

بررسی بیان ژن اینوزین تری فسفات پیروفسفوهیدرولاز در سلول‌های K562

یاسمین دانایی^۱، مهرداد بهمنش^{۲*}، مجید صادقی زاده^۳

۱- دانشجوی فوق لیسانس، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۱

دریافت مقاله: ۸۶/۷/۹

چکیده

هدف: تحقیق ما بیان ژن *ITPA* را به عنوان یک عامل زمینه‌ساز ایجاد اختلالات ژنتیکی مشاهده شده در این سلول‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: برای ارزیابی بیان ژن مورد نظر از روش RT-PCR نیمه کمی استفاده و برای بررسی صحت عملکرد محصول ژن *cDNA* های به دست آمده کlon و تعیین توالی شد. پروتئین‌های حاصل از *cDNA* ها با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی از نظر ساختمانی پیشگویی و مقایسه شدند.

نتایج: نتایج حاصل از پیش بینی ساختمانی بیانگر آن است که *mRNA* جدا شده قادر به کد کردن پروتئینی است که فاقد کارایی لازم در اتصال به سوپسترا و انجام واکنش آنزیمی است. با توجه به لزوم تشکیل دایمر برای فعالیت طبیعی پروتئین، عملکرد مونومر طبیعی *ITPase* نیز در هنگام تشکیل هتروداایمر تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بنابراین به نظر می‌رسد که عمل آنزیمی *ITPase* در سلول‌های K562 طبیعی نبوده و می‌توان آن را به عنوان یک عامل زمینه‌ساز ناپایداری ژنتیکی در این سلول‌ها در نظر گرفت.

نتیجه‌گیری: بررسی بیان ژن در سلول‌های K562 نشان داد که در مقایسه با بیان ژن کنترل داخلی *GAPDH*، *ITPA* بیانی در حد متوسط در این سلول‌ها داشته و دو نوع رونوشت در این سلول‌ها تولید می‌کند. یکی از آنها حاصل پردازش طبیعی *hnRNA* اولیه است ولی رونوشت دوم دارای یک حذف ۵۱ نوکلئوتیدی در ناحیه کد کننده *mRNA* است. به نظر می‌رسد که این رونوشت حاصل یک پیرایش نادر در سلول است.

کلیدواژگان: اکسیداتیو دامیناسیون، آسیب به *DNA*، *ITPA*، *dITP*.

۱- مقدمه

گزارش‌های روزافزونی در زمینه تأثیر آسیب به *DNA* یا اختلال در ترمیم این آسیب‌ها در ایجاد بیماری‌های مختلف ژنتیکی و غیر ژنتیکی انسان از جمله بیماری‌های تحلیل رونده سیستم عصبی (*Neurodegenerative disease*)، اتوایمن (*Autoimmune*)، قلب و سرطان‌های مختلف [۱-۳] وجود دارند.

یکی از انواع مهم آسیب‌ها به مواد ژنتیکی اکسیداتیو دامیناسیون (*Oxidative deamination*) است [۱۱-۱۳] که نه تنها در سطح *DNA* ژنومی (*Genomic DNA*)، بلکه در سطح نوکلئوتیدهای آزاد داخل سیتوزول (*Cytosol*) نیز روی می‌دهد. روند

تمامی سلول‌های زنده اعم از یوکاریوت (*Eukaryote*) و پروکاریوت‌ها (*Prokaryotes*) به‌طور روزمره در معرض انواع آسیب‌ها به مواد ژنتیکی *DNA*، *RNA* [۱] و سایر مولکول‌های بیولوژیکی [۲] سازنده‌شان قرار دارند. از سوی دیگر تمامی سلول‌های زنده دارای سیستم‌های ترمیمی هستند که هر کدام در ترمیم انواع خاصی از آسیب‌ها به مواد ژنتیکی کارایی دارند. عوامل فیزیکی و شیمیایی و همچنین رادیکال‌های فعال اکسیژن (*Reactive Oxygen Species: ROS*) از مهم‌ترین منابع آسیب به مواد ژنتیکی و ایجاد جهش (*Mutation*) در آنها است.

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، بخش زیست‌شناسی، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵.

اکسیداتیو دامیناسیون تحت شرایط فیزیولوژیکی در داخل سلول‌ها و به مقدار کم روی داده و یا به واسطه تأثیر عوامل جهش‌زا (Mutagenic agents) مانند اشعه ماورای بنفش (UV: Ultraviolet) یا اکسید نیتروژن (Nitric Oxide: NO) شدت وقوع چشمگیری پیدا می‌کند. دامیناسیون روندی است که طی آن گروه آمین موجود روی بازهای پورین (Purine) یا پیریمیدین (Pyrimidine) DNA و RNA به گروه کتو (Keto group) تبدیل می‌شود. این تغییر شیمیایی باعث تغییر توانایی تشکیل جفت باز طبیعی در این بازهای طبیعی می‌شود. بررسی‌ها نشان داده که باز آلی هیپوگزانتین (Hypoxanthine) که حاصل دامیناسیون آدنین (Adenine) است، علاوه بر تایمین (Thymine) توانایی تشکیل جفت باز با سیتوزین (Cytosine) را داراست. باز گزانتین (Xanthine) نیز که به واسطه دامیناسیون گوانین (Guanine) ایجاد می‌شود، علاوه بر سیتوزین توانایی تشکیل جفت باز با آدنین را دارد. این نوکلئوتیدهای غیر عادی می‌توانند توسط پلیمرها به ساختمان DNA و RNA وارد شده و علاوه بر افزایش خطر جهش‌زایی باعث ایجاد ناپایداری در ساختمان و اختلال در عملکرد آن‌ها شوند [۱۴، ۱۳].

