**مقاله پژوهشی**

# بررسی ارتباط بین VNTR و جهش‌های ژن PAH در افراد مبتلا به PKU در استان گیلان

زینب خزائی کوهپر[۱]، زهرا اسکندرپور[۲]، سیدعلی کامران[۳]، حدیثه بهشتی دافچاهی[٤]،
سامان سیفی‌زاده سرابستانی[٥]، نجمه رنجی*[٦]، افشین صفایی اصل[۷]

**تاریخ دریافت ۱٤۰۰/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش ۱٤۰۱/۰٥/۳۰**

## چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز (*PAH*) برای تعیین ناقل و تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های فنیل‌کتونوری مورداستفاده قرار می‌گیرد. هدف این مطالعه بررسی پیوستگی بین آلل‌های VNTR و جهش‌های ژن *PAH* در افراد مبتلا به فنیل‌کتونوری در استان گیلان بود.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۱۹ بیمار PKU غیر خویشاوند از بیمارستان کودکان ۱۷ شهریور در رشت وارد مطالعه شدند. DNA ی ژنومی از نمونه خون بیماران PKU استخراج شد. تکثیر قطعات ژنی به روش PCR انجام و سپس تعیین توالی گردید.

**یافته‌ها:** آنالیز ما نشان داد که بیماران PKU در استان گیلان دارای ژنوتیپ‌های VNTR3/VNTR3، VNTR3/VNTR7، ND/VNTR7، VNTR7/VNTR7 و VNTR8/VNTR8 در ژن *PAH* بودند. فراوانی آلل‌های VNTR3، VNTR7 و VNTR8 به ترتیب ۲۱/۰٥درصد، ۲۸/۹۴درصد و ۴۷/۴درصد بود. پیوستگی بین بعضی جهش‌های ژن *PAH* نظیر R400K، R261X، R261Q، IVS4+5G>T و IVS10-11G>A با آلل‌های VNTR در بیماران PKU مشاهده شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** آلل‌های VNTR3، VNTR7 و VNTR8 می‌توانند به‌عنوان مارکرهای مفیدی در تعیین ناقلین PKU در گیلان باشند. همچنین، تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی می‌تواند علت ارتباط جهش‌های مختلف با آلل‌های VNTR در ژن *PAH* در استان گیلان باشد.

**کلیدواژه‌ها:** **IVS10-11G>A**، جهش، ژن *PAH*، فنیل‌کتونوری، VNTR

**مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره اول، ص ٦۱-٥٤، فروردین ۱٤۰۱**

**آدرس مکاتبه**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، تلفن:۱۳۳۳۴۲۴۰۸۰
Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

## مقدمه

فنیل کتونوری (PKU) یک اختلال ژنتیکی (۱) با نقص در متابولیسم فنیل آلانین است که یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیکی ارثی به شمار می‌رود (۲) که در صورت عدم‌تشخیص و درمان زودهنگام، باعث آسیب‌های شدید مغزی می‌شود (۱). جهش در ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (*PAH*) علت اصلی فنیل کتونوری است. این ژن حاوی ۱۳ اگزون بوده و یک پروتئین ۴۵۲ آمینواسیدی را رمزدهی می‌کند (۲). بیش از ۹۵۰ واریانت ژنتیکی در این ژن در افراد مبتلا به PKU شناسایی شده است (۳). جهش در ژن *PAH* در افراد درمان نشده، ناتوانی مغزی متوسط تا شدید را باعث می‌شود. شیوع این اختلال ژنتیکی در اروپا، یک در ده هزار (۴)، در روسیه یک در ۷ هزار (۵)، در هند تقریباً یک در ۱۸[۱] هزار، در تونس تقریباً یک در ۷ هزار و در مناطق مختلف چین از تقریباً یک در سه هزار

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
[۲] کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[٤] کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[٥] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[٦] استادیار ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (نویسنده مسئول)
[۷] دانشیار گروه کودکان، دانشکده پزشکی، واحد رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تا تقریباً یک در ۱۱ هزار متولد زنده گزارش شده[۲] است (۶). در ایران در استان مازندران ۰/۶۶ در ده هزار (۷)، در استان لرستان ۱/۹۱ در ده هزار (۸) و در استان فارس ۲ در ده هزار متولد زنده گزارش شده است (۹).

