بررسی شش جهش شایع ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز در بیماران فنیل کتونوری در استان گیلان

زینب خزائی کوهپر[1]*، نجمه رنجی[2]، افشین صفائی اصل[3]، ثریا شعبانی[4]

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۷/۰۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۱۲/۰۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: فنیل کتونوری (PKU) یک اختلال مادرزادی متابولیسم اسیدآمینه است که حاصل نقص فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) است. تاکنون بیش از ۸۰۰ موتاسیون در ژن *PAH* شناسایی‌شده و در پایگاه اطلاعاتی PAHdb ثبت گردیده است و طیف این موتاسیون‌ها در جمعیت‌های مختلف متفاوت است. تظاهر بالینی مهم بیماران درمان نشده عقب‌ماندگی شدید ذهنی است. هدف مطالعه فعلی شناسایی فراوانی ۶ موتاسیون شایع ژن *PAH* در بیماران PKU استان گیلان شامل p.R261Q, p.R252W, p.R261X, p.E280K, p.R243X, و p.P281L بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۲۵ بیمار PKU غیروابسته (۱ تا ۲۱ ساله، زن و مرد) در استان گیلان طی یک دوره یک‌ساله ثبت‌نام کردند. DNA ژنومی از لوکوسیت‌ها با استفاده از High Pure PCR Template Preparation Kit(Roche) استخراج شد و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-تعیین توالی برای شناسایی موتاسیون‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها: از ۶ موتاسیون موردمطالعه (p.R261Q, p.R252W, p.R261X, p.E280K, p.R243X, و p.P281L) ۲ موتاسیون در بیماران شناسایی شد. موتاسیون p.R261X بالاترین فراوانی (۲۲درصد) را در میان بیماران داشت و فراوانی موتاسیون p. R261Q نیز ۱۰درصد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: هرچند مطالعه حاضر فراوانی ۶ موتاسیون ژن PAH را بررسی کرده، این موتاسیون‌ها تنها در ۳۲ درصد کروموزوم‌ها یافت شده است. ازاین‌رو موتاسیون‌های مختلف، مسئول بیماری PKU در شمال ایران هستند و مطالعات بیشتر برای شناسایی تمام موتاسیون‌های ژن *PAH* در منطقه توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: جهش، فنیل آلانین هیدروکسیلاز، فنیل کتونوری، گیلان

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره اول، ص ۳۳-۲۴، فروردین ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران، تلفن: ۰۱۱۵۴۲۷۱۱۰۵

Email: khazaei@toniau.ac.ir

مقدمه

فنیل کتونوری (PKU) یکی از شایع‌ترین اختلالات مادرزادی متابولیسم اسیدآمینه در جهان است، آن یک اختلال ژنتیکی اتوزومال مغلوب است که به‌وسیله نقص در آنزیم کبدی فنیل آلانین هیدروکسیلاز ایجاد می‌شود (۱). نقص آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) منجر به افزایش سطح فنیل آلانین در خون و بافت‌های دیگر ازجمله مغز می‌گردد و در صورت عدم درمان موجب عقب‌ماندگی ذهنی می‌شود (۲). بر اساس اولین مطالعات انجام شده در بیماران مبتلا به PKU در ایران، فراوانی بالای بیماری (۵-۲/۱ درصد) در میان افراد عقب‌مانده ذهنی نشان داد که PKU می‌تواند یکی از علل اصلی عقب‌ماندگی ذهنی در جمعیت ایرانی باشد (۱). آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) دارای سه دامین ساختاری شامل یک دامین تنظیمی در انتهای آمین، یک دامین کاتالیتیک و یک دامین تترامریزاسیون در انتهای کربوکسیل می‌باشد (۳).. بر اساس غلظت فنیل آلانین خون، نقص PAH به سه گروه تقسیم می‌شود ۱-PKU کلاسیک که شدیدترین شکل بیماری است (. فنیل آلانین سرم بیشتر از ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر)۲-PKU خفیف (فنیل آلانین سرم ۱۲۰۰-۶۰۰ میکرو مول بر لیتر)۳- هایپر فنیل آلانینمیای خفیف (فنیل آلانین سرم کم‌تر از ۶۰۰ میکرومول بر لیتر)(۱). بر این اساس شدت

[1] استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران. (نویسنده مسئول)

[2] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

[3] دانشیار، گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، گیلان، ایران

[4] کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]