از سوی دیگر، تمامی سلول‌های زنده به سیستم‌های محافظتی و ترمیمی متنوعی مجهز هستند که مواد ژنتیکی آن‌ها را از ایجاد آسیب محافظت می‌کنند. در سطح مخزن نوکلئوتیدی آنزیم اینوزین تری فسفات پیروفسفو هیدرولاز (ITPase: Inosine Triphosphate Pyrophosphohydrolase) عهده‌دار تبدیل نوکلئوتیدهای d/ITP و XTP به شکل متوفسفات آن‌ها و پیروفسفات (PPi) است [۱۵-۱۹]. اما این آنزیم فعالیت بسیار ناچیزی در هیدرولیز (Hydrolysis) سایر نوکلئوتیدهای عادی مانند d/ATP و d/GTP دارد. ژن ITPA (Inosine Triphosphate Pyrophosphohydrolase gene) (EC3.6.1.19) با طولی حدود ۱۴kb، روی بازوی کوچک کروموزوم ۲۰ قرار داشته و cDNA به طول ۱/۸kb را کد می‌کند. cDNA این ژن در قسمت کد کننده پروتئین (Open Reading Frame: ORF) ۵۸۴ نوکلئوتید طول داشته، قادر به کد کردن پروتئینی با ۱۹۴ اسید آمینه است. خانواده ژنی ITPA (Gene family) در بسیاری از موجودات زنده شناسایی شده و ساختمان پروتئین ITPase و مکانیسم عمل آن در گونه‌های مختلف مانند باکتری و بویژه انسان مشخص شده است. ارتولوگ (Ortholog) ژن ITPA به اسامی Hap 1 در مخمر [۲۰]، rdgB در اشرشیاکلی [۲۱] و آنزیم NTPase در متانوکوکوس جاناشی

کاهش یا حذف کامل عملکرد ژن ITPA در ایجاد واکنش نسبت به داروهای آنالوگ بازهای پورینی (Azathiopurine) نقش دارد، که به عنوان مهارکننده ایمنی (Immunosuppressive) در مبتلایان به بیماری‌های اتوایمن یا لوسمی‌ها (Leukemia) استفاده می‌شود. از سوی دیگر، گزارش‌هایی مبنی بر افزایش غلظت ITP، سوبسترای این آنزیم در گلبول‌های قرمز (Erythrocytes) گروهی از افراد مبتلا به عقب ماندگی شدید ذهنی (Sever mental retardation) و همچنین مبتلایان به اسکیزوفرنی (Schizophrenic disorder) به ویژه از نوع پارانوئید (Paranoid) آن وجود دارد [۲۲-۲۹].

ایکلی نول (Null) برای ژن rdgB شواهدی دال بر افزایش جهش و ناپایداری در DNA را نشان داده و همراهی آن با جهش در سایر ژن‌های درگیر در سیستم ترمیم DNA مانند RecA (Recombinase A) و RecABC سبب مرگ سلول می‌شود [۲۰]. به نظر می‌رسد اختلال در عملکرد این ژن می‌تواند زمینه‌ساز ایجاد ناپایداری ژنتیکی (Genetic instability) در سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت شود. گزارش‌های بسیاری در مورد وجود و نقش اختلالات ساختمانی و عملکردی در ژنوم بسیاری از انواع سرطان‌ها وجود دارد. یکی از انواع مهم این دسته از سرطان‌ها انواع مختلف لوسمی‌ها مانند CML (Chronic Myelogenous Leukemia)، ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) و CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia) است. بسیاری از افراد مبتلا به سرطان خون از نوع CML دارای انواع مختلفی از ناهنجاری‌های ساختمانی و عددی در ساختار ژنوم خود هستند که از شاخصترین آن‌ها می‌توان از وجود ترانسلوکاسیون ABL-BCL (Translocation) و تشکیل کروموزوم فیلادلفیا (Philadelphia chromosome) نام برد. سلول‌های K562 اولین بار از فردی مبتلا به سرطان خون CML جدا شده و بررسی‌ها نشان دهنده وجود انواع ناهنجاری‌های ژنتیکی در این رده سلولی است. بنابراین با توجه به اینکه به وجود آمدن ناهنجاری‌های ساختمانی بیانگر ناپایداری مواد ژنتیکی و ناکارآمدی سیستم‌های ترمیم

RT-PCR در (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) استفاده شد. برای بررسی بیان ژن به صورت نیمه کمی در مقایسه با کنترل داخلی بیان ژن در چرخه‌های متفاوت بررسی و پس از ارزیابی نتایج روی ژل، بهترین چرخه به تعداد ۳۰ برای بررسی بیان ژن مورد نظر و کنترل داخلی آن انتخاب شد. مبنای انتخاب براساس نرسیدن به وضعیت ثابت در تکثیر محصول PCR بود. چرخه‌های PCR استفاده شده به ترتیب عبارت بود از در ابتدا ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه که با ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، برای اتصال (Annealing) ۵۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در ۳۰۰ ثانیه انجام شد. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) به مدت ۳۰ دقیقه، مشاهده و عکسبرداری شد. برای ارزیابی کمی بیان ژن‌ها از مقایسه شدت چگالی باندهای ژن نسبت به کنترل داخلی و از نرم‌افزار Image Gauge نسخه ۳/۱ استفاده شد.

۲-۴- کلون کردن cDNA ژن ITPA

قطعات حاصل از تکثیر cDNA ژن در بررسی بیان ژن با استفاده از کیت (Bioneer) از ژل استخراج و پس از کلون کردن در ناقل (T-T Vector) (Fermentas) کلونی‌های سفید نوترکیب متقل شده در باکتری DH5 α با استفاده از محیط کشت انتخابی حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین (Ampicillin) و در حضور ۴۰ میکرولیتر (۲۰ درصد W/V) از x-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) و ۵ میکرو لیتر (۲۰ درصد W/V) IPTG (Isopropyl- β -D-galactoside) انتخاب شدند. برای تأیید کلونینگ (Cloning) و تأیید اندازه قطعه کلون شده از کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی ITPA استفاده شد. کلونی‌های حاوی قطعات مورد نظر از نظر اندازه انتخاب و پس از تکثیر پلاسمیدهای (Plasmids) نوترکیب و استخراج آن‌ها با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Bioneer)، برای تعیین توالی ارسال شدند.

