معنی  $C>T$  709+ یک جهش بیماری‌زا در ژن FAH می‌باشد که قبلاً فقط در ترکیه گزارش شده بود. آغازگرهای طراحی شده به طور مقرون به صرفه و به طور اختصاصی قادر بودند ژن FAH را تکثیر کنند. همچنین میتوان از این آغازگرها جهت شناسایی افراد ناقل بیماری و همین‌طور تشخیص قبل از تولد بیماری تیروزینمی نوع یک استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** تیروزینمی نوع یک، تشخیص ژنتیکی، توالی‌یابی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

نویسنده مسئول: سجاد حسن زاده، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه داخلی

Email: Sajad.hassanzadeh@gmail.com



## مقدمه

تیروزینمی نوع یک (OMIM: 276700) یک بیماری اتوزومی مغلوب به دلیل نقص آنزیم فوماریل استواسات هیدرولاز (FAH) می‌باشد که در مراحل انتهایی کاتابولیسم تیروزین درگیر می‌باشد. این بیماری در جمعیت‌ها و گروه‌های نژادی مختلف فراوانی متفاوتی دارد. شیوع آن به طور متوسط ۱:۱۲۰,۰۰۰ تا ۱:۱۵۰,۰۰۰,۰۰۰ می‌باشد و بیشترین شیوع آن ۱:۱۶۰۰۰ در کبک کانادا می‌باشد (۱-۳). در این بیماری ابتدا کبد و سیستم مجاری پروکسیمال کلیه درگیر می‌شوند. درگیری کبد به صورت از کارافتادگی حاد کبد همراه با سیروز میکروندولار، از کار افتادن سلول‌های کبدی و کارسینوم هیپاتوسیت‌ها تظاهر می‌یابد و درگیری کلیه با مشکلات ناشی از هیپوفوسفاتمی ریکتز مانند آمینو اسید اوری، اسیدوز مجاری کلیه و گلوکز اوری قابل مقایسه می‌باشد. در نهایت ممکن است بیماری به بحران‌های نورولوژیکی حاد و از کار افتادن قلب بیانجامد (۴ و ۳). تظاهرات بالینی بیماری بر اساس سنی که علائم ظاهر می‌شوند شامل سه نوع؛ حاد با سن شروع قبل از شش ماهگی و با از کار افتادگی حاد کبد، نوع تحت حاد با سن شروع شش ماه الی یک سالگی با درگیری کبد و نوع مزمن با سیروز کند پیش رونده که پس از یک سالگی علائم قابل مشاهده است و با هیپوفوسفاتمی ریکتز همراه است، یک طبقه‌بندی دیگر نیز به وسیله اسپرونسن پیشنهاد شده است که مطابق آن بیماری بر اساس سن بروز علائم و نرخ بقای بیمار به

گروه‌های زیر طبقه‌بندی شده است. نوع بسیار زودرس (کمتر از دوماهگی)، زودرس (بین ۲ الی ۶ ماهگی) و نوع دیررس (پس از ۶ ماهگی) (۵ و ۶). یافته‌های آزمایشگاهی برای تیروزینمی عبارتند؛ از افزایش سطح تیروزین، آلفا فیتوپروتئین و متیونین پلازما می‌باشد. افزایش مالئیل استات، فوماریل استواسات و مشتقات آن از جمله سوکسینیل استون و سوکسینیل استواسات در ادرار می‌باشد (۳).

جایگاه ژن FAH در 15q23-25 مکان‌یابی شده است. این ژن حاوی ۱۴ اگزون می‌باشد که یک پروتئین ۴۲۰ اسید آمینه‌ای را رمزگذاری می‌کند. حدود ۴۰ جهش پاتوژن تا به الان برای این ژن معرفی شده است که در سراسر قسمت‌های ژن، ولی با تمرکز بیشتر در اگزون‌های ۸ تا ۱۳ دیده می‌شود (۷-۱۱، ۴). برخی از این جهش‌ها به نظر می‌رسد که با یک گروه نژادی خاص مرتبط باشند، به عنوان مثال جهش  $G>A$   $IVS\ 12+5$  بیشتر در جمعیت‌های فرانسوی-کانادایی شایع می‌باشد (۱۳، ۱۲، ۱). جهش  $IVS\ 6-1G>T$  بیشتر در جمعیت‌های خاورمیانه مشاهده شده است (تقریباً تشکیل دهنده ۶۰ درصد از آلل‌های پاتوژن این جمعیت می‌باشد) (۱۰). جهش W262X در فنلندی‌ها، جهش D233V در ترکیه و جهش Q64H در پاکستان مشاهده شده است (۱۸-۱۴ و ۱۱، ۷). مقرون به صرفه‌ترین و کارآمدترین روش جهت ارزیابی ژنتیکی جهش‌های عامل بیماری روش تعیین توالی سنگر می‌باشد (۱۶). در این روش حداکثر طول یک

