Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۴، زمستان ۹۰، صفحات ۲۳۳ تا ۲۳۷

Original Article

به کار گیری روش High Resolution Melting در شناسایی چند شکلی‌های نوکلئوتیدی ژرم لاین ژن STK11 در مبتلایان به انواع سرطان‌های دستگاه گوارش

سید جمال حسینی[۱]، علی ناظمی[۲]، مهرداد هاشمی[۳]، میرساعد میری نرگسی[۴]، شهر آشوب شریفی[۵]

[۱] پژوهشگرعضو انجمن زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن
[۲] استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
[۳] دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران پزشکی
[۴] دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
[۵] کارشناس ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن

چکیده

سابقه و هدف: *آنالیز HRM (High Resolution Melting) تکنیکی است که میزان کاهش فلورسنت را در طی فرایند شیب حرارتی دوب DNA در اثر خروج رنگ اندازه‌گیری می‌نماید. ژن STK11 یکی از پروتئین‌های خانواده سرین- ترئونین کیناز سلولی را رمز می‌نماید که تنظیم کننده قطبیت سلولی بوده و همچنین به عنوان پروتئین مهار کننده تومور عمل می‌نماید. موتاسیون‌های ژرم لاین در این ژن همراه با سندروم Peutz-Jeghers واستعداد ابتلاء به انواع نئوپلازی‌ها می‌باشند.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، DNA ژنومی از ۵۶ بیمار مبتلا به انواع سرطان‌های دستگاه گوارش استخراج گردید. سپس ما تغیرات نوکلئوتیدی را در تمام طول ژن با استفاده از تکنیک Real-time PCR و High(HRM) resolution melting بررسی نمودیم.*

یافته‌ها: *غربالگری نوکلئوتیدی با تکنیک HRM دو نوع SNP در اینترون‌های ۶ و ۷ در ۱۰ بیمار را نشان داد. ۴ بیماردارای تغییر نوکلئوتیدی C/T [cluster id/dsSNP/rs9282860] در اینترون ۶ به صورت هموزیگوس و شش بیمار دارای تغییر نوکلئوتیدی C/G [cluster id/dsSNP/rs2075607] در اینترون ۷ بصورت هتروزیگوس بودند. همچنین مقایسه نتایج HRM با نتایج تعیین توالی یک مطابقت ۱۰۰ درصدی را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *هر چند در این مطالعه موتاسیونی در بخش اگزون ژن مشاهده نگردید، به هر حال نتایج این مطالعه نشان می‌دهد غربالگری اولیه ژن STK11 هم برای شناسایی تغییرات نوکلئوتیدی ناشناخته ژرم لاین و هم سوماتیک در مبتلایان به نئوپلازی به منظور تشخیص علت بیماری از طریق روش HRM به سهولت و با هزینه نسبتا اندک قابل اجراء می‌باشد.*

واژگان کلیدی: *ژن STK11 ، موتاسیون‌های ژرم لاین، High resolution melting*

مقدمه

HRM (High Resolution Melting) روشی جدید و همگن بعد از تکثیر PCR است که در یک لوله دربسته انجام می‌شود. این روش آنالیز تغییرات ژنتیکی (SNPs ، موتاسیون‌ها و متیلاسیون‌ها) در محصولات PCR را مقدور می‌سازد. HRM نمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و حجم GC متمایز می‌سازند. آنالیز HRM شامل تکثیر ژن موردنظر در قطعات bp ۲۵۰-۸۰ در واکنشی است که محتوی رنگ متصل شونده به DNA دو رشته‌ای فلورسنت می‌باشد. بعد از PCR محصولات واکنشی متصل شده به تدریج دناتوره (ذوب)

آدرس نویسنده مسئول: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دکتر علی ناظمی
(**email**: a_nazemi@tonekaboniau.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۵/۲۷

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شوند و نتیجه‌اش کاهش فلورسنس است. شکل منحنی ذوب با تفکیک بالای (HRM) ایجاد شده برای توالی‌های DNA متفاوت بسیار متغیر بوده، به طوری که قادر به تمایز امپلیکون‌هایی که حداقل در یک جفت باز متفاوتند، خواهیم بود. آنالیز HRM می‌تواند برای تشخیص تغییرات ژنتیکی کوچک مانند پلی‌مورفیسم‌های نوکلئوتیدی منفرد دخول‌ها، حذف‌ها و واژگونی‌ها به کار رود (۱).