۲-۵- آنالیز نتایج

برای بررسی توالی‌های به دست آمده و مقایسه توالی‌های به دست آمده و هم ردیفی آن‌ها از نرم‌افزارهای Generunner نسخه ۳/۰۵ و Clustal W نسخه ۱/۸۳ استفاده شد. برای بررسی چگونگی انجام پیرایش (Splicing) از سایت SpliceSiteFinder و برای پیشگویی ساختمان پروتئینی از Cn3D نسخه ۴/۱، RasWin

DNA است و با توجه به نقش کلیدی ژن ITPA در سیستم ترمیم، در این تحقیق، بیان این ژن به عنوان عامل زمینه‌ساز احتمالی در ایجاد ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های سرطانی K562 مطالعه شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت سلول

سلول‌های K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640، در حضور ۱۰ درصد FCS (Fetal calf serum)، و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (Streptomycin) (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) به تعداد ۱۰^۶ در فلاسک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۹۶ ساعت کشت داده شدند. سلول‌ها پس از رشد تا حدود ۸۰ درصد سطح فلاسک، توسط تریپسین (Trypsin) جدا شده و شمارش شدند. پس از یک بار شستشو با بافر سالین (Saline buffer) تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج RNA و ساختن cDNA

از ظرف سلول‌های K562 با استفاده از محلول RNA extraction solution (RNA) (Cinnagen)، RNA کل استخراج و کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز و اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. از ۵ میکروگرم RNA کل با استفاده از الیگومر تیمیدین (Oligo-dT) به عنوان آغازگر (Primer) برای ساختن cDNA استفاده شد. ساختن cDNA با استفاده از کیت مربوط (Cinnagen) و طبق دستور شرکت سازنده آن انجام شد.

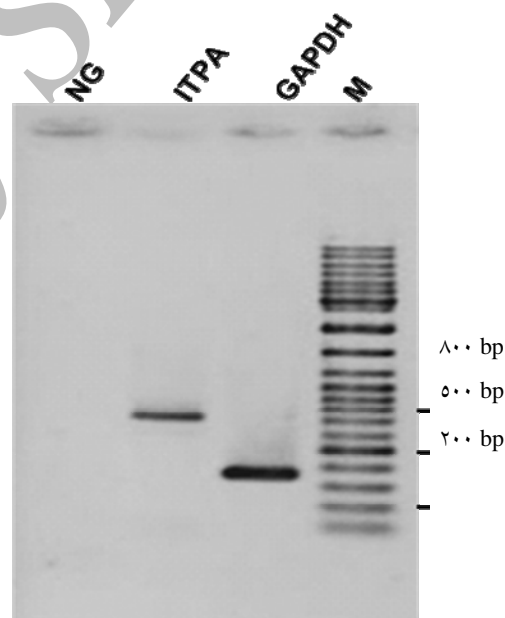
۲-۳- بررسی بیان ژن

به منظور بررسی بیان ژن از دو دسته آغازگرهای اختصاصی جلوایی (Forward primer) [۱-۵] 5'-GTAACCGGGGATCACCATGGC-3' (Reverse primer) و برگشتی 5'-AGACAGGCCGGTGAGGCTACTTG-3' ژن ITPA استفاده شد [۲-۳]. به عنوان کنترل داخلی از آغازگرهای اختصاصی جلوایی 5'-CCAGCCGAGCCACATCGCTC-3' و برگشتی 5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3' برای تکثیر cDNA ژن خانه‌دار (House keeping) GAPDH

Molecular و Swiss-Model استفاده شد.

۳- نتایج

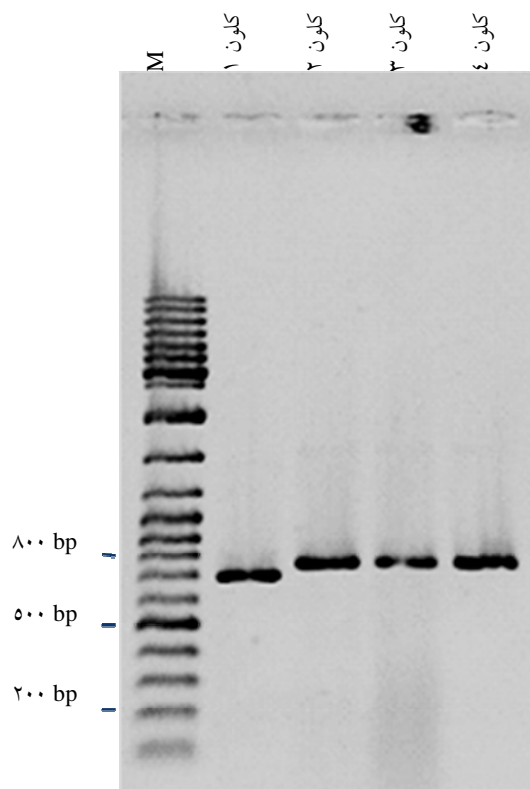
در این تحقیق بیان ژن *ITPA* در رده سلولی K562 به عنوان عامل بالقوه ایجاد کننده ناپایداری ژنتیکی بررسی شد. بدین منظور پس از کشت دادن سلول‌ها تا سطح هم‌آوری (Confluence) ۸۰ درصد، RNA کل از آن‌ها استخراج و برای ساخت کتابخانه cDNA استفاده شد. با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی (Semi-quantitative RT-PCR) و در مقایسه با بیان کنترل داخلی *GAPDH* بیان ژن *ITPA* مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). براساس این بررسی ژن *ITPA* در این رده سلولی بیان شده و در مقایسه با کنترل داخلی از بیان متوسطی برخوردار بود.