یک قطعه ۴۹۲ جفت‌بازی حاوی اگزون‌های ۷، ۸، اینترون بین آنها و نواحی مرزی اینترونی آنها را تکثیر می‌کند.

آغازگر E910 F: 5-AGTCCTGGTCCATGGCTGGAG-3  
رفت، E910R: 5-GGAAGTCCCAGGCACTCTGCTG-3  
آغازگر برگشت

یک قطعه ۱۲۵۶ جفت‌بازی حاوی اگزون‌های ۹، ۱۰، اینترون بین آنها و نواحی مرزی اینترونی آنها را تکثیر می‌کند.

E13 F: 5-AAGGCGGTCTGAGCAGGGCAG-3 آغازگر رفت،  
E13 R: 5-GTTGTGAGATACACCCACCTCG-3 آغازگر برگشت.

یک قطعه ۳۲۲ جفت‌بازی حاوی اگزون ۱۳ و نواحی مرزی اینترونی آن را تکثیر می‌کند.

E14 F: 5-CAGTGATCCCACCAAGGCCGA-3 آغازگر  
رفت، E14 R: 5-CAGATGGCTTCATGGCCAGGT-3  
آغازگر برگشت.

یک قطعه ۳۶۳ جفت‌بازی حاوی اگزون ۱۴ و نواحی مرزی اینترونی آن را تکثیر می‌کند.

اگزون‌های ۷ و ۸ و نواحی مرزی اینترونی آنها به صورت یک قطعه با پرایمرهای E78F1 و E78R1 و با شرایط ذوب اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه سپس ۳۵ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه، تکثیر شد.

قطعه که می‌توان به طور مستقیم تعیین توالی کرد حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. از طرفی اندازه ژن فوماریل استواستات هیدرولاز ۳۳۷۶۰ جفت‌باز می‌باشد و بنابراین نمی‌توان کل ژن را با یک واکنش تعیین توالی بررسی کرد. بنابراین با چندین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌توان قطعات مهم ژن یعنی نواحی اگزونی همراه با چند نوکلئوتید ابتدایی و انتهایی اینترون‌ها را تکثیر و هر کدام را با روش تعیین توالی به طور جداگانه بررسی نمود، لذا هدف از این مطالعه تعیین و طراحی آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و کارایی آنها به منظور شناسایی جهش‌های ژن FAH عامل بیماری تیروزیمی نوع یک بود.

#### روش بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۲ نفر وارد مطالعه شدند و در دو گروه مساوی؛ شش نفر مبتلا به بیماری تیروزیمی نوع یک و گروه دوم شش نفر غیر مبتلا، پس از اخذ رضایت آگاهانه نمونه خون استخراج شد و سپس استخراج DNA از نمونه‌های خون انجام گرفت.

استخراج DNA با کیت استخراج DNA شرکت GeneAll و مطابق دستور العمل آن انجام گرفت.

آغازگرهای طراحی شده عبارتند از: E78F: 5-GCCATGTGTATGTGGCGACTCT-3 آغازگر رفت و E78R: 5-CTGCCGATGTGGCTGAAGAGG آغازگر برگشت.

طراحی آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نرم‌افزار FastPCR و Vector NTI استفاده شد و به منظور ارزیابی اختصاصیت، آغازگرهای پیشنهادی با نرم‌افزار آنلاین PCR Blast مورد بررسی قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

تکثیر قطعات اگزونی ۷۸، ۱۰-۹، ۱۳ و ۱۴ به وسیله آغازگرهای طراحی شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که این آغازگرها به طور کاملاً اختصاصی قطعات مربوطه را بدون ایجاد نوارهای غیر اختصاصی تکثیر می‌کنند. تصویر ۱، ژل الکتروفورز تکثیر اختصاصی قطعات را نشان می‌دهد.