در مقایسه با تکنولوژی‌های دیگر شناسایی SNP همانند تعیین توالی (Sequencing)، DHPLC (Denaturing high pressure liquid chromatography) و DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)، روش HRM بسیار آسان‌تر، ارزان‌تر و با صرف زمان و مصرف واکنش‌گرهای بسیار کمتر در مقایسه با DHPLC وDGGE می‌باشد. علاوه بر این، آنالیز HRM نوعی روش لوله دربسته (closed-tube) می‌باشد که خطر آلودگی محصولات PCR را به میزان زیادی کاهش می‌دهد. از آنجایی که آنالیز HRM روش غیرمخربی است، بنابراین می‌تواند محصولات واکنش HRM را بدون هیچ تکثیر و خالص‌سازی اضافی مستقیما تعیین توالی نمود (۲،۳).

ژن STK11 یا LKB1 در سال ۱۹۹۸ بوسیله آنالیز پیوستگی در سندروم Peutz-Jeghers syndrome (PJS) به عنوان ژن مهار کننده تومور جدید کشف گردید (۴). PJS نوعی اختلال اتوزومال غالب نادر با نفوذ کاهش یافته می‌باشد که ابتدا در یک خانواده دانمارکی بوسیله Peutz در سال ۱۹۲۱ میلادی و سپس توسط Jeghers و همکارانش در ۱۹۴۹ میلادی توصیف گردید. در این بیماری علاوه بر پیگمان‌های مخاطی- جلدی و پولیپوز هامارتوماتوس معده‌ای-روده‌ای خطر بروز تومورهای خوش‌خیم و بدخیم در اندام‌های گوارشی و سایر اندام‌ها از جمله سینه، روده، بیضه، سرویکس، ریه، پانکراس و پوست به مقدار زیادی افزایش می‌یابد. میزان غیر فعال شدن ژن STK11 در بیماران PJS، ۹۱ درصد می‌باشد که ۷۸ درصد در اثر موتاسیون نقطه‌ای و ۱۳ درصد در نتیجه حذف رخ می‌دهد (۵، ۴).

ژن STK11 در کروموزوم 19p13.3 دارای فعالیت سرین/ترئونین کینازی می‌باشد. این ژن در یک ناحیه ۲۳ کیلوبازی گسترش یافته و حاوی ۹ اگزون رمزکننده و یک اگزون اضافی غیر رمزکننده می‌باشد. mRNAی این ژن، ۲/۴ کیلو جفت باز طول داشته و در جهت تلومر به سانترومر رونویسی می‌گردد. محصول ترجمه این ژن، یک پروتئین ۴۳۳ اسیدآمینه‌ای با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتون می‌باشد. این پروتئین دارای یک سیگنال استقراریابی در انتهای آمین (اسیدهای آمینه ۴۳-۳۸) و یک دومین کینازی (اسیدهای آمینه ۳۰۹-۴۹) می‌باشد (۴، ۶).

ژن STK11 در تمامی بافت‌های بدن، چه در دوره جنینی و چه در افراد بالغ، به ویژه در بافت‌هایی نظیر کبد، پانکراس، بیضه و عضله اسکلتی بیان می‌شود. محصول ژن STK11 اولین کیناز بالادستی برای AMPK (Adenine Monophosphate-activated Protein Kinase) می‌باشد که بطور آلوستریک با اتصال به یک سودوکیناز به نام STRAD و یک پروتئین آداپتور MO25 فعال می‌شود. مجموعه هترومریک STK11-STRAD-MO25 به عنوان یک واحد فعال بیولوژیکی قادر به فسفوریلاسیون و فعال‌سازی AMPK و حداقل ۱۲ کیناز دیگر می‌شود(۸،۷،۴). در حقیقت AMPK جزء ضروری در متابولیسم سلولی بوده که برای حفظ هموستازیس سلولی مورد نیاز می‌باشد. فعال شدن AMPK به وسیله STK11 منجر به مهار رشد و تکثیر سلولی در زمان کاهش سطح ماده غذایی می‌گردد. همچنین فعال‌سازی کینازهای مشابه AMPK به وسیله STK11 یک نقش حیاتی را در حفظ پلاریتی سلولی بازی می‌نماید که در نتیجه منجر به مهار گسترش سلول‌های توموری می‌گردد.