شکل ۱ بررسی بیان ژن *ITPA* در سلولهای K562. cDNA ژن *ITPA* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و به عنوان کنترل داخلی از بیان ژن *GAPDH* برای مقایسه بیان استفاده شد. M نشانگر و NG کنترل منفی آزمایش است.

برای اطمینان از صحت توالی ORF در cDNA ژن *ITPA* باند به دست آمده از ژل استخراج و در ناقل T سباب کلون (Sub-cloning) در حین بررسی محققان حاضر متوجه باند دیگری در نزدیکی باند اصلی مورد انتظار از cDNA ژن شدند که با وجود تکرار آزمایش، باند همواره ظاهر شده و ظاهر پهن‌تری به آن می‌داد. برای تعیین هویت آن، این باند نیز از ژل استخراج و در ناقل T سباب کلون شد.

پس از انجام واکنش الحاق (Ligation)، باکتری DH5 α با محصول آن ترانسفورم شد. کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب و با استفاده از کلونی PCR و آغازگرهای عمومی انتخاب شدند (شکل ۲). در نهایت دو نوع کلونی باکتریایی از نظر اندازه حاوی قطعه کلون شده به دست آمد. نوع اول حامل قطعه‌ای بود که از نظر اندازه مطابق با اندازه مورد انتظار ۷۴۵ جفت بازی از cDNA ژن *ITPA* بود. اما نوع دوم دارای قطعه‌ای با حدود ۵۰ جفت باز کوتاه‌تر بود. برای اطمینان از ماهیت قطعه آزمون کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *ITPA* تکرار شد. نظر به تکرار شدن نتایج، پلاسمیدها پس از تکثیر از باکتری‌ها جدا شده و برای تعیین توالی ارسال شدند. آنالیز توالی به دست آمده نشان داد که قطعه بزرگ‌تر دقیقاً مشابه با ایزوفرم I از cDNA ژن *ITPA* در ناحیه تکثیر شده بوده و قادر به کد کردن پروتئین کامل است. قطعه کوتاه‌تر نیز مشتق از ژن *ITPA* بوده اما دارای یک حذف شدگی در قسمتی از ناحیه ORF نسبت به توالی ایزوفرم I است. این ناحیه دربرگیرنده قسمت انتهایی اگزون ۱ و شروع اگزون ۲ بود که تحت عنوان ایزوفرم II نامگذاری شد (شکل ۳).



شکل ۲ نتایج حاصل از کلونی PCR در کلونی‌های باکتریایی حاوی cDNA کلون شده از ژن *ITPA* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *ITPA* انجام شده‌اند. کلون شماره ۱ کاهش اندازه مشخصی را نسبت به سایر کلون‌ها نشان می‌دهد. برای تعیین ماهیت قطعات کلون شده، پلاسمیدهای آنها خالص و برای تعیین توالی ارسال شد.

فرم ۱	GGGGATCACC ATGGCGCCT CATTGGTGGG GAAGAAGATC GTGTTTGTAA CGGGGAACGC CAAGAAGCTG GAGGAGGTCG TTCAGATTCT AGGAGATAAG	۱۰۰
فرم ۲	GGGGATCACC ATGGCGCCT CATTGGT-----CG TTCAGATTCT AGGAGATAAG	۴۹
پروتئین	M A A S L V G K K I V F V T G N A K K L E E V V Q I L G D K	۳۰
	* *	
فرم ۱	TTTCCATGCA CTTGGTGGC ACAGAAAATT GACCTGCCGG AGTACCAGGG GGAGCCGGAT GAGATTTCCA TACAGAAATG TCAGGAGGCA GTTCGCCAGG	۲۰۰
فرم ۲	TTTCCATGCA CTTGGTGGC ACAGAAAATT GACCTGCCGG AGTACCAGGG GGAGCCGGAT GAGATTTCCA TACAGAAATG TCAGGAGGCA GTTCGCCAGG	۱۴۹
پروتئین	F P C T L V A Q K I D L P E Y Q G E P D E I S I Q K C Q E A V R Q	۶۳
	* *	
فرم ۱	TACAGGGGCC CGTGCTGTT GAGGACACTT GTCTGTGCTT CAATGCCCTT GGAGGGCTCC CCGGCCCTA CATAAAGTGG TTTCTGGAGA AGTTAAAGCC	۳۰۰
فرم ۲	TACAGGGGCC CGTGCTGTT GAGGACACTT GTCTGTGCTT CAATGCCCTT GGAGGGCTCC CCGGCCCTA CATAAAGTGG TTTCTGGAGA AGTTAAAGCC	۲۴۹
پروتئین	V Q G P V L V E D T C L C F N A L G G L P G P Y I K W F L E K L K P	۹۷
	* *	
فرم ۱	TGAAGGTCTC CACCAGCTCC TGGCCGGGTT CGAGGACAAG TCAGCCTATG CGCTCTGCAC GTTTGCACTC AGCACCGGG ACCCAAGCCA GCCCGTGC GC	۴۰۰
فرم ۲	TGAAGGTCTC CACCAGCTCC TGGCCGGGTT CGAGGACAAG TCAGCCTATG CGCTCTGCAC GTTTGCACTC AGCACCGGG ACCCAAGCCA GCCCGTGC GC	۳۴۹
پروتئین	E G L H Q L L A G F E D K S A Y A L C T F A L S T G D P S Q P V R	۱۳۰
	* *	
فرم ۱	CTGTTTCAGGG GCCGGACCTC GGGCCGGATC GTGGCACCCA GAGGCTGCCA GGACTTTGGC TGGGACCCTT GCTTTCAGCC TGATGGATAT GAGCAGACGT	۵۰۰
فرم ۲	CTGTTTCAGGG GCCGGACCTC GGGCCGGATC GTGGCACCCA GAGGCTGCCA GGACTTTGGC TGGGACCCTT GCTTTCAGCC TGATGGATAT GAGCAGACGT	۴۴۹
پروتئین	L F R G R T S G R I V A P R G C Q D F G W D P C F Q P D G Y E Q T	۱۶۳
	* *	
فرم ۱	ACGCAGAGAT GCCTAAGGCG GAGAAGAACG CTGTCTCCCA TCGCTTCCGG GCCCTGCTGG AGCTGCAGGA GTACTTTGGC AGTTTGGCAG CTTGACTTCT	۶۰۰
فرم ۲	ACGCAGAGAT GCCTAAGGCG GAGAAGAACG CTGTCTCCCA TCGCTTCCGG GCCCTGCTGG AGCTGCAGGA GTACTTTGGC AGTTTGGCAG CTTGACTTCT	۵۴۹
پروتئین	Y A E M P K A E K N A V S H R F R A L L E L Q E Y F G S L A A	۱۹۴
	* * *	