بیماری نیز از هایپر فنیل آلانینمی خفیف (mHPA) تا PKU کلاسیک متغیر است که از طریق سطح فنیل آلانین خون قبل از درمان یا تحمل غذایی شناسایی می‌گردد (۲). شیوع ۱ در ۱۰۰۰۰ تولد در سفیدپوستان دارد اما در میان جمعیت‌های مختلف متفاوت است. به‌عنوان‌مثال شیوعPKU در جمعیت ترکی حدود ۱ در ۲۶۰۰ و جمعیت فنلاندی ویهودی اشکنازی ۱ در ۲۰۰۰۰۰ است (۴ و ۱). برخی مطالعات در خانواده‌های ایرانی فراوانی بالای PKU را به علت میزان بالای ازدواج فامیلی در آن جمعیت نشان داده است (۵).PKU. درمان نشده اغلب منجر به اختلال در رشد شناختی، صرع، میکروسفالی، تشنج و مشکلات رفتاری می‌شود. تشخیص زودهنگام (قبل از ظهور علائم) PKU ضروری است مثل درمان زودهنگام با رژیم غذایی می‌تواند از پیامدهای مخرب آن جلوگیری کند (۵). ژن مسئول بیماری، *PAH* با طولی حدود ۹۰ کیلو باز روی کروموزوم 12q واقع شده و شامل ۱۳ اگزون و ۱۲ اینترون است. پروفایل موتاسیونی ژن *PAH* در سراسر کل دامین‌های ساختاری پراکنده بوده و نشان‌دهنده تنوع زیاد می‌باشد. جهش در ژن کدکننده PAH علت عمده بیماری PKU است (۲). موتاسیون‌های ژن *PAH* موجب کاهش فعالیت آنزیم PAH می‌شوند (۱) تاکنون بیش از ۸۰۰ جهش در ژن *PAH* شناسایی شده و در پایگاه اطلاعاتی PAHdb ثبت گردیده است (۶). که موتاسیونهای نقطه‌ای حدود ۹۰ درصد کل موتاسیونها را تشکیل می‌دهند (۱). طیف این موتاسیون‌ها در جمعیت‌های مختلف متفاوت است و شناسایی موتاسیون‌های شایع در هر منطقه مجزا برای تسهیل روش تشخیص قبل از تولد و مشاوره ژنتیکی ضروری می‌باشد (۷). تا کنون مطالعاتی که در مناطق مختلف ایران صورت گرفته جهش‌های p. R252W, p. E280K, p.R243X,p.P281L p. R261Q و p.R261X را با فراوانی‌های متفاوتی گزارش نموده است. به‌طوری‌که بیش‌ترین فراوانی مربوط به جهش‌های فوق در ایران به‌ترتیب ۱۹/۳درصد (۸ و ۱)، ۷/۴۱درصد (۵)، ۱۵/۳۸درصد (۹)، ۶/۴درصد (۱۰)، ۱۲/۸۶درصد (۱) و ۸درصد (۲) می‌باشد. لازم به ذکر است که جهشR261Q یک جهش شایع در دنیاست و دومین جهش شایع در ترکیه می‌باشد (۲). بعلاوه فراوانی آن در سایر کشورها مثل ایتالیا ۲۲/۵درصد، برزیل ۱۲/۲درصد، آلمان ۶درصد، کره ۰/۶درصد، لیتوانی ۰/۵درصد، پرتغال ۱۰/۴درصد، مصر ۱۱/۵درصد و کوبا ۱۵/۸درصد (۲) گزارش شده است. گرچه ایتالیا بالاترین فراوانی را برای جهش مذکور نشان می‌دهد اما در جمعیت این کشور جهش R261X ازفراوانی پایینی (۲درصد) برخوردار است (۲). با توجه به موارد فوق هدف از مطالعه حاضر، بررسی حضور موتاسیون‌های p.R261Q, p.R252W, p.R261X, p.E280K, p.R243X و p.P281L در ژن *PAH* در افراد مبتلا به PKU در استان گیلان بود.

مواد و روش کار

بیماران:

در این مطالعه مقطعی - توصیفی، ۲۵. بیمارPKU و غیر وابسته در یک دوره یک ساله از مناطق مختلف استان گیلان بعد از کسب مجوز اخلاق (از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به شماره IR.IAU.RASHT.REC.1397.138) مورد بررسی قرار گرفتند. لازم بذکر است خانواده‌هایی که بیش از یک فرزند مبتلا به PKU داشتند فقط یک بیمار از این خانواده در مطالعه شرکت داده شد. این بیمارا ن براساس پرونده‌های موجود در بیمارستان ۱۷ شهریور رشت (گیلان) انتخاب شدند. که از قبل بیماری آنان توسط پزشک متخصص تأیید شده بود. و بعد از کسب اجازه از والدین و تکمیل رضایتنامه،

از هر فرد بیمار به میزان ۵-۲ میلی‌لیتر خون‌گیری انجام شد و برای جلوگیری از انعقاد خون، نمونه‌های خون درون لوله‌های آغشته به EDTA جمع‌آوری شد و سپس به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان استفاده از آنها جهت استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استخراج DNA:

استخراج DNA با استفاده از Preparation Kit High Pure PCR Templateمحصول شرکت Roche-آلمان و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به این ترتیب: ابتدا بافر لایزیز و پروتئیناز K به نمونه‌های خونی افزوده شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه انکوبه شد. پس از آن ایزوپروپانول به هر نمونه افزوده شد و نمونه به ستون فیلتردار انتقال یافت. بعد از سانتریفوژ و دور ریختن محلول زیرین، بافر رها سازی به ستون اضافه گردید. بعد از سانتریفوژ و دور ریختن محلول زیرین، بافر شستشو شماره ۱ اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ، شستشو با بافر شستشو شماره ۲ صورت گرفت. بعد از سانتریفیوژ و دور ریختن محلول زیرین، از بافر رقیق سازی برای انحلال DNA و عبور از ستون استفاده شد. در انتها محتویات لوله زیرین حاوی DNA در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بررسی کمیت و کیفیت DNA به‌دست آمده از نانواسپکتروفتومتر (Thermo scientific, ,2000C,NanoDrop USA,) و ژل اگارز ۱/۵درصد استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

جهت انجام واکنش PCR، از کیت Your Taq™ PCR Mix,2x kit (Biotechrabbit, Germany)استفاده شد. بدین

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]

منظور DNA ژنومی و جفت پرایمر (پیکومول ۲۰) به مخلوط واکنش اضافه گردید و با آب استریل به حجم ۵۰ میکرولیتر رسید. میکروتیوب های حاوی اجزای واکنش، در دستگاه ترموسایکلر مدل TC-۴۰۰۰ (شرکت TECHNE–انگلستان) تحت برنامه دمایی ذیل قرار گرفت: دمای واسرشت شدن ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، تعداد سیکل‌های واکنش، ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل: دمای واسرشت شدن ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و نهایتاً در دمای طویل‌سازی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.. توالی پرایمر رفت: 5′ TGCCTAGCGTCAAAGCCTATGTCC 3′

و توالی پرایمر برگشت: 5′ CTGTGGACCAGCCAGCAATGAACC3′(۱۱) سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer، کره جنوبی صورت گرفت. طول محصول نهایی واکنش PCR در این مطالعه ۳۸۵ جفت باز بود.