بنابراین این گونه استنباط می‌شود که ژن STK11 در قطبیت سلولی، متابولیسم، آپوپتوزیس وابسته به p53، توقف سیکل سلولی در G1 و تکثیر سلولی یک جزء ضروری است و در نتیجه نقص در این ژن علاوه بر بروز اختلال PJS منجر به بروز اختلالات متداولی از جمله دیابت و سرطان نیز می‌گردد (۹).

مواد و روشها

به منظور بررسی موتاسیون ژرم لاین ژن STK11 از سه مرکز بیمارستانی شامل بیمارستان امام خمینی تهران، بیمارستان جواهری تهران و بیمارستان بوعلی همدان نمونه خون کامل با رعایت اخلاق پزشکی از ۵۶ بیمار مبتلا به سرطان بافت‌های مختلف دستگاه گوارش با قومیت‌های مختلف در محدوده سنی ۴۵ تا ۸۰ سال تهیه گردید. نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره و برای استخراج DNA ژنومی مورد استفاده قرار گرفت.

DNA ژنومی از ۲۰۰ میکرولیتر خون کامل به وسیله کیت High pure PCR Template Preparation از کمپانی Roche طبق دستور العمل شرکت سازنده استخراج گردید.

به منظور تکثیر ۱۰ اگزون ژن STK11 از پرایمرهای مطالعه شده قبلی بر روی این ژن استفاده گردید (۱۰). ۲۰ جفت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- توالی پرایمری تمامی ۱۰ اگزون ژن STK11 و اندازه هر قطعه تکثیری در واکنشPCR

Gene	Exon	Sense primer	Antisense primer	Size amplicon(bp)
STK11	1	CGAGCTGATGTCGGTGGGT	ACAGCGTCTCCGAGTCCAG	193
STK11	2	ATCATCCTGACGTTGGGTCG	GGAGACGGGAAGAGGAGCAG	248
STK11	3	CCCTCCAGAGCCCCTTTT	CACGCTGTCCAGCATTTCC	161
STK11	4-5	CGGTGGCACCCTCAAAAT	GACCCCAGCCGACCAGAT	267
STK11	6	TGGGTCCAGAGGACACTCCC	CCCTTCCCGATGTTCTCAAA	291
STK11	7	CCGGCTTCTCCTCAGGGAT	TCTAGCGCCCGCTCAACC	174
STK11	8	CTGCTTCTGGGCGTTTGC	ACCGTGAAGTCCTGAGTGTAGAT	220
STK11	9	CTTGCCGTCTCCCTCCCA	TCCGCCCTGGATTTGGTG	151
STK11	10	GAGTCCGGTAGCCCCATGA	TGGTCGGCACAGAAGCATG	237

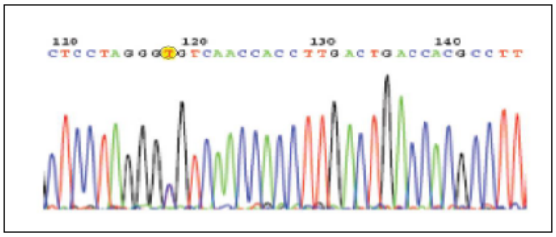
پرایمر مورد نظر توسط شرکت TAG Copenhagen سنتز گردید. جدول ۱ توالی پرایمری و اندازه هر قطعه تکثیری در واکنشPCR را نشان میدهد.

جهت بهینه سازی واکنش PCR و HRM واکنش PCR برای تمامی ۱۰ جفت پرایمر در شرایط یکسان زیر اجراء گردید. حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر و مخلوط واکنش حاوی ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱ میکرومول از هر یک از پرایمرها، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۱/۵ میلیمولار MgCl2، ۱۰ DMSO درصد، ۲/۵ واحد Hot Start Taq DNA polymerase (Promega) و ۲ میکرومول (Invitrogen) SYTO-9 بود. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقهای در ۹۵ درجه سانتیگراد و به دنبال آن ۴۰ سیکل حرارتی با ۹۵ درجه سانتیگراد ۲۵ ثانیه، ۵۰ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه همراه با جذب رنگ در کانال سبز و ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و HRM از ۷۵ درجه سانتیگراد تا ۹۳ درجه سانتیگراد با شیفت حرارتی ۰/۱°C/s انجام شد.