شکل ۳ هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ایزوفرم I, II, cDNA های جدا شده از سلول‌های K562 و توالی پروتئین‌های حاصل از آنها. قسمت نقطه‌چین بیانگر قسمت حذف شده در توالی cDNA ایزوفرم II ژن *ITPA* است. با وجود این ناحیه حذف شده ۱۷ اسید آمینه‌ای، ۷ تا ۲۳ در پروتئین وجود نخواهد داشت. اسیدهای آمینه درگیر در اتصال سوبسترا با انجام عمل آنزیمی پروتئین با ستاره مشخص شده‌اند.

برای پیرایش در این ناحیه از قاعده GG-TG استفاده شده که جزء موارد نسبتاً نادر علائم مورد استفاده برای انجام پیرایش است. توالی‌های mRNA به دست آمده با شماره‌های دستیابی EF213026 و EF199841 (Access numbers) در بانک ژن در (National Center for Biotechnology Information) NCBI ثبت شدند.

برای بررسی و پیشگویی اثر قسمت حذف شده روی ساختمان و عملکرد پروتئین ITPase ساختمان پروتئین‌های حاصل از ایزوفریم I و II پیشگویی و با هم مقایسه شد. در ایزوفریم II، قسمت حذف شده شامل ۵۱ نوکلئوتید بود که کد کننده قسمت اصلی رشته β (β -strand) اول و قسمت زیادی از مارپیچ آلفا (α -helix) دوم مونومر پروتئین شامل اسید آمینه‌های ۷ تا ۱۶ است (شکل ۴).

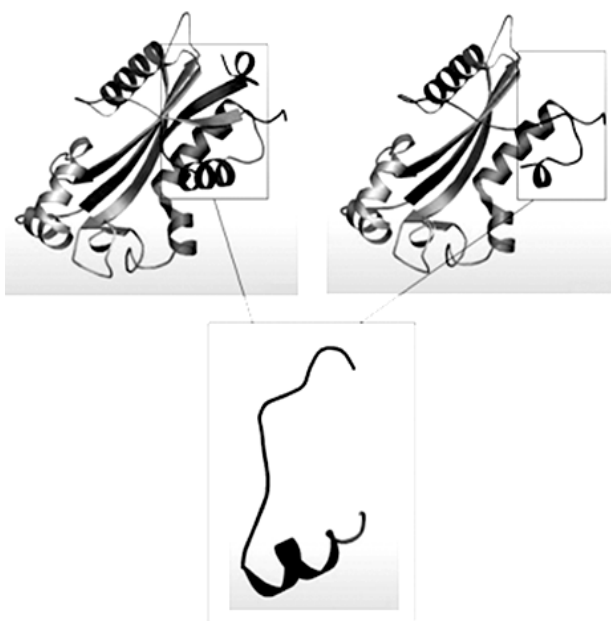
۴- بحث

در این تحقیق از آنجا که نقش ژن *ITPA* مقابله با آسیب‌های ناشی از اکسیداتیو دامیناسیون، جلوگیری از وقوع جهش‌های بازی و در نهایت جلوگیری از ناپایداری ژنتیکی است، بیان ژن *ITPA* که عهده‌دار حذف نوکلئوتیدهای پورینی غیرعادی از مخزن نوکلئوتیدی در سلول‌ها است؛ به عنوان یک عامل محتمل مستعد کننده ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های K562 بررسی شد.

بدین منظور در ابتدا بیان شدن ژن توسط آغازگرهای اختصاصی و با کمک روش RT-PCR و در مقایسه با بیان ژن کنترل داخلی *GAPDH* بررسی شد. مطالعات قبلی نمایانگر بیان این ژن در تمامی بافت‌های انسانی [۱۷] و در مقادیر متفاوت است. بیان این ژن در سلول‌های سفید خون محیطی در افراد طبیعی مقداری متوسط در مقایسه با کنترل داخلی دارد، بنابراین به نظر نمی‌رسد که سطح بیان ژن در سلول‌های K562 تغییر جدی کرده باشد.

اما در بررسی نتایج باند حاصل از بررسی بیان ژن توسط RT-PCR یک واریته (Variety) جدید mRNA علاوه بر mRNA اصلی شناسایی و جداسازی شد که دارای یک حذف در قسمت ابتدایی ORF. mRNA در ناحیه‌ای به طول ۵۱ نوکلئوتید بود. بررسی DNA ژنومی سلول‌های K562 نشان داد که هیچ حذفی در ژنوم روی نداده است؛ بنابراین به نظر می‌رسد که واریته جدید حاصل عملکرد سیستم پیرایش سلولی باشد. از سوی دیگر نظر به استفاده از الیگومر تیمیدین برای ساخت کتابخانه cDNA