جهش‌های مختلف در ژن *PAH* باعث کاهش پایداری یا چین خوردگی‌های ناصحیح در پروتئین شده که نتیجه آن تفاوت در فعالیت آنزیم *PAH* در بیماران با جهش‌های مختلف است (۱۰). فراوانی جهش‌های این ژن در نواحی جغرافیایی و یا قومیت‌های مختلف، متفاوت است (۴). بطوریکه IVS10-11G>A یکی از شایع‌ترین جهش‌های این ژن در نواحی مدیترانه‌ای از جمله ایران، ایتالیا، ترکیه، اسپانیا، مصر و فلسطین می‌باشد (۱۱). به غیر از جهش‌های ژنی، در مطالعات مختلف بعضی مارکرهای پلی مورف درون یا نزدیک ژن *PAH* مورد بررسی قرار گرفته و همراهی آن با جهش در ژن و به عبارتی همراهی با بیماری تأیید شده است. از جمله مارکرهای مورد بررسی می‌توان به مارکرهای دو آللی (SNP ها و RLFP ها) و مارکرهای چند آللی (VNTR و STR) اشاره نمود. استفاده از مارکرهای چند آللی در شناسایی افراد مبتلا پیش آگهی مناسبتری نسبت به دو آللی‌ها دارد. یکی از مارکرهای چند آللی موجود در ژن *PAH*، یک توالی تکراری پشت سر هم با تعداد متغیر (VNTR) با تکرارهای غنی از AT به طول ۳۰ جفت باز است که در فاصله تقریبی ۳۰ کیلو بازی پایین دست آخرین اگزون ژن *PAH* قرار دارد (۱). به دلیل موقعیت جغرافیایی و تنوع قومیتی در ایران (۲) در مطالعات پیشین هتروزیگوسیتی ۶۶ درصدی در ایران در این VNTR شناسایی شده است (۱۲). در مطالعه باقری و همکاران در استان آذربایجان غربی در ۲۰ بیمار PKU، همراهی جهش‌هایIVS10nt546 ، R261Q و R252W با VNTR8 همراهی جهش‌های R252W وS67P با VNTR3 گزارش شد (۱۲). در مطالعه علی بخشی و همکاران در ۲۴ بیمار PKU، همراهی جهش‌هایIVS9+5G>A و IVS2+5G>C به ترتیب با مینی‌هاپلوتایپ‌های 2429/ و 8/238 مشاهده شد (۲). هدف از این مطالعه، بررسی تنوع تعدادهای VNTR و ارتباط آن با جهش‌های ژن PAH در افراد مبتلا به PKU برای اولین بار در استان گیلان بود تا بتوان با آگهی از همراهی فراوانی تکرارهای خاص VNTR با جهش‌های شایع در استان، به شناسایی و غربالگری کم‌هزینه‌تر ناقلین به کمک این گروه از مارکرها در آینده دست یافت.

## مواد و روش کار

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، طی یک دوره یک‌ساله تعداد ۱۹ بیمار PKU و غیر خویشاوند از نواحی مختلف استان گیلان مراجعه‌کننده به بیمارستان ۱۷ شهریور رشت، شناسایی شدند. نمونه‌گیری از بیماران پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه توسط بیمار یا والدین، صورت گرفت. معیار ورود و خروج بیماران بر اساس سطح سرمی فنیل‌آلانین قبل از درمان بود که در سه گروه PKU کلاسیک (Phe >1200 µmol/L)، PKU خفیف ( Phe = 600-1200 µmol/L) و HPA خفیف (<600 µmol/L) قرار گرفتند (۱۳). جهت نمونه‌گیری از بیماران، کد اخلاق از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (IR.IAU.RASHT.REC.1397.138) اخذ گردید و از هر بیمار به میزان ۵-۲ میلی‌لیتر نمونه خون تهیه و در لوله حاوی EDTA ۰/۵ مولار (به‌عنوان ماده ضد انعقاد) نگهداری شد.