الکتروفورز محصولات PCR:

برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و کیفیت آن، محصولات واکنش (نمونه‌های بیماران) به همراه مارکر ۱۰۰bp (Biotechrabbit)بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید (شکل ۱).

تعیین توالی:

جهت شناسایی جهش‌های موجود در قطعات تکثیر شده، محصولات PCR تعیین توالی شدند. تعیین توالی با استفاده از روش ختم زنجیره و توسط دستگاه سکوئنسر ABI3730 (شرکت ماکروژن کره جنوبی) انجام شد سپس از نرم‌افزارهای Chromas و CLC main work bench 5 جهت خوانش توالی‌ها و مقایسه نتایج دستگاه سکوئنسر با توالی رفرنس در سایت NCBI استفاده شد.

آنالیز آماری:

برای محاسبه فراوانی نسبی آلل ها از آمار توصیفی استفاده شد. بدین ترتیب که تعداد آلل های شناسایی شده برای یک جهش خاص بر تعداد کل آلل های مورد مطالعه برابر با فراوانی نسبی آن جهش می‌باشد. که در این مطالعه بصورت درصد نشان داده شده است.

یافته‌ها

فنوتیپ بیماران

بیماران HPA(۲۵ بیمار) مراجعه کننده به بیمارستان هفده شهریور رشت که توسط پزشک متخصص مورد تأیید قرار گرفتند. در مطالعه ما وارد شدندو درمواردی که خانواده‌ای بیش از یک فرزند مبتلا به PKU داشت، تنها یک بیمار از این خانواده وارد مطالعه شده و بقیه از مطالعه خارج شدند. بعلاوه. بیماران براساس سطح Phe قبل از درمان، در ۳ گروه PKU کلاسیک (۳۶درصد)، PKU خفیف (۳۲درصد) و HPA خفیف (۳۲درصد) قرار داشتند. و از نظر جنسیت شامل هم مرد و هم زن بوده و درمحدوده سنی ۱ تا ۲۱ سال قرار داشته‌اند. ترکیب قومیتی آن‌هانیز شامل گیلک (۷۶درصد)، تالش (۱۲درصد) و ترک (۱۲درصد) بود.

نتیجه کمی و کیفی DNA استخراج شده:

نانواسپکتروفتومتر کمیت و کیفیت DNA استخراج شده را از نمونه خون بیماران به‌ترتیب در محدوده ۱۰۰۲-۱۰۷ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ را در محدوده ۲-۱/۷۹ نشان داده است، که DNA استخراج شده با کمیت و کیفیت مذکور مناسب جهت انجام PCR می‌باشد.

الکتروفورز محصولات PCR:

همچنین تصویر الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و باند اختصاصی با طول bp ۳۵۸ درشکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج تعیین توالی:

در این مطالعه ۲۵ بیمار (۵۰ آلل) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزارها و برنامه‌های ذکرشده در بخش روش مطالعه، نتایج توالی‌یابی، آنالیز شد و آنالیز نتایج توالی‌یابی نوع تغییرات موجود در قطعه مورد مطالعه را تعیین نمود، به‌طوری‌که از ۶ جهش مورد مطالعه (p. R261Q, p. R252W, p.R261X, p.p.R243X,E280K و p.P281L) تنها دو جهش R261X و R261Q شناسایی شد (جدول ۱). از ۲۵ نمونه مورد مطالعه، در ۹ نمونه جهش بی‌معنی R261X مشاهده شد؛ که در این جهش تغییر باز در کدون ۲۶۱ م ژن باعث تبدیل CGA>TGA و تغییر اسیدآمینه به کدون خاتمه Arg>Term شده است؛ که نتیجه آن وقوع جهش nonsense (بی‌معنی) در این ژن و تولید پروتئین کوتاه شده PAH (truncated protein) می‌باشد. مطابق جدول ۲ این جهش در هر سه گروه فنوتیپی PKU کلاسیک، PKU خفیف و HPA خفیف مشاهده شد.

بعلاوه در ۷ نمونه از ۹ نمونه مذکور جهش فوق بصورت هتروزیگوت و در دو نمونه بصورت هموزیگوت بود. جهش بدمعنی R261Q نیز در ۵ نمونه به‌صورت هتروزیگوت مشاهده شد؛ که این جهش باعث تغییر باز در کدون ۲۶۱ م ژن و تبدیل CGA>CAA و تغییر اسیدآمینه Arg>Gln شده است.

جهش‌های مورد مطالعه و فراوانی نسبی آن‌ها در تحقیق حاضر در جدول ۱ نشان داده شده است؛ به‌علاوه جدول ۲ ژنوتیپ و فنوتیپ متابولیک بیماران واجد جهش را نشان می‌دهد. هم‌چنین

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]

الکتروفروگرام توالی رفت این دو جهش به‌ترتیب در شکل ۲ الی ۴
نشان داده شده است.