برای بررسی چگونگی ایجاد این واریانت، توالی cdNAهای به دست آمده ایزوفریم I و II و همچنین توالی ژن *ITPA* ارزیابی شد. نتایج نشان دهنده این بود که در ساختمان ژن، ایترون اول، طولی معادل ۳۵۵۱ نوکلئوتید داشته که با احتساب نواحی اگزونی حذف شده به قریب ۳/۶ کیلو باز افزایش می‌یابد، که ناحیه‌ای وسیع است. در صورت صحت فرضیه وجود چنین حذفی با استفاده از DNA ژنومی و آغازگر اختصاصی اگزون‌های اول و سوم امکان تکثیر ناحیه با توجه به ساختمان ژن *ITPA* وجود داشت (۲۵۰~ جفت باز). عدم توفیق در تکثیر این ناحیه نشان داد که حذف در DNA ژنومی روی نداده است. بنابراین توالی cdNAهای به دست آمده ایزوفریم I و II را در نواحی مرتبط با پیرایش بین اگزون‌های ۱ و ۲ و توالی ایترون ۱ ژن با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی بررسی شدند. بررسی‌ها نشان داد که cdNA ایزوفریم I توسط مکانیسم طبیعی و بر اساس قاعده GU-AG در ایترون‌ها، پیرایش ایترونی برای آن صورت گرفته است. اما برای تولید ایزوفریم II، در تمامی ایترون‌ها از قاعده مشابه ایزوفریم I (GU-AG) استفاده شده به جز پیرایش در ایترون اول که در آن قسمتی از توالی داخلی اگزون اول به عنوان دهنده پیرایش (Splicing donor) و توالی داخلی اگزون II به عنوان گیرنده پیرایش (Splicing acceptor) عمل کرده است.



شکل ۴ ساختار سوم مونومر کامل و مونومر دارای حذف و ساختار سوم قطعه حذف شده را نشان می‌دهد. قسمت حذف شده شامل یک مارپیچ آلفا و قسمت اعظم اولین صفحه بتای پروتئین است.

مونومر مشکلی نداشته و مانند دو مونومر طبیعی به هم متصل می‌شوند. از سوی دیگر؛ مطالعات نشان داده که انجام واکنش آنزیمی بر عهده اسیدهای آمینه‌های Asp-41، Lys-19، Asn-116 و Glu-44 است. در هنگام عمل هیدرولازی دم سه فسفات نوکلئوتیدهای سوستررا در مجاورت Asp-41، Lys-19، Asn-16 قرار گرفته و در حضور یون Mg^{2+} که در نزدیکی فسفات‌های β و γ قرار می‌گیرد و با همکاری Glu-44 واکنش آنزیمی را انجام می‌دهد. تمامی این اسیدهای آمینه در سایر پروتئین‌های خانواده ITPase (Ham1) نیز کاملاً حفظ شده‌اند [۳۲، ۳۱، ۲۱، ۲۰]. در حالی که پروتئین حاصل از این واریته جدید mRNA جدا شده در این تحقیق، فاقد اسیدهای آمینه کلیدی Lys-19 و Asn-16 است. قسمت حذف شده شامل ۱۷ اسید آمینه از Gly-7 تا Val-23 است که رشته بتا و قسمتی از مارپیچ آلفای اول پروتئین را شامل می‌شود. این حذف باعث تغییر کلی ساختمان پروتئین از حالت مخلوط (mixed) به آلفا-بتا می‌شود. این تغییر ساختار ناشی از تغییر درصد مارپیچ آلفا و رشته بتا روی می‌دهد و باعث تغییر ساختمان عمده در محل اتصال سوستررا به پروتئین و محل انجام عملکرد آنزیمی آن می‌شود.

با توجه به اطلاعات موجود در مورد ساختمان و مکانیسم عمل آنزیم ITPase می‌توان پیش بینی کرد که به رغم عدم وجود جهش در قسمت عمده‌ای از پروتئین و عدم امکان انجام واکنش هیدرولازی به دلیل حذف موجود در ساختمان پروتومر حاصل از ایزوفرم II، آنزیم ITPase در سلول‌های K562 به مقدار زیادی کاهش می‌یابد (شکل ۴). دلیل این امر آن است که باتوجه به لزوم تشکیل دایمر برای آنزیم و وجود دو نوع پروتومر (طبیعی و دارای حذف)، سه نوع دایمر طبیعی - طبیعی، طبیعی - جهش یافته (Mutant) و جهش یافته - طبیعی - جهش یافته در سلول امکان شکل گرفتن دارد. از آنجایی که اسیدآمینه‌های حذف شده در جایگاه شناسایی سوستررا و جایگاه عمل آنزیم قرار گرفته‌اند، به نظر می‌رسد فعالیت پروتئین در این دو حالت اخیر نسبت به حالت اول تغییر جدی پیدا کرده یا کامل از بین خواهد رفت. این در حالی است که در سایر جهش‌های شناسایی شده برای این پروتئین تغییر تنها یک اسیدآمینه در محل اتصال سوستررا یا در محل انجام واکنش آنزیمی باعث کاهش فعالیت به مقدار ۱۰-۶۰ درصد مقدار طبیعی می‌شود [۲۲-۳۷].

تحقیقات قبلی نشان داده که اختلال در عملکرد ژن *ITPA* باعث وارد شدن اینوزین به ساختمان DNA و RNAهای سلول می‌شود که علاوه بر تغییر در قابلیت ترجمه شدن، روی ساختمان و سرعت

از سلول‌های K562 و دانستن این موضوع که داشتن پلی (Poly-A) A در انتهای mRNAهای یوکاریوتی علامت لازم و کافی برای ترجمه شدن mRNA در سلول‌های یوکاریوت است، به نظر می‌رسد که واریته جدید دارای توانایی کد کردن پروتئین باشد. بررسی در بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که واریته مشابهی از بافت سرطانی روده بزرگ جداسازی شده است. بنابراین برای درک تأثیر وجودی این ایزوفرم II و یافتن مکانیسم تأثیر ترجمه آن در سلول، با استفاده از کنار هم قرار دادن توالی‌ها و استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی در دسترس، ساختمان پروتئینی که می‌تواند بیان کند، پیشگویی و با ساختمان فرم طبیعی آن مقایسه شد. بررسی چهارچوب کد کننده ایزوفرم II جدا شده مشخص کرد که حذف شناسایی شده هیچ‌گونه جهش تغییر چهارچوبی را به وجود نمی‌آورد و پروتئینی که ایجاد می‌کند دارای یک حذف ۱۷ اسیدآمینه‌ای در انتهای آمینی پروتئین است.