### استخراج DNA:

استخراج DNA از نمونه‌های خون بیماران با استفاده از کیت DynabioTM Blood/Tissue DNA Extraction Mini kit (تکاپوزیست، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. برای اطمینان از صحت نمونه استخراج‌شده DNA، الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵درصد با ولتاژ ۴۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

جهت تکثیر قطعات VNTR، با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) و با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۲۰ pM) و آب استریل به محلول PreMix تهیه شد. واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Analaytik jena (آلمان) طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت‌شدن ابتدایی در ۹۴° C به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۴° C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۶°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲° C به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. پرایمرهای مورداستفاده VNTR در این واکنش (جدول ۱) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) سنتز شد. بعد از اتمام واکنشPCR، الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۲درصد صورت گرفت تا تفاوت طولی باندهای VNTR در بیماران به این روش موردبررسی قرار گیرد.

### تعیین توالی:

برای اطمینان از حضور تکرارهای VNTR محصولات PCR تعیین توالی شدند. تعیین توالی توسط دستگاه سکوئنسر ABI3730 (شرکت ماکروژن کره جنوبی) صورت گرفت.

همچنین از نرم‌افزارهای CLC main work bench 5 جهت خوانش توالی‌ها و مقایسه نتایج دستگاه سکوئنسر استفاده شد.

**جدول (۱):** توالی پرایمرهای مورداستفاده برای تکثیر ناحیه VNTR ژن *PAH*

| طول قطعه | توالی پرایمر | نام پرایمر |
|---|---|---|
| متغیر | 5'- AAACTTAAGAATCCCATCTCTCAGAG-3' | VNTR-F |
| | 5'- GATTTTAATGTTCTCACCCGCC-3' | VNTR-R |

## یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۹ بیمار HPA مراجعه‌کننده به بیمارستان ۱۷ شهریور رشت موردبررسی قرار گرفتند. در جدول ۲، درصد افراد مبتلا به PKU بر اساس غلظت فنیل‌آلانین قبل از درمان و در جدول ۳ توزیع قومیتی این افراد نشان داده شده است. مشخصات بیماران شامل میزان فنیل‌آلانین قبل از درمان، فنوتیپ بیماری و خویشاوندی والدین در جدول ۳ ذکر شده است.

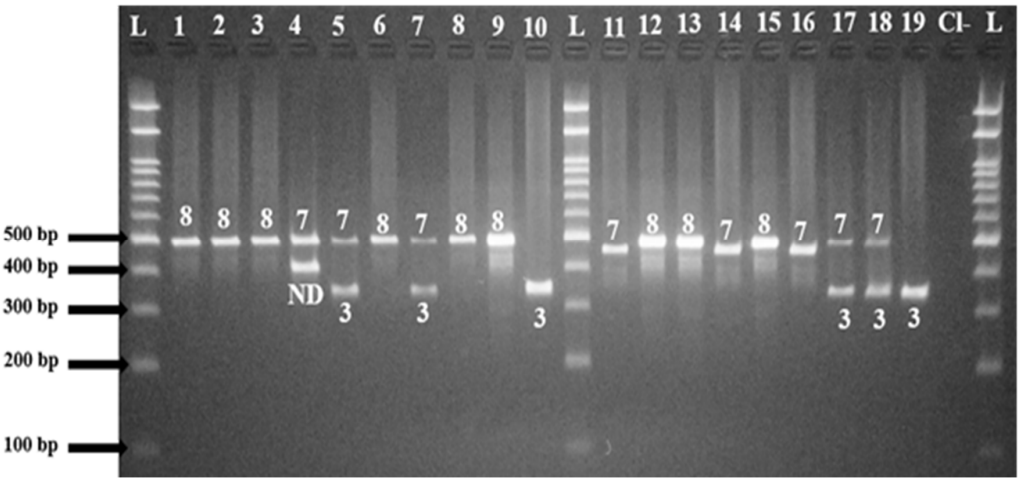
**جدول (۲):** درصد افراد مبتلا به PKU بر اساس غلظت فنیل‌آلانین قبل از درمان

| فنوتیپ متابولیک | PKU کلاسیک | PKU خفیف | HPA خفیف |
|---|---|---|---|
| درصد بیماران | ٪ ۳۶/۸ | ٪ ۳۱/۶ | ٪ ۳۱/۶ |