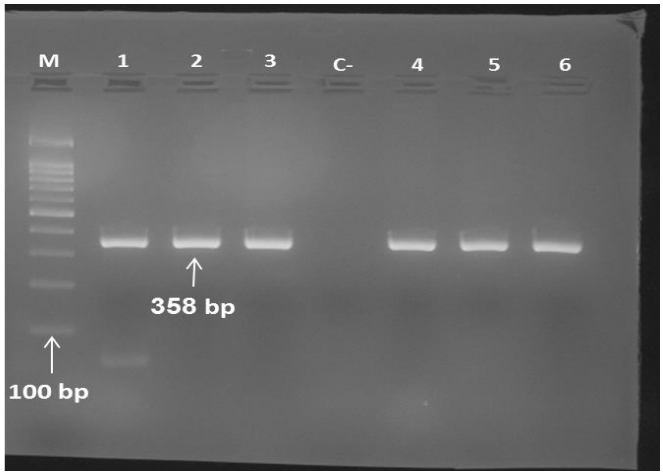
جدول (۱): جهش‌های مورد بررسی و فراوانی نسبی آن‌ها در مطالعه حا ضر

جهش در سطح پروتئین	جهش در سطح DNA	نوع جهش	تعداد آلل ها	فراوانی نسبی (٪)	تغییرات بازی
p.P281L	c.842C>T	بدمعنی	۰	۰	CCG>CTG
p.R243X	c.727C>T	بی‌معنی	۰	۰	CGA>TGA
p. R252W	c.754 C>T	بدمعنی	۰	۰	CGG>TGG
p.R261Q	c.782G>A	بدمعنی	۵	۱۰	CGA>CAA
p.R261X	c.781C>T	بی‌معنی	۱۱	۲۲	CGA>TGA
p. E280K	c.838G>A	بدمعنی	۰	۰	GAA>AAA

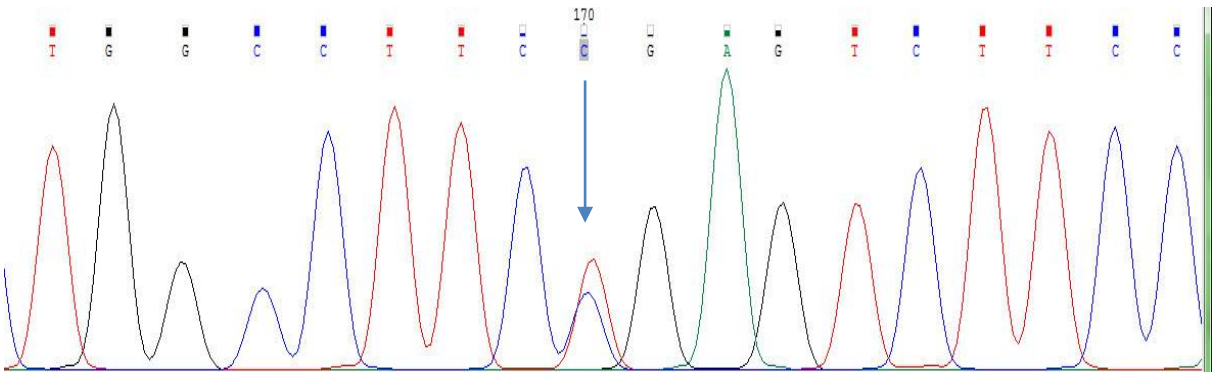
جدول (۲): ژنوتیپ و فنوتیپ متابولیک بیماران واجد جهش در مطالعه حاضر

بیمار	ژنوتیپ		فنوتیپ متابولیک	قومیت
	آلل ۱	آلل ۲		
۲	R261X		cPKU	ترک
۳	R261X	R261X	mHPA	گیلک
۴	R261X		mHPA	گیلک
۵	R261Q		mHPA	گیلک
۶	R261X		cPKU	تالش
۷	R261X		mPKU	ترک
۸	R261Q		cPKU	گیلک
۱۳	R261X		cPKU	گیلک
۱۴	R261Q		cPKU	گیلک
۱۶	R261X		cPKU	ترک
۱۷	R261X	R261X	mHPA	گیلک
۱۸	R261X		mPKU	گیلک
۲۲	R261Q		cPKU	تالش
۲۴	R261Q		mHPA	تالش
۲۵	R261Q		mHPA	گیلک

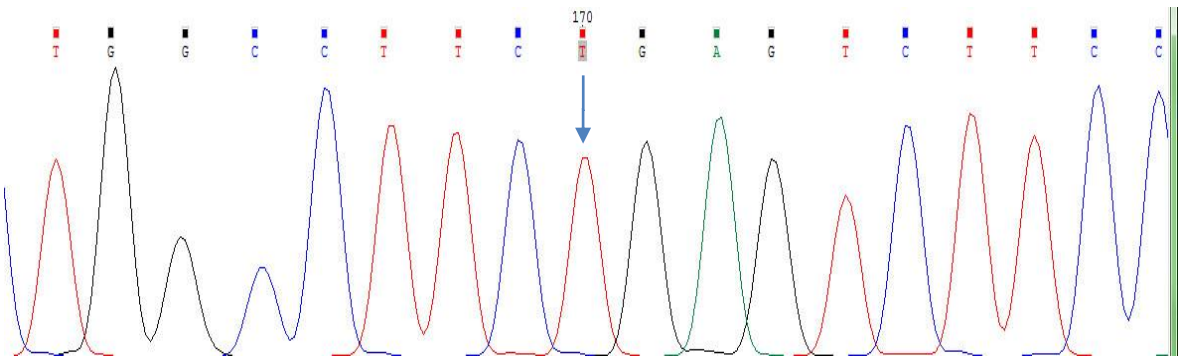
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]



شکل (۱): نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط به قطعه مورد مطالعه (۳۵۸ جفت باز) بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد، M (سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز)، شماره‌های ۳-۱ و ۶-۴ مربوط به نمونه بیمار و -c: کنترل منفی