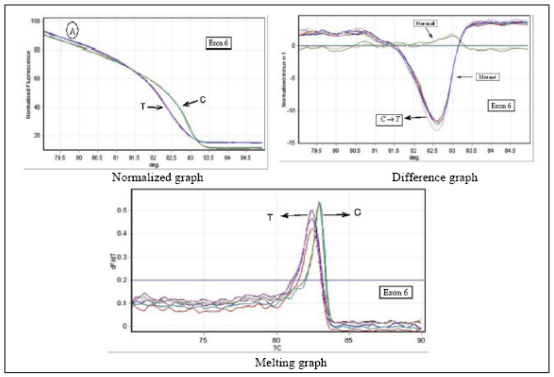
تمامی نمونهها و اگزونهایی که از طریق HRM تفاوت نوکلئوتیدی را نشان دادند و مواردی که تفاوت نوکلئوتیدی را نشان ندادند، با پرایمر Forward و نیز پرایمر Reverse توسط شرکت Macrogen(Korea) تعیین توالی شدند و تغییرات نوکلئوتیدی با DNA Sequencing تایید شد.

یافتهها

از ۵۶ بیمار مبتلا به سرطان بخشهای مختلف دستگاه گوارش به کمک تکنیک قدرتمند HRM گوناگونی نوکلئوتیدی (SNP) در اگزونهای ۶ و ۷ در ۱۰ بیمار شناسایی شد. نوع تغییر نوکلئوتیدی در هر قطعه سپس به کمک تکنیک تعیین توالی تعیین گردید. تمامی این SNPها در بخش غیر رمز کننده ژن یا اینترون واقع بوده و تاکنون هیچ پیوستگی ما بین آنها با بیماری در انسان گزارش نشده است. ۴ بیمار دارای تغییر نوکلئوتیدی C/T [cluster id/dsSNP/rs9282860] در اینترون ۶ بصورت هموزیگوس بودند که بر اساس دسته بندی SNP (۲) جزء کلاس ۱ میباشد و شش بیمار دارای تغییر نوکلئوتیدی C/G [cluster id/dsSNP/rs2075607] در اینترون ۷ بصورت هتروزیگوس بودند که جزء کلاس ۳ است. شکل ۱ تا ۴ تصویر HRM و تعیین توالی SNPs را نشان میدهد. نتایج تعیین توالی با تکنیک HRM کاملا در سایر نمونهها که تغییر نوکلئوتیدی مشاهده نگردید، یکسان بود.



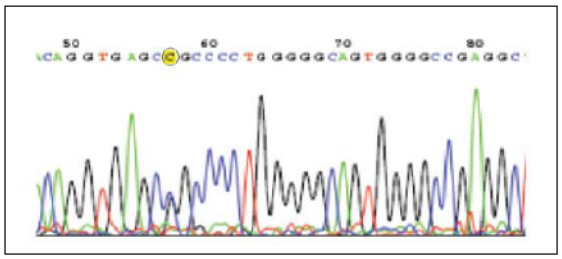
شکل ۱- نتایج تعیین توالی تغییرات نوکلئوتیدی در مرز اگزون/ اینترون ۶.



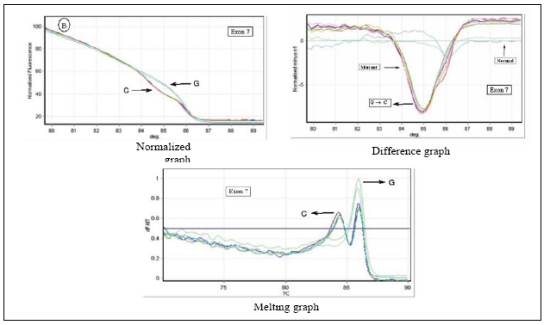
شکل ۲- نتایج HRM و منحنیهای حاصل از آن (normalized graph ، difference graph و Melting graph) در مورد ژن STK11 در مرز اگزون/ اینترون ۶ در دستگاه Rotor-gene 6000.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- نتایج تعیین توالی در مرز اگزون/ اینترون ۷.



شکل ۴- نتایج HRM و منحنی‌های حاصل از آن (normalized graph ، difference graph و Melting graph) در مورد ژن STK11 در مرز اگزون/ اینترون ۷ در دستگاه Rotor-gene 6000.