**جدول (۳):** توزیع قومیتی افراد بیمار در مطالعه

| قومیت | گیلک | تالش | ترک |
|---|---|---|---|
| تعداد (درصد) | ۱۵ (٪ ۷۸/۹۵) | ۲ (٪ ۱۰/۵۲) | ۲ (٪ ۱۰/۵۲) |

در این مطالعه بعد از انجام واکنش PCR طول قطعات تکثیرشده VNTR، متغیر و در محدوده ۳۳۴ تا ۴۸۴ جفت باز گزارش شد، به‌گونه‌ای که قطعات ۳۳۴، ۴۵۴، و ۴۸۴ جفت بازی به ترتیب حاوی تکرارهای ۳، ۷ و ۸ تایی بودند. مطابق شکل ۱، از میان ۳۸ آلل موردبررسی، آلل‌های مربوط به تکرارهای ۳، ۷ و ۸ به ترتیب دارای فراوانی‌های ۸ (۲۱/۰۵درصد)، ۱۱ (۲۸/۹۴درصد) و ۱۸ (۴۷/۴درصد) بودند. همچنین یک آلل (۰/۰۳درصد) به‌صورت نامشخص (ND) بود. همچنین در افراد موردبررسی، ژنوتیپ‌های VNTR8/VNTR8، VNTR7/VNTR7، VNTR3/VNTR3، VNTR3/VNTR7، و ND/VNTR7 مشاهده شدند که به ترتیب دارای فراوانی‌های ۹ (۴۷/۴درصد)، ۳ (۱۵/۷۸درصد)، ۲ (۱۰/۵۲درصد)، ۴ (۲۱/۰۵درصد) و ۱ (۵/۳درصد) بودند (جدول ۴). در مطالعه‌ای دیگر جهش‌های ژن *PAH* در این بیماران در استان گیلان به سرپرستی تیم حاضر بررسی شد (۱۴). مطابق جدول ۵ همراهی جهش‌های مختلف با تکرارهای VNTR در این مطالعه مشاهده شد. بطوریکه همراهی جهش R400K در دو بیمار با VNTR8، یک بیمار با VNTR3/VNTR7 و یک بیمار با VNTR7 مشاهده شد. همراهی جهشR261X (به‌عنوان فراوان‌ترین جهش در بیماران) در چهار بیمار با VNTR8، در یک بیمار با VNTR3/VNTR7 و یک بیمار با ND/VNTR7 مشاهده شد. اما در هیچ‌یک از بیماران با تکرارهای هموزیگوت VNTR3 و یا هموزیگوتVNTR7 مشاهده نشد. همراهی جهشR261Q در دو بیمار با VNTR8 و در دو بیمار با VNTR3/VNTR7 مشاهده شد. همراهی جهشIVS4+5G>T در دو بیمار با VNTR8 مشاهده شد. همراهی جهش مدیترانه‌ای IVS10-11G>A در یک بیمار با VNTR8 و دو بیمار با VNTR7 مشاهده شد.




**شکل (۱):** بررسی باندهای مربوط به آلل‌های VNTR ژن *PAH* بر روی ژل آگارز ۲/۵درصد. نتایج در ژل بر اساس نتیجه تعیین توالی گزارش‌شده و مبنای تعیین تکرارها لزوماً قرار گرفتن باند VNTR به‌موازات باند مشخصی از DNA لدر نیست و مبنای تفسیر تعداد تکرارها، نتیجه تعیین توالی می‌باشد. الف) نمونه ۱: ۸/۸؛ نمونه ۲: ۸/۸؛ نمونه ۳: ۸/۸؛ نمونه ۴: ۷/ND؛ نمونه ۵: ۷/۳؛ نمونه ۶: ۸/۸؛ نمونه ۷: ۷/۳؛ نمونه ۸: ۸/۸؛ نمونه ۹: ۸/۸؛ نمونه ۱۰: ۳/۳؛ نمونه ۱۱: ۷/۷؛ نمونه ۱۲: ۸/۸؛ نمونه ۱۳: ۸/۸؛ نمونه ۱۴: ۷/۷؛ نمونه ۱۵: ۸/۸؛ نمونه ۱۶: ۷/۷؛ نمونه ۱۷: ۳/۷؛ نمونه ۱۸: ۳/۷؛ نمونه ۱۹: ۳/۳؛ - CL: کنترل منفی؛ L: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ ND: Not Determined.