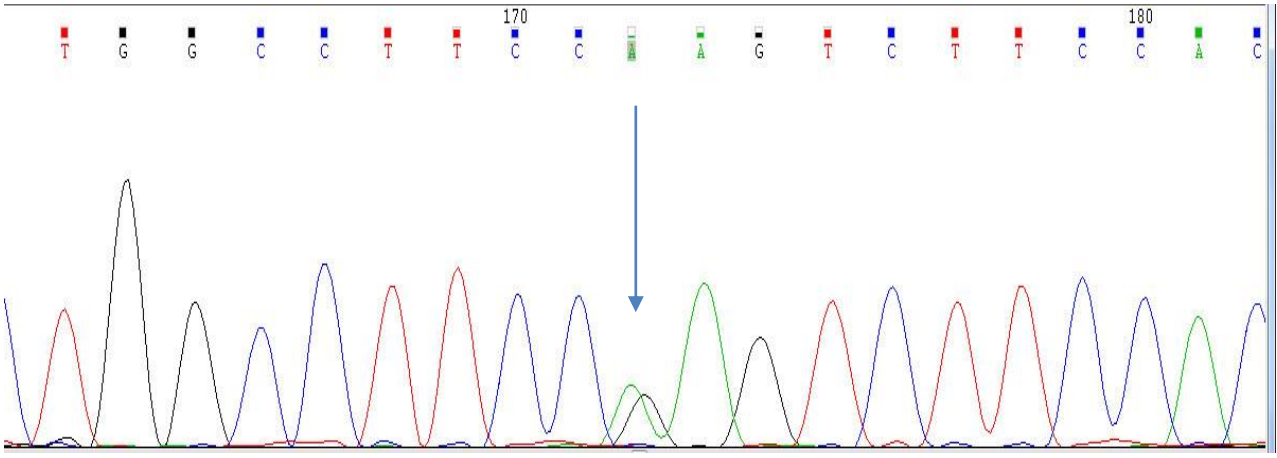


شکل (۲): الکتروفروگرام جهش Arg>Term(CGA>TGA)R261X به‌صورت هتروزیگوت مربوط به بیمارشماره ۱۶ (توالی رفت)



شکل (۳): الکتروفروگرام جهش Arg>Term(CGA>TGA)R261X به‌صورت هموزیگوت مربوط به بیمار شماره ۱۷(توالی رفت)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]



شکل (۴): الکتروفروگرام جهش R261Q(CGA>CAA)Arg>Gln بهصورت هتروزیگوت مربوط به بیمار شماره ۸(توالی رفت)

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه فعلی ۶ موتاسیون شایع ژن *PAH* شامل موتاسیون‌های p. R261Q, p. R252W, p. R261X,p.R243X, p.E280K و p.P281L در ۲۵ فرد مبتلا به PKU از استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت و دوجهش p. R261X و p.R261Q به‌ترتیب با فراوانی ۲۲ درصد و ۱۰ درصد شناسایی شد. اما ۴ جهش دیگر یافت نشد. این اولین گزارش از بررسی مولکولی ۶ جهش فوق در ژن *PAH* در جمعیت PKU شمال ایران (استان گیلان) است. گزارشات متفاوتی از طیف موتاسیون‌های ژن *PAH* در مناطق مختلف ایران ثبت شده است ازجمله در مطالعه بنیادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بیماران ترکی آذری ایرانی جهش P281L یکی ازشایع‌ترین (۱۹/۳درصد) جهش‌ها بود (۸). شیخ‌الاسلام و همکاران نیز با مطالعه ۱۴۰ بیمار PKU کلاسیک (غالباً از نواحی مرکزی ایران) جهش P281L را با فراوانی ۱۹/۳درصد گزارش نمودند (۱).

بعلاوه فراوانی جهش P281L در استان خراسان‌رضوی و استان‌های قزوین و زنجان به‌ترتیب ۱۲/۹درصد (۱۰) و ۱۰/۲۵درصد بود (۱۲). در سه مطالعه دیگر از ایران فراوانی جهش فوق ۸/۵درصد (۴)، ۹/۹درصد (۱۳) و ۵/۵۶درصد (۵) گزارش شد. درسایر مطالعاتی که تا کنون در جمعیت‌های مختلف PKU در ارتباط باطیف موتاسیونی *PAH* در ایران صورت گرفته (ازجمله مطالعه حاضر) جهش P281L یافت نشده است.

یکی دیگر از ۶ جهش مورد مطالعه جهش بی‌معنی R243X بود، ازجمله گزارشاتی که در مورد جهش مذکور در جمعیت PKU ایران موجود است می‌توان به مطالعه بنیادی و همکاران در بیماران PKU ترکی آذری ایرانی ۴/۵درصد (۸)، زارع‌کاریزی در بیماران PKU در مناطق مختلف ایران ۶/۹درصد (۴)، مرادی در کرمانشاه ۲درصد (۲)، حمزه‌لوئی در خراسان‌رضوی ۳/۲درصد (۱۰)، عجمی در خوزستان ۶/۲۵درصد (۱۱)، علی‌بخشی در کرمانشاه ۱/۸درصد (۱۴) و رضی‌پور و همکاران درخانواده‌های ایرانی با نقص *PAH* ۷/۴۱درصد (۵) اشاره نمود؛ به علاوه شیخ‌الاسلام و همکاران با مطالعه ۱۴۰ بیمار PKU کلاسیک (غالباً از نواحی مرکزی ایران) جهش R243X را با فراوانی ۲/۵درصد گزارش نمودند (۱). شیرزاد و همکاران نیز از مطالعه ۶۳۵ بیمار PKU ایرانی این جهش را در ۳۰ مورد یافتند (۱۳). در سایر مطالعاتی که تا کنون در مناطق مختلف ایران صورت گرفته جهش R243X مشاهده نشد.