تعیین توالی قطعات ۷۸، ۱۰-۹، ۱۳ و ۱۴ و سپس تجزیه و تحلیل نتایج آن جهش بیماری‌زایی >T709C709 را در اگزون شماره ۱۰ ژن آشکار ساخت. این جهش معنی‌دار نمی‌باشد و رمز ۲۳۷ که در حالت طبیعی رمز اسید آمینه آرژنین می‌باشد را به رمز پایان تبدیل می‌کند. تصویر ۲، نتیجه تعیین توالی محل شناسایی جهش ژنتیکی را در فرد مبتلا در مقایسه با فرد سالم (کنترل) نشان می‌دهد.

اگزون‌های ۹ و ۱۰ و نواحی مرزی اینترونی آنها به صورت یک قطعه با پرایمرهای E910F1 و E910R1 و با شرایط ذوب اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه سپس ۳۵ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه، تکثیر شد.

اگزون ۱۳ و نواحی مرزی اینترونی آن به صورت یک قطعه با پرایمرهای E13F1 و E13R1 و با شرایط ذوب اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه سپس ۳۵ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه، تکثیر شد.

اگزون ۱۴ و نواحی مرزی اینترونی آن به صورت یک قطعه با پرایمرهای E14F1 و E14R1 و با شرایط ذوب اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه سپس ۳۵ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه، تکثیر شد.

پس ارزیابی و تأیید کیفیت قطعات تکثیر یافته به وسیله ژل الکتروفورز تعیین توالی با روش سنجر و به وسیله شرکت تکاپوزیست تهران انجام گرفت.



## بحث

همه افراد توان اقتصادی انجام آن را ندارند. یک راهکار منطقی بررسی جهش‌های شناخته شده قبلی و نقاط داغ جهش خیز ژن می‌باشد. با بررسی مقالاتی که تا کنون در ارتباط با جهش‌های ژنتیکی عامل تیروزیمی نوع یک صورت گرفته بود به این نتیجه رسیدیم که بیشتر جهش‌های ژن FAH در اگزون‌های ۷-۱۰ و ۱۳-۱۴ و نواحی مرزی اینترون‌ی آنها گزارش شده است. بنابراین احتمالاً با تکثیر این نواحی و توالی‌یابی آنها احتمال می‌رفت بتوان جهش عامل بیماری را شناسایی کرد. به منظور تکثیر نواحی مورد نظر می‌باید آغازگرهای اختصاصی این نواحی را طراحی نمود، به طوری که محل‌های شناسایی دیگری در ژنوم انسان نداشته باشند و قطعات غیر اختصاصی ایجاد نکنند. از طرفی در طراحی این آغازگرها باید این نکته را در نظر گرفت که قطعات تکثیر یافته به وسیله آغازگرها می‌باید نواحی مرزی اینترون‌ی (نوکلئوتیدهای ابتدایی و انتهایی اینترون) را نیز در بر بگیرند تا قابلیت شناسایی جهش‌هایی را که منجر به خطای پیرایش می‌شوند را نیز داشته باشند. در این تحقیق به منظور کاهش حداکثری هزینه تشخیص، اگزون‌های ۷ و ۸ که اینترون کوچکی آنها را از هم جدا می‌کرد به صورت یک قطعه و همینطور اگزون‌های ۹ و ۱۰ با اینترون بینابینی کوچک به صورت یک قطعه تکثیر پیدا کردند. توالی‌یابی با آغازگرهای رفت و برگشت هر قطعه امکان بررسی توالی هر دو اگزون و اینترون‌های مرزی را امکان‌پذیر می‌سازد. اگزون‌های ۱۳ و ۱۴ هر کدام به صورت یک

بیماری تیروزیمی نوع یک، بیماری غیر قابل علاج و با عوارض شدید بالینی است. افراد مبتلا به این بیماری و خانواده‌های آنها متحمل رنج بسیار زیاد ناشی از فشار اقتصادی و بار روانی شدید می‌باشند. از اینرو روش‌های تشخیص به موقع و پیشگیری در مورد این بیماری اهمیت بسیار زیادی دارد (۵)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و طراحی آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین کارایی آنها به منظور شناسایی جهش‌های ژن FAH عامل بیماری تیروزیمی نوع یک بود.