**جدول (۴):** فراوانی ژنوتیپی و آللی VNTR مشاهده‌شده در افراد مبتلا به PKU در استان گیلان

| ژنوتیپ VNTR | فراوانی (٪) | آلل VNTR | فراوانی (٪) |
|---|---|---|---|
| VNTR3/VNTR3 | ۲ (۱۰/۵۲ ٪) | VNTR3 | ۸ (۲۱/۰۵ ٪) |
| VNTR3/VNTR7 | ۴ (۲۱/۰۵ ٪) | ND | ۱ (۰/۰۳ ٪) |
| ND/VNTR7 | ۱ (۵/۲۶ ٪) | VNTR7 | ۱۱ (۲۸/۹۴ ٪) |
| VNTR7/VNTR7 | ۳ (۱۵/۷۸ ٪) | VNTR8 | ۱۸ (۴۷/۴ ٪) |
| VNTR8/VNTR8 | ۹ (۴۷/۳۶ ٪) | | |

**جدول (۵):** ارتباط بین VNTR و جهش‌های ژن *PAH* در افراد مبتلا به PKU

| شماره بیمار | غلظت فنیل‌آلانین قبل از درمان (میکرومول بر لیتر) | فنوتیپ بیماری | نوع جهش‌ها (۱۴) | تعداد تکرار VNTR | ازدواج فامیلی |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۷۱۲ | mPKU | R400K/ R400K<br>R241H/ R241H | ۸ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۲ | ۱۸۰۰ | cPKU | R261X/IVS4+5G>T<br>R158Q / R158Q | ۸ تکرار | خویشاوند |
| ۳ | ۵۰۰ | mHPA | R261X/ R261X | ۸ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۴ | ۴۹۰ | mHPA | P211T/ R261X | ۷ تکرار و ND | غیر خویشاوند |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ۵ | ۵۶۴ | mHPA | R400K/ R400K<br>R261Q | ۳ تکرار و ۷ تکرار | خویشاوند |
| ۶ | ۲۴۵۳ | cPKU | R400K/ R400K<br>R261X | ۸ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۷ | ۶۹۹ | mPKU | R241H/ R261X | ۳ تکرار و ۷ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۸ | ۱۴۶۰ | cPKU | IVS10-11G>A / R261Q | ۸ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۹ | ۱۲۸۰ | cPKU | R176X/ R176X | ۸ تکرار | خویشاوند |
| ۱۰ | ۴۸۹ | mHPA | -- | ۳ تکرار | خویشاوند |
| ۱۱ | ۱۱۴۰ | mPKU | IVS10-11G>A/ IVS10-11G>A<br>R400K/ R400K | ۷ تکرار | خویشاوند |
| ۱۲ | ۱۱۹۹ | mPKU | IVS4+5G>T/ IVS4+5G>T | ۸ تکرار | خویشاوند |
| ۱۳ | ۱۳۸۰ | cPKU | R261Q | ۸ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۱۴ | ۱۲۵۰ | cPKU | IVS10-11G>A/ IVS10-11G>A | ۷ تکرار | خویشاوند |
| ۱۵ | ۸۰۰ | mPKU | R261X | ۸ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۱۶ | ۳۲۰ | mHPA | N376I / N376I<br>Q304X/ Q304X | ۷ تکرار | خویشاوند |
| ۱۷ | ۱۹۹۱ | cPKU | p.F55L / R261Q | ۳ تکرار و ۷ تکرار | غیر خویشاوند |
| ۱۸ | ۶۰۵ | mPKU | L444I | ۳ تکرار و ۷ تکرار | خویشاوند |
| ۱۹ | ۵۰۰ | mHPA | E305X/ E305X | ۳ تکرار | خویشاوند |

ND: Not Determined

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات مختلف همراهی تعداد تکرارهای VNTR در ناحیه 3-UTR ژن *PAH* باوجود جهش در افراد مبتلا به PKU در نقاط مختلف دنیا موردبررسی قرار می‌گیرد تا بتوان از این اطلاعات در جمعیت‌های مختلف به‌عنوان مارکرهای تشخیصی در آینده بهره برد. با توجه به تنوع قومی و نژادی در ایران لازم است در هر استان ارتباط بین این مارکرها و جهش‌های ژن *PAH* مورد ارزیابی قرار گیرد. با مطالعه ۱۹ فرد مبتلا به PKU در استان گیلان مشخص شد که بین آلل‌های VNTR3، VNTR7 و VNTR8 با جهش‌های *PAH* در افراد مبتلا به PKU همراهی وجود دارد.