جهش R252W اولین‌بار در سال ۲۰۰۳ در اصفهان توسط ولیان و همکاران با فراوانی ۱۵/۳۸درصد گزارش شد (۹). از آن پس مطالعات دیگر در مناطق مختلف ایران این موتاسیون را با فراوانی‌های مختلف گزارش کردند ازجمله می‌توان به مطالعه در مناطق مختلف ایران ۴/۸درصد (۴)، خراسان‌رضوی ۱/۶درصد (۱۰)، خوزستان ۲/۵درصد (۱۱) و آذربایجان غربی ۳/۷۵درصد (۱۵) اشاره نمود. متعاقب آن در دو مطالعه دیگر از ایران به‌ترتیب با فراوانی ۲/۱۴درصد (۱) و ۲/۳۶درصد (۱۳) گزارش گردید. در حالی‌که فراوانی این موتاسیون در دو استان شمالی کشور شامل مازندران و گلستان صفر درصد گزارش شد (۷)؛ که با نتایج ما از استان گیلان در شمال ایران مطابقت دارد.

گزارش‌هایی که از جهش E280K در ایران ارائه شده است به‌ترتیب مربوط به جمعیت ترکی آذری ایرانی با فراوانی ۲/۳درصد (۸)، مناطق مختلف ایران ۰/۸درصد (۴)، خراسان‌رضوی ۶/۴درصد (۱۰) و استان‌های قزوین و زنجان ۲/۵۶درصد (۱۲) می‌باشد. مطالعات سال ۲۰۱۷ فراوانی جهش E280K را در بیماران PKU ایرانی ۰/۶۲درصد (۵) و سال ۲۰۱۸ فراوانی جهش فوق را در ایران ۰/۷۱درصد (۱) گزارش نموده است. به‌علاوه شیرزاد و همکاران نیز

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]

در سال ۲۰۱۸ از ۶۳۵ مورد PKU در ایران در ۱۴ مورد این جهش را یافتند (۱۳). در سایر مطالعاتی که تا کنون در جمعیت PKU از مناطق مختلف ایران انجام شد جهش E280K یافت نشد.

دوجهش R261Q و R261X شناسایی شده در مطالعه حاضر با دی نوکلئوتیدهای CpG در ژن *PAH* مرتبط هستند. دی‌نوکلئوتید CpG اغلب در نواحی hotspot جهش‌پذیری ژن‌ها واقع می‌شود. دآمینه شدن ۵- متیل سایتوزین در این دی‌نوکلئوتیدها باعث تبدیل آرژنین به گلوتأمین و یا آرژنین به کدون خاتمه می‌شود (۲).

جهش R261Q یک جهش بدمعنی است که در این مطالعه با فراوانی ۱۰درصد در ۵ بیمار به‌صورت هتروزیگوت مشاهده گردید. در این جهش تغییر باز در کدون ۲۶۱ م ژن باعث تبدیل CGA>CAA و تغییر اسیدآمینه Arg>Gln شده است. مطالعاتی که در مناطق مختلف ایران در رابطه با طیف موتاسیونی ژن *PAH* در جمعیت PKU ایرانی صورت گرفته و در آن‌ها به فراوانی جهش R261Q اشاره شده است شامل: اصفهان ۷/۶۹درصد (۹)، در جمعیت ترکی آذری ایرانی ۵/۷درصد (۸)، در مناطق مختلف ایران ۱۲/۱درصد (۴)، کرمانشاه ۲درصد (۲)، خوزستان ۲/۵درصد (۱۱)، کرمانشاه ۱/۸درصد (۱۴)، استان‌های زنجان و قزوین ۷/۶۹درصد (۱۲) و در دو استان شمالی ایران مازندران و گلستان به‌ترتیب ۶/۸درصد و صفر درصد (۷) می‌باشد. هم‌چنین در سه مطالعه‌ای که اخیراً در جمعیت PKU ایرانی صورت گرفته به‌ترتیب به فراوانی‌های ۸/۰۲درصد (۵)، ۱۲/۸۶درصد (۱) و ۱۰/۷درصد (۱۳) اشاره شده است. در مطالعه ما از استان گیلان نیز این جهش با فراوانی ۱۰درصد یافت شد که فراوانی نزدیک به یافته‌های زارع‌کاریزی و شیخ‌الاسلام اصفهانی دارد. جهش R261Q از جهش‌های مهم در جمعیت ایرانی است. R261Q قبلاً در فراوانی‌های نسبتاً بالا در جمعیت‌های مختلف ابتدا در مدیترانه و جنوب اروپا گزارش شده است. این جهش یک جهش شایع در دنیاست و دومین جهش شایع در ترکیه می‌باشد (۲). هم‌چنین شیوع جهش R261Q در کشورهایی چون ترکیه ۸/۷درصد (۱۶)، Xinjiang چین ۰/۸درصد (۱۷)، روسیه ۸درصد (۱۸)، کرواسی ۹درصد، ایتالیا ۲۲/۵درصد، برزیل ۱۲/۲درصد، آلمان ۶درصد، کره ۰/۶درصد، لیتوانی ۰/۵درصد، پرتغال ۱۰/۴درصد، مصر ۱۱/۵درصد و کوبا ۱۵/۸درصد (۲) گزارش شده است.

جهش R261X یک جهش بی‌معنی است که در این مطالعه با فراوانی ۲۲درصد در دو بیمار به‌صورت هموزیگوت و در هفت بیمار به‌صورت هتروزیگوت مشاهده گردید. دراین جهش تغییر باز در کدون ۲۶۱ م ژن *PAH* باعث تبدیل CGA>TGA و تغییر اسیدآمینه Arg>Term شده است. فراوانی جهش R261X در کشورهایی چون کرواسی ۴درصد، ایتالیا ۲درصد، برزیل ۰درصد، آلمان ۱٪>، کره ۰/۶درصد، لیتوانی ۰/۵درصد، پرتغال ۰/۴درصد (۲)، سیسیل ۳/۸درصد (۱۹) و ناحیه Novosibirsk روسیه ۰/۶۷درصد (۱۸) گزارش شده است.