تا کنون سه عضو از خانواده Ham1 شامل پروتئین hITPase در انسان و ارتولوگ‌های آن به ترتیب به نام Mj0226 و Yjx در متانوکوکوس جاناشی و اشرشیاکلی که فعالیت اینوزین تری فسفاتازی دارند [۱۶، ۱۷، ۲۰، ۳۰]، کریستالوگرافی (Crystallography) شده‌اند [۲۱، ۳۱]. هم ردیفی توالی آمینواسیدی این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که جایگاه‌های اتصال به سوستررا در این پروتئین‌ها در طول تکامل از حفظ شدگی بالایی برخوردار هستند. بررسی‌های قبلی و همچنین اطلاعات مربوط به کریستالوگرافی، مکانیسم عمل کاتالیکی را در آنزیم ITPase وابسته به دو عامل کلیدی می‌داند. اول آنکه وجود ارتباط بین دو مونومر آنزیم در انجام واکنش آنزیمی بسیار مهم است. تحقیقات نشان داده است که فعالیت آنزیم در افراد هتروزایگوت (Heterozygote) برای جهش P32T و در پروتئین هتروداایمر حدود ۲۵ درصد مقدار طبیعی است این در حالی است که محل این جهش در نزدیکی محل فعال آنزیم قرار داشته و ربطی به نحوه اتصال دو پروتومر (Protomer) ندارد و این تغییر فعالیت به واسطه مکانیسم تنظیمی آلوستریک (Allosteric) بین دو پروتومر است. در صورت اتصال سوستررا به یک پروتومر و انجام واکنش هیدرولازی توسط آنزیم، تغییرات ساختمانی را ایجاد می‌کند که از طریق قسمت ارتباط دهنده دو زیر واحد به پروتومر دوم منتقل و آن را آماده پذیرش سوستررا و انجام واکنش می‌کند [۳۱]. از این رو اختلال در اتصال سوستررا یا عدم توانایی انجام واکنش به واسطه وجود جهش در ساختمان یکی از پروتومرهای آنزیم باعث غیر فعال شدن یا کاهش شدید فعالیت آنزیمی می‌شود. پروتئین حاصل از ایزوفرم II شناسایی شده در محل ارتباط بین دو

توجه به مطالعه انجام شده فعالیت آنزیم ITPase در سلول‌های K562 از مقدار طبیعی برخوردار نیست و با توجه به وجود ناپایداری و اختلالات ژنتیکی در این سلول‌ها، می‌توان نقص در فعالیت این آنزیم را به‌عنوان یک دلیل احتمالی وجود ناپایداری ژنتیکی و افزایش فراوانی جهش‌های ژنتیکی در این سلول‌ها در نظر گرفت. با توجه به نتایج این تحقیق بررسی عملکرد این ژن در نمونه‌های سرطان‌ها و بیماری‌های ناشی از ناپایداری ژنتیکی جالب توجه خواهد بود.

تخریب آن نیز تأثیر جدی دارد و باعث افزایش قابل توجه خطر جهش‌های زیستی مستقیم در DNA از نوع جابجایی بازها (Base substitution mutation) می‌شود. بررسی‌های اخیر نشان داده که اختلال در مکانیسم پیرایش hnRNA (Heterogeneous nuclear RNA) یا ایجاد محصولات متفاوت حاصل از پیرایش غیر عادی می‌تواند به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های بالقوه در ایجاد بیماری‌های انسانی و سرطان دخیل باشد [۳۸-۴۳].

۵- منابع

- [1] Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* 2000; S159 (3): 173-8.
- [2] Baser ME. The distribution of constitutional and somatic mutations in the neurofibromatosis 2 gene. *Hum Mutat* 2006; 27: 297-306.
- [3] Ichihashi M. UV-induced skin damage and photo-allergic disease. *Arerugi* 2007; 56: 670-8.
- [4] Kane JM, Shears LL, Hierholzer C, Ambs S, Billiar TR, Posner MC. Chronic hepatitis C virus infection in humans: induction of hepatic nitric oxide synthesis and proposed mechanisms for carcinogenesis. *J Surg Res* 1997; 69: 321-4.
- [5] Kirby J, Heath PR, Shaw PJ, Hamdy FC. Gene expression assays. *Adv Clin Chem* 2007; 44: 247-92.
- [6] Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of Disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3: 713-20.
- [7] Mathers JC, Coxhead JM, Tyson J. Nutrition and DNA repair--potential molecular mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 425-31.
- [8] Morawiec Z, Janik K, Kowalski M, Stetkiewicz T, Szaflik J, Morawiec-Bajda A, Sobczuk A, Blasiak J. DNA damage and repair in children with Down's syndrome. *Mutat Res* 2007; 3: 34-56.
- [9] Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 2005; 25: 1-7.
- [10] Spry M, Scott T, Pierce H, D'Orazio JA. DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Front Biosci* 2007; 1: 4191-207.
- [11] Ramsahoye BH, Davies CS, Mills KI. DNA methylation: biology and significance. *Blood Rev* 1996; 10: 249-61
- [12] Jackson-Grusby L, Jaenisch R. Experimental manipulation of genomic methylation. *Semin Cancer Bio* 1996; 7: 261-8.
- [13] Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden, CD, Jenner P, Halliwell B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 1997; 69: 1196-203.
- [14] Weissman L, Jo DG, Sorensen MM, de Souza-Pinto NC, Markesbery WR, Mattson MP, Bohr VA. Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5545-55.
- [15] Van Dieren JM, van Vuuren AJ, Kusters JG, Nieuwenhuis EE, Kuipers EJ, Vander Woude CJ. ITPA genotyping is not predictive for the development of side effects in AZA treated inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2005; 54(11): 1664.
- [16] Behmanesh M, Sakumi K, Tsuchimoto D, Torisu K, Ohnishi-Honda Y, Rancourt DE, Nakabeppu Y. Characterization of the structure and