بحث

High-Resolution DNA Melting روش قدرتمند و جدیدی برای غربالگری گوناگونی نوکلئوتیدی می‌باشد. با وجود آنکه حساسیت و اختصاصیت این تکنیک به عوامل متعددی از جمله طول محصول PCR، نوع رنگ، غلظت Mg^{2+} و سایر عوامل بستگی دارد، اما ظاهرا نسبت به سایر روش‌ها شناسایی موتاسیون ناشناخته ارجحیت دارد. جذابیت در استفاده از این تکنیک در سهولت، دقت و سرعت عمل آن می‌باشد و همین طور نیازی به فرایندهای Post-PCR نبوده وخطر آلودگی ثانویه مطرح نیست (۱۱،۱). در این مطالعه به منظور بررسی توالی ژن STK11 در اگزون‌ها و مرز اگزون اینترون از تکنیک HRM استفاده شد. این بررسی مستقیما بر روی افراد نامشخص که تنها به سرطان دستگاه گوارشی مبتلا بودند، انجام گرفت. از ۵۶ فرد مبتلا، تنها ۱۰ مورد (۴ مورد در اینترون ۶ و ۶ مورد در اینترون ۷) دو نوع تغییر نوکلئوتیدی را نشان دادند که تاکنون پیوستگی بین آنها و بیماری گزارش نشده است. نتایج HRM با نتایج تعیین توالی محصول PCR کاملا مطابقت دارد.

ویژگی قابل توجه این تکنیک قابلیت تمایز افراد هموزیگوس و هتروزیگوس می باشد که از طریق Melting graph به سادگی قابل تشخیص است. همان طور که در شکل ۲ و ۴ مشاهده می‌شود، در هتروزیگوت‌ها دو پیک متفاوت و در هموزیگوت‌ها تنها یک پیک دیده می‌شود. همچنین حضور DMSO ۱۰ درصد در مخلوط واکنش با کاهش Tm حساسیت بیشتری را در شناسایی تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی در یک تغییر حرارتی ۰/۲°C/s را فراهم می‌نماید. هر چند در این مطالعه موتاسیون ژرم لاین در نواحی رمز کننده ژن STK11 این افراد تحت بررسی مشاهده نگردید، اما این به معنای عدم حضور موتاسیون ژن STK11 در بافت‌های سرطانی نمی‌باشد. به هرحال با توجه به نقش پیچیده و گسترده ژن STK11 در عملکرد سلول‌ها، مطالعات دیگری می‌تواند روی این ژن به‌طور ژرم لاین در مبتلایان به سایر بیماری‌ها از جمله دیابت انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی انجمن زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن اجراء گردیده است. نویسندگان این طرح از دکتر آرش جنابیان، دکتر محمود عباسی، محمد یعقوب طالقانی و روزبه طبیب که در جمع‌آوری نمونه‌ها به ما یاری رساندند، کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Taylor CF. Mutation scanning using high resolution melting. Biochem Soc Transact 2009; 37: 433-37.
2. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clin Chem 2004; 50: 1156–64.
3. Kristensen LS, Dobrovic A. Direct genotyping of single nucleotide polymorphisms in methyl metabolism genes using probe-free high-resolution melting analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17: 1240–47.
4. Fan D, Ma C, Zhang H. The molecular mechanisms that underlie the tumor suppressor function of LKB1. Acta Biochim Biophys Sin 2009; 41: 97–107.
5. Schumacher V, Vogel T, Leube B, Driemel C, Goecke T, Mo¨slein G, et al. STK11 genotyping and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. J Med Genet 2005; 42: 428–35.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Su GH , Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary Cancers. Am J Pathol 1999; 154: 1835-40.

7. Wang ZJ, Churchman M, Avizienyte E, Mckeown C, Davies S. Germline mutations of the LKB1(STK11) gene in Peutz-Jeghers patients. J Med Genet 1999; 36: 365-68.

8. Yoo JH, Choi YJ, Kang JG, Sun YK, Ki CS, Lee KA. A novol de novo mutation in the serine-threonine kinase STK11 gene in a Korean patient with Peutz-Jeghers syndrome. BMC Med Genet 2008; 9: 1-5.

9. Karuman P, Gozani O, Odze RD, Zhou XC, Zhu H. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. Mol Cell 2001; 7: 1307-19.

10. Meur NL, Martin C, Veber PS, Joly GR, Oise F, Lemoine M, et al. Complete germline deletion of the STK11 gene in a family with Peutz–Jeghers syndrome. Eur J Human Genet 2004; 12: 415–18.

11. Laurie AD, George PM. Evaluation of high-resolution melting analysis for screening the LDL receptor gene. Clin Biochem 2009; 42: 528–35.

www.SID.ir