از سوی دیگر به مطالعاتی که در نقاط مختلف ایران در رابطه با جهش فوق صورت گرفته اشاره می‌شود. در مطالعه بنیادی و همکاران در بیماران ترکی آذری ایرانی برای جهش R261X به فراوانی ۴/۵درصد اشاره شده است (۸).

به دنبال آن در مطالعه زارع‌کاریزی و همکاران در سال ۲۰۱۱ که در ۱۲۴ فرد غیرخویشاوند مبتلا به PKU در چندین استان کشور صورت گرفته فراوانی این جهش ۴/۸درصد گزارش گردید (۴). سپس در مطالعه مرادی و همکاران در سال ۲۰۱۲ فراوانی جهش R261X در بین ۲۵ فرد غیرخویشاوند مبتلا به PKU در استان کرمانشاه ۸درصد گزارش شد. جهش R261X بالاترین فراوانی را در بین جهش‌های شناخته شده در این مطالعه داشت (۲). هم‌چنین در مطالعه علی‌بخشی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در استان کرمانشاه در ۲۷ فرد مبتلای غیرخویشاوند میزان این جهش ۷/۴درصد گزارش گردید (۱۴).

در مطالعه بیگلری و همکاران نیز که در سال ۲۰۱۵ بر روی ۳۹ فرد غیرخویشاوند مبتلا به PKU در استان‌های قزوین و زنجان انجام شد فراوانی این جهش ۵/۱۲درصد بود (۱۲). به‌علاوه طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ در ایران این جهش با فراوانی ۴/۹۴درصد گزارش شد (۵). پس از آن در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۸ از ۶۳۵ مورد PKU در ۱۰ مورد به جهش R261X اشاره گردید (۱۳). لازم به ذکر است که فراوانی جهش R261X در دو استان شمالی کشور، مازندران و گلستان به‌ترتیب ۲/۳درصد و ۰درصد گزارش شد (۷). با توجه به مطالعات فوق، بیش‌ترین فراوانی (۲۲درصد) این جهش در استان گیلان مشاهده شد و این برای اولین بار از استان گیلان گزارش می‌شود. این تفاوت‌ها در فراوانی موتاسیون‌ها نشان‌دهنده تنوع گروه‌های قومی و هتروژنیتی بالای لوکوس *PAH* در ایران است.

در این تحقیق جهش R261X در استان گیلان از شیوع بالایی برخوردار بود. به‌نظر می‌رسد این جهش نقش به‌سزایی در ایجاد PKU در افراد مبتلا داشته باشد و از این نظر لازم است جزء جهش‌های اصلی در شناسایی و غربالگری‌های ژنتیکی این استان برای افراد در معرض خطر بیماری در نظر گرفته شود. از طرفی شناسایی جهش‌های شایع در یک جمعیت خاص می‌تواند به میزان زیادی به برنامه‌های تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های در معرض خطر تولد فرزند مبتلا به PKU در آن جمعیت کمک‌کننده باشد، هم‌چنین با شناسایی این جهش‌های شایع می‌توان تا

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]

حدودی به قرابت یا عدم قرابت پیشـــینه‌ای جمعیت‌های مختلف با یک‌دیگر پی برد (۲۰). لذا برای دست‌یابی به اهداف فوق شناسایی جهش‌های شایع ژن *PAH* در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند کمک شایانی نماید.

محدودیت تحقیق، به‌دلیل وجود موتاســیون‌های متعدد در ژن *PAH* عامل PKU و عدم وجود بودجه کافی جهت بررســی همه موتاســیون‌ها، در این تحقیق تنها چند موتاســیون ژن *PAH* در جمعیــت PKU این منطقــه مورد مطــالعــه قرارگرفــت. بنــابراین شـناسـایی طیف کامل موتاسیون‌های ژن *PAH* در بیماران PKU استان گیلان نیازمند بررسی کل طول ژن *PAH* می‌باشد.

نتیجه‌گیری

اگر چه مطالعه حاضـربه بررسی فراوانی ۶ جهش در ژن *PAH* پرداخته است، این جهش‌ها فقط در ۳۲ درصد کروموزوم‌ها مشاهده شـده اسـت. ازاین‌رو جهش‌های مختلف، مسئول بیماری PKU در شـــمال ایران هســـتند و مطالعات بیش‌تر برای شـــناســـایی تمام جهش‌های ژن *PAH* در منطقه توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصـل طرح پژوهشـی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن با شـــماره ۸۳۴۵، ۹۷/۴/۱۶ می‌باشـــد. بدین وســـیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحـد تنکـابن بـه‌دلیـل حمـایـتهـای مالی از این طرح قدردانی می‌نمایند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Shaykholeslam Esfahani M, Vallian S. A.comprehensive study of phenylalanine hydroxylase gene mutations in the Iranian phenylketonuria patients. Eur J Med Genet 2019;62(9): 1-6
2. Moradi K, Alibakhshi R, Ghadiri K et al.. Molecular analysis of exon 6 and 7 of phenylalanine hydroxylase gene mutations in phenylketonuria patients in western Iran. Indian J Hum Genet 2012;18(3): 290-93.
3. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem Rev 2008;29(1): 31-41.
4. Zare-Karizi S, Hosseini-Mazinani SM, Khazaei-Koohpar Z, Seifati SM, Shahsavan-Behboodi B, Akbari MT, et al. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. Mol Genet Metab 2011;102(1): 29-32.
5. Razipour M, Alavinejad E, Sajedi S Z et al. Genetic study of the PAH locus in the Iranian population: familial gene mutations and minihaplotypes. Metab Brain Dis 2017, 32(5): 1685–91.
6. Alibakhshi R, Moradi K, Biglari M, Shafieenia S. Spectrum of Phenylalanine Hydroxylase Gene Mutations in Hamadan and Lorestan Provinces of Iran and Their Associations with Variable Number of Tandem Repeat Alleles. Iran J Med Sci 2018,43(3): 318-23.
7. Zamanfar D, Jalali H, Mahdavi M R, Maadanisani M, Zaeri H, Asadpoor E. Investigation of Five Common Mutations on Phenylalanine Hydroxylase Gene of Phenylketonuria Patients from Two Provinces in North of Iran. Int J Prev Med 2017;8(89): 1-4.
8. Bonyadi M, Omrani O, Mohamadi Moghanjoghi S, Shiva S. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian Azeri Turkish patients with phenylketonuria. Genet Test Mol Biomarkers 2010; 14: 233-5.
9. Vallian S, Barahimi E, Moeini H. Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in Isfahan. Mutat Res Fund Mol Mech Mut 2003; 526: 45-52.
10. Hamzehloei T, Hosseini S.A, Vakili R, Mojarad M. Mutation spectrum of the PAH gene in the PKU patients from Khorasan Razavi province of Iran. Gene 2012;506(1): 230-32.
11. Ajami, N, Kazeminezhad S.R, Foroughmand A.M, Hasanpour M,and Aminzadeh. M, A. A preliminary