- expression of mouse Itpa gene and its related sequences in the mouse genome. *DNA Res* 2005; 12: 39-51.
- [17] Lin S, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, Wu C, Liu W, Yuan Y, Tang, R. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *J Biol Chem* 2001; 276: 18695-701.
- [18] Duley JA, Simmonds HA, Hopkinson DA, Levinsky RJ. Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in: a kindred with adenosine deaminase deficiency. *Clin Chem Acta* 1990; 188: 243-52.
- [19] Berman EJ, Nash WG, Seuanez HN, O'Brien SJ. Chromosomal mapping of enzyme loci in the domestic cat: GSR to C2, ADA and ITPA to A3, and LDHA-ACP2 to D1. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 41: 114-20.
- [20] Bradshaw JS, Kuzminov A. RdgB acts to avoid chromosome fragmentation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1711-25.
- [21] Zheng J, Singh VK, Jia Z. Identification of an ITPase/XTPase in *Escherichia coli* by structural and biochemical analysis. *Structure* 2005; 13: 1511-20.
- [22] Atanasova S, Shipkova M, Svinarov D, Mladenova A, Genova M, Wieland E, Oellerich M, Von Ahsen N. Analysis of ITPA phenotype-genotype correlation in the Bulgarian population revealed a novel gene variant in exon 6. *Ther Drug Monit* 2007; 29: 6-10.
- [23] Arenas M, Duley J, Sumi S, Sanderson J, Marinaki A. The ITPA c.94C>A and g.IVS2+21A>C sequence variants contribute to missplicing of the ITPA gene. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 96-102.
- [24] De Ridder L, Van Dieren JM, Van Deventer HJ, Stokkers PC, Van der Woude JC, Van Vuuren AJ, Benninga MA, Escher JC, Hommes DW. Pharmacogenetics of thiopurine therapy in paediatric IBD patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1137-41.
- [25] Von Ahsen N, Armstrong VW, Behrens C, Von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, Stein J, Bias P, Adler G, Shipkova M. Association of inosine triphosphatase 94C>A and thiopurine S-methyltransferase deficiency with adverse events and study drop-outs under azathioprine therapy in a prospective Crohn disease study. *Clin Chem* 2005; 51: 2282-8.
- [26] Breen DP, Marinaki AM, Arenas M, Hayes PC. Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 826-33.
- [27] Marinaki AM, Duley JA, Arenas M, Ansari A, Sumi S, Lewis CM, Shobowale-Bakre M, Fairbanks L D, Sanderson J. Mutation in the ITPA gene predicts intolerance to azathioprine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23: 1393-7.
- [28] Shichijo S, Azuma K, Komatsu N, Kawamoto N, Takedatsu H, Shomura H, Sawamizu H, Maeda Y, Ito M, Itoh K. Identification of two novel tumor-associated antigens recognized by HLA-B46-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int J Mol Med* 2003; 12: 895-902.
- [29] Seifert R, Gether U, Wenzel-Seifert K, Kobilka BK. Effects of guanine, inosine, and xanthine nucleotides on beta(2)-adrenergic receptor/G(s) interactions: evidence for multiple receptor conformations. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 348-58.
- [30] Kasai M, Onishi H, Watanabe S. The nucleoside triphosphate (NTP)-induced superprecipitation and NTPase reaction of chicken gizzard actomyosin as a function of the NTP concentration. *J Biochem* 1981; 89: 87-101.
- [31] Stenmark P, Kursula P, Flodin S, Graslund S, Landry R, Nordlund P, Schuler H. Crystal structure of human inosine triphosphatase.

- Substrate binding and implication of the inosine triphosphatase deficiency mutation P32T. *J Biol Chem* 2007; 282: 3182-7.
- [32] Galperin MY, Moroz OV, Wilson KS, Murzin AG. House cleaning, a part of good housekeeping. *Mol Microbiol* 2006; 59: 5-19.
- [33] Biera uJ, Bakker JA, Lindhout M, Van Gennip AH. Determination of ITPase activity in erythrocyte lysates obtained for determination of TPMT activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2006; 25: 1129-32.
- [34] Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, Wieland E, Von Ahsen N. Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. *Clin Chem* 2006; 52: 240-7.
- [35] Maeda T, Sumi S, Ueta A, Ohkubo Y, Ito T, Marinaki AM, Kurono Y, Hasegawa S, Togari H. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Mol Genet Metab* 2005; 85: 271-9.
- [36] Marsh S, King CR, Ahluwalia R, McLeod HL. Distribution of ITPA P32T alleles in multiple world populations. *J Hum Genet* 2004; 49: 579-81.
- [37] Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, Thein SL, Ansari A, Sanderson J, De Abreu RA. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet* 2002; 111: 360-7.
- [38] Barlati S, Barbon A. RNA editing: a molecular mechanism for the fine modulation of neuronal transmission. *Acta Neurochir Suppl* 2005; 93: 53-7.
- [39] Kozak M. Lessons (not) learned from mistakes about translation. *Gene* 2007; 12: 33-8.
- [40] Kralovicova J, Vorechovsky I. Global control of aberrant splice-site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exon and intron definition. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(19):6399-413.
- [41] Edwards TM, Myers JP. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1264-70.
- [42]. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 749-61.
- [43] Lundell K, Thulin P, Hamsten A, Ehrenborg E. Alternative splicing of human peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta): effects on translation efficiency and trans-activating ability. *BMC Mol Biol* 2007; 8:70.