در صورت شناسایی و تشخیص افراد ناقل بیماری که عمدتاً خویشاوندان افراد مبتلا می‌باشند می‌توان با مشاوره صحیح تا حد امکان از ازدواج افراد هتروزیگوت و ناقل بیماری با یکدیگر جلوگیری کرد. از طرفی در مورد زوجینی که هر دو ناقل بیماری هستند می‌توان با انجام تشخیص قبل از تولد و یا تشخیص قبل از لانه‌گزینی از تولد افراد بیمار پیشگیری کرد (۵). شناسایی ناقلین تنها به روش ژنتیکی و با شناسایی جهش در توالی DNA قابل انجام است. با وجود این جهش‌های متنوعی برای این ژن در جمعیت‌های مختلف و در مناطق متفاوت ژن عامل بیماری (FAH) گزارش شده است (۹). با اندازه بزرگ ۳۳ کیلو بازی ژن، امکان تعیین توالی کل ژن با روش تعیین توالی سنکر امکان‌پذیر نمی‌باشد. با روش تعیین توالی نسل جدید امکان تعیین توالی کل ژن به طور یکجا قابل انجام است، ولی هزینه آن بالا می‌باشد و

تأیید شدند. در سه مورد جهش‌های ژنتیکی متفاوتی گزارش شد که دو مورد از آنها جهش‌های شناخته شده قبلی  $c.192 G>T$  و  $IVS12+5 G>A$  بودند و مورد دیگر یک جهش کشف نشده  $C.67T>C$  گزارش شد. جهش جدید در ۱۲۰ نفر دیگر از افراد همان جمعیت بررسی شد که در هیچ یک از آنها این جهش حضور نداشت (۱۶). الپلگ و همکاران تمامی ۱۳ نفر مبتلا به تیروزیمی نوع یک که از سال ۱۳۹۸-۱۳۹۷ در اسرائیل شناسایی شده بودند را از لحاظ جهش‌های مربوطه با روش تعیین توالی سنگر بررسی کردند. سه جهش از بررسی حاصل شناسایی شد، جهش  $IVS8-1G>C$  که در یک گروه بزرگ وابستگان فامیلی مسلمان مشاهده شد. جهش  $Pro261Leu$  که در بیماران یهودی مشاهده شد و جهش  $IVS12+5G>A$  که فقط در مبتلایان فرانسوی-کانادایی حضور داشت (۱۸).

در این پژوهش برخی از خانواده‌های دارای فرزندان مبتلا تمایل به همکاری نداشتند، لذا وارد مطالعه نشدند. با داشتن نمونه‌های بیشتر می‌توان کارایی آغازگرهای طراحی شده را بیشتر مورد ارزیابی قرار داد.

پیشنهاد می‌شود که آغازگرهای طراحی شده به منظور شناسایی جهش عامل بیماری در سایر جمعیت‌ها نیز به کار گرفته شوند تا کارایی آنها در تشخیص جهش بیشتر مورد ارزیابی قرار گیرد.

قطعه و جداگانه تکثیر یافتند. به منظور ارزیابی کارایی آغازگرهای طراحی شده در تشخیص جهش بیماری، چهار بیمار مبتلا به تیروزیمی نوع یک تحت مراقبت در بیمارستان امام سجاد به عنوان کنترل انتخاب گردید. تکثیر قطعات ژن، تعیین توالی و تجزیه و تحلیل نتایج منجر به شناسایی جهش  $C>T$  709 در ژن FAH گردید. این جهش از نوع بی‌معنی می‌باشد که رمز ۲۳۷ پروتئین فوماریل استواسات هیدرولاز را از آرژنین به رمز خاتمه (TGA) تغییر می‌دهد. در سان و همکاران بیمار مبتلا به تیروزیمی نوع یک را در کشور ترکیه از لحاظ عامل ژنتیکی و تظاهرات بالینی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه برای شناسایی جهش‌های مسبب بیماری از ریزآرایه استفاده شد. در این مطالعه ۱۲ جهش مختلف در ۳۲ نفر مبتلا، عامل بیماری گزارش گردید. دو مورد از مبتلایان این تحقیق جهش  $C>T$  709 که در این مطالعه نیز عامل بیماری بود را نشان دادند. مطابق پژوهش‌های ما در مقالات این جهش تا کنون غیر از ترکیه در جمعیت دیگری گزارش نشده است (۷). ایجاز و همکاران سه بیمار مبتلا به تیروزیمی نوع یک که در طول یک سال و نیم ثبت و شناسایی شده بودند را از لحاظ جهش‌های ژنتیکی بررسی کردند. دو بیمار مبتلا به فرم حاد بودند و از بین رفتند. با این حال بررسی بر روی نمونه خونی آنها انجام گرفت. در این مطالعه همانند مطالعه حاضر، با روش تعیین توالی مستقیم کلیه اگزونها و نواحی مرزی اینترونی-اگزونی تعیین توالی شد و جهش‌های به دست آمده با تکنیک RFLP

## نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد آغازگرهای طراحی شده به طور مقرون به صرفه و به خوبی قادرند جهت شناسایی افراد ناقل بیماری و همین‌طور تشخیص قبل از تولد بیماری تیروزیمیای نوع یک مورد استفاده قرار گیرند. همچنین با توجه به این که همه بیماران یک نوع جهش ( $C>T$  709) را نشان دادند به نظر می‌رسد این جهش با اثر اجدادی در زمان گذشته اتفاق افتاده است، لذا افراد نسبتاً قابل توجهی ناقل این بیماری در جمعیت استان کهگیلویه و بویراحمد وجود دارد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی مقطع دکترای تخصصی با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1398.093 دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد، همچنین از ریاست محترم مرکز گیاهان دارویی و کارشناسان آن مرکز به پاس همکاری کمال تقدیر و تشکر را داریم.

## REFERENCES

1. Bergman AJ, Bergman AJ, van den Berg IE, Brink W, Poll-The BT, Ploos van Amstel JK, Berger R. Spectrum of mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene of tyrosinemia type 1 patients in northwestern Europe and Mediterranean countries. *Hum Mutat* 1998; 12(1): 19-26.
2. Chakrapani A, Gissen P, McKiernan P. Disorders of tyrosine metabolism. In: Saudubray J-M, van den Berghe G, Walter JH (editors). *Inborn metabolic diseases: Diagnosis and Treatment*. Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter JH (editors). Springer Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012; 265-76.
3. De Laet C, Dionisi-Vici C, Leonard JV, McKiernan P, Mitchell G, Monti L, et al. Recommendations for the management of tyrosinaemia type. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013; 8: 8.
4. Phaneuf D, Lambert M, Laframboise R, Mitchell G, Lettre F, Tanguay RM. Type I hereditary tyrosinemia. Evidence for molecular heterogeneity and identification of a causal mutation in a French Canadian patient. *The Journal of Clinical Investigation* 1992; 90(4): 1185-92.
5. Van Spronsen FJ, Smit GP, Wijburg FA, Thomasse Y, Visser G, Heymans HS. Tyrosinaemia type I: considerations of treatment strategy and experiences with risk assessment, diet and transplantation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1995; 18(2): 111-4.
6. Van Vliet D, Van Dam E, Van Rijn M, Derks TG, Venema-Liefaard G, Hitzert MM, et al. Infants with Tyrosinemia Type I: Should phenylalanine be supplemented? *JIMD* 2015; 117: 18-24.
7. Dursun A, Ozgul RK, Sivri S, Tokatli A, Guzel A, Mesci L, et al. Mutation spectrum of fumarylacetoacetase gene and clinical aspects of tyrosinemia type I disease. *JIMD Rep* 2011; 1: 17-21.
8. Rootwelt H, Berger R, Gray G, Kelly DA, Coskun T, Kvittingen EA. Novel splice, missense, and nonsense mutations in the fumarylacetoacetase gene causing tyrosinemia type I. *American Journal of Human Genetics* 1994; 55(4): 653-8.
9. Rootwelt H, Hoie K, Berger R, Kvittingen EA. Fumarylacetoacetase mutations in tyrosinaemia type I. *Human Mutation* 1996; 7(3): 239-43.
10. Imtiaz F, Rashed MS, Al-Mubarak B, Allam R, El-Karakasy H, Al-Hassnan Z, et al. Identification of mutations causing hereditary tyrosinemia type I in patients of Middle Eastern origin. *Molecular Genetics and Metabolism* 2011; 104(4): 688-90.
11. Maksimova NR, Gurinova EE, Sukhomyasova AL, Danilova AL, Kaimonov VS, Savvina MT, et al. A novel homozygous mutation causing hereditary tyrosinemia type I in yakut patient in Russia: case report. *Wiadomosci I Ekarskie* 2016; 69(2Pt 2): 295-8.
12. Dreumont N, Poudrier JA, Bergeron A, Levy HL, Baklouti F, Tanguay RM. A missense mutation (Q279R) in the fumarylacetoacetate hydrolase gene, responsible for hereditary tyrosinemia, acts as a splicing mutation. *BMC* 2001; 2: 9.
13. Angileri F, Bergeron A, Morrow G, Lettre F, Gray G, Hutchin T, et al. Geographical and ethnic distribution of mutations of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in hereditary tyrosinemia Type I. *JIMD* 2015; 43: 19-58.
14. Zeybek AC, Kiykim E, Soyucen E, Cansever S, Altay S, Zubarioglu T, et al. Hereditary tyrosinemia Type I in Turkey: twenty year single-center experience. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society* 2015; 57(2): 281-9.
15. St-Louis M, Leclerc B, Laine J, Salo MK, Holmberg C, Tanguay RM. Identification of a stop mutation in five Finnish patients suffering from hereditary tyrosinemia type I. *Human Molecular Genetics* 1994; 3(1): 69-72.
16. Ijaz S, Zahoor MY, Imran M, Afzal S, Bhinder MA, Ullah I, et al. Direct sequencing of FAH gene in Pakistani tyrosinemia type I families reveals a novel mutation. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 2016; 29(3): 327-32.
17. Hahn SH, Krasnewich D, Brantly M, Kvittingen EA, Gahl WA. Heterozygosity for an exon 12 splicing mutation and a W234G missense mutation in an American child with chronic tyrosinemia Type I. *Human Mutation* 1995; 6(1): 66-73.
18. Elpeleg ON, Shaag A, Holme E, Zughayar G, Ronen S, Fisher D, et al. Mutation analysis of the FAH gene in Israeli patients with tyrosinemia type I. *Human Mutation* 2002; 19(1): 1-80.