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]

mutation analysis of phenylketonuria in southwest. Iran. Genet Mol Res 2013; 12(4) 4958-66.

12. Biglari A, Saffari F, Rashvand Z, Alizadeh S,Najafipour R, Sahmani M, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria. SpringerPlus 2015; 4: 542.
13. Shirzad T, Saeidian A H, Bagherian H, Salehpour S, Setoodeh A, Alaei M, et al. Molecular genetics of a cohort of 635 cases of phenylketonuria in a consanguineous population. J Inherit Metab Dis 2018;1-9.
14. Alibakhshi R., Moradi K, Mohebbi Z.Mutation analysis of PAH gene in patients with PKU in western Iran and its association with polymorphisms: identification of four novel mutations. Metab Brain Dis 2014;29(1): 131-38.
15. Bagheri M, Abdi Rad I, Hosseini-jazani N, Zarrin R, Ghazavi A. Mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in Azerbaijani population, a report from West Azerbaijan province of Iran. Iran J Basic Med Sci 2015; 18: 649-53.
16. Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, Ellingson C, Ellingson C, Özer I et al. Molecular genetics and impact of residualin vitrophenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population. Mol Genet Metab 2011;10: 116-21.
17. Yu W, He J, Yang X, Zou H, Gui J, Wang R, Yang L, Wang Z, Lei Q. Characterization of phenylalanine hydroxylase gene mutations in phenylketonuria in Xinjiang of China. Int J Clin Exp Med 2014;7(11): 4406-12.
18- Baturina O A, Tupikin A E, Lukjanova T V, Sosnitskaya S V, Morozov V L.. Pah and qdpr deficiency associated mutations In the novosibirsk region of the russian federation: correlation Of mutation type with disease manifestation and severity. J Med Biochem 2014;33: 333–40.
19. Guldberg P, Romano V, Ceratto N et al.Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in Southern Europe. Hum Mol Gen 1993;2(10): 1703-07.
20-Haerian Ardakani H, Khazaei Koohpar Z,Mohammadian S. Mutations Analysis of exon 10 -11 of phenylalanine Hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Golestan province. Razi J Med Sci 2018. 25(172): 39-46.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]

Original Article

INVESTIGATION OF SIX COMMON MUTATIONS ON PHENYLALANINE HYDROXYLASE GENE IN PHENYLKETONURIA PATIENTS IN GUILAN PROVINCE

*Zeinab Khazaei -Koohpar *[1], Najmeh Ranji [2], Afshin Safaei Asl [3], Soraya Shabani[4]*

Received: 09 Oct, 2019; Accepted: 24 Feb, 2020

Abstract

Background & Aims: Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of amino acid metabolism that results from a deficiency of phenylalanine hydroxylase (PAH). To date, more than 800 mutations have been identified in the PAH gene and registered in the PAHdb database and the spectrum of these mutations is varied in different populations. The main clinical manifestation of untreated patients is severe mental retardation. The aim of the present study was to identify the frequency of six common mutations on PAH gene in patients with PKU in Guilan province including p. R261Q, p. R252W, p.R261X, p. E280Kp.R243X, and p.P281L.

Materials & Methods: In this descriptive cross-sectional study, 25 unrelated PKU patients (1 to 21 years old, both female and male) in Guilan province were enrolled during a one-year period. Genomic DNA was extracted from leukocytes using High Pure PCR Template Preparation kit (Roche) and polymerase chain reaction. The sequencing method was applied to detect mutations.

Results: Two out of the six investigated mutations (p.R261Q, p.R252W, p.R261X, p.E280K, p.R243X, and p.P281L)were identified among the patients. The p.R261X mutation had the highest frequency (22%) among the patients and the frequency of p. R261Q mutation was 10%.

***Conclusion*:** Although the present study investigated the frequencies of six mutations on the PAH gene, the mutations were only found on 32% of the chromosomes. Hence, different mutations are responsible for PKU disease in the north of Iran, and further studies are recommended to identify all of the mutations on the PAH gene in the region.

Keywords: Mutation, phenylalanine hydroxylase, phenylketonuria, Guilan.

Address: Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
Tel: +98115427 1105
Email: khazaei@toniau.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(01): 33 ISSN: 2717-008X

[1] Asistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences,Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.(Corresponding Author)
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[3]Associate Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Guilan, Iran
[4] MSc, Department of Genetic, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-04-12]