# Design of Polymerase Chain Reaction Initiators and Their Function to Identify FAH Mutations in Type I Tyrosinemia

Keshtkari A<sup>1</sup>, Samanpour S<sup>1</sup>, Hosseini SE<sup>2</sup>, Hassanzadeh S<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, <sup>2</sup>Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, <sup>3</sup>Department of Internal, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 07 May 2019 Accepted: 03 Sep 2019

## Abstract

**Background & aim:** Tyrosinemia is a recessive autosomal genetic disease due to the defect of fumaryl acetoacetate hydrolase (FAH). About 40 pathogenic mutations have been reported for this gene. The aim of the present study was to determine and design polymerase chain reaction primers and their ability to identify FAH gene mutations causing type I tyrosinemia.

**Methods:** In the present case-control study, 12 patients were recruited and divided into two equal groups: first six patients with type I tyrosinemia and second group six patients without informed consent. Blood samples were taken. Then, the DNA was extracted. The polymerase chain reaction initiator was designed for parts of the gene which reported in previous studies of the mutation. The specificity of primers designed with online databases was evaluated. Gene fragments were amplified by polymerase chain reaction. Then the amplified fragments were sequenced after purification. Finally the sequenced regions analyzed by Vector NTI software.

**Results:** Designed primers amplified FAH gene segments specifically and sequencing of amplified segments revealed +709 C>T mutation in exon 10 of FAH gene. The patient's parents were carriers of this genetic mutation. In the control group no mutation was found in the FAH gene.

**Conclusion:** The nonsense mutation 709 C> T is a pathogenic mutation in the FAH gene that was previously reported only in Turkey. The designed primers were cost-effective and specifically able to amplify the FAH gene. These primers can also be used to identify carriers of the disease as well as prenatal diagnosis of type I tyrosinemia.

**Keywords:** Type I Tyrosinemia, Genetic Diagnosis, Sequencing, Chain Reaction

---

\*Corresponding author: Hassanzadeh S, Department of Internal, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: Sajad.hassanzadeh@gmail.com

## Please cite this article as follows:

Keshtkari A, Samanpour S, Hosseini SE, Hassanzadeh S. Design of Polymerase Chain Reaction Initiators and Their Function to Identify FAH Mutations in Type I Tyrosinemia. *Armaghane-danesh* 2020; 24(5): 820-829