در مطالعه پریور و همکاران در استان یزد همراهی VNTR با تکرارهای ۳، ۷، ۸ و ۱۲ با جهش در ژن *PAH* در افراد مبتلا به PKU مشاهده شد (۱). در مطالعه باقری در استان آذربایجان غربی VNTR با تکرارهای ۳، ۷، ۸، ۹ و ۱۱ به‌صورت هموزیگوت و هتروزیگوت در افراد مبتلا به PKU گزارش گردید (۱۵). در مطالعه عابدینی و همکاران همراهی VNTR با تکرارهای ۳، ۷، ۸، ۹ و ۱۲ با جهش در ژن *PAH* در افراد مبتلا به PKU در استان گلستان مشاهده شد (۱۶). در مطالعه علی بخشی و همکاران همراهی VNTR با تکرارهای ۳، ۷، ۸ و ۹ با جهش در ژن PAH در افراد مبتلا به PKU در استان کرمانشاه گزارش شد (۲). در مطالعه حاضر تکرارهای ۳، ۷ و ۸ تایی VNTR در استان گیلان همراه با بیماری مشاهده شد. آلل‌های ۹، ۱۱ و ۱۲ که در دیگر مناطق ایران گزارش‌شده در این استان شناسایی نشد که از تنوع ژنتیکی در نواحی مختلف ایران حکایت دارد.

در مطالعات مختلف همراهی و پیوستگی تکرارهای VNTR با جهش‌های PAH مشاهده شده است. در مطالعه باقری و همکاران در آذربایجان غربی ارتباط بین VNTR8 و جهش IVS10-11G>A ژن PAH در ۵۰درصد مبتلایان گزارش شد. همچنین پیوستگی VNTR8 و جهش R261Q در افراد مبتلا به PKU

مشاهده شد (۱۲). در مطالعه سعادت و همکاران ارتباط بین VNTR8 و جهش IVS10-11G>A ژن PAH در استان فارس گزارش شد (۱۷). در مطالعه علی بخشی و همکاران در کرمانشاه پیوستگی جهش R261X و VNTR7 در دو بیمار مشاهده شد. همچنین پیوستگی جهش IVS10-11G>A و VNTR7 در دو بیمار گزارش شد (۲). در مطالعه حاضر همراهی جهش‌های مختلف با تکرارهای مختلف ۳ تایی، ۷ تایی و ۸ تایی VNTR می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که استان گیلان به خاطر داشتن چندین قومیت، تنوع ژنتیکی بالایی داشته و همگنی در ژنوتیپ بیماران PKU و یا همراهی یک تکرار خاص با یک جهش مهم به این دلیل غیرممکن بوده و باید انتظار تنوع ژنتیکی بالایی در افراد مبتلا داشت؛ لذا وجود تکرارهای ۳، ۷ و ۸ از مهم‌ترین مشاهدات این مطالعه بوده که می‌توان در آینده نزدیک این سه VNTR را به‌عنوان مارکرهای پیشنهادی برای شناسایی افراد ناقل PKU (در والدین) در استان گیلان در غربالگری‌های قبل از ازدواج مورداستفاده قرار داد. بااین‌وجود با توجه به تعداد کم نمونه در استان گیلان پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در سال‌های آینده جهت یافتن ارتباط VNTR ها با جهش‌های بیشتری در این ژن صورت گیرد.

## References:


1. Parivar K, Seifati SM, Koochmeshgi J, hashemi m. Studying the level of informativity of VNTR marker on PAH gene for carrier detection of the patients with phenylketonuria in Yazd province, Iran. Med Sci J 2011;21(3):196-200.
2. Alibakhshi R, Moradi K, Ghadiri K. The status of PAH gene-VNTR alleles and mini-haplotypes associations with PAH gene mutations in Iranian Kurdish PKU patients. Med J Islam Repub Iran 2019;33:88.
3. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. Hum. Mutat 2016;37(6):508-15.
4. Pampukha V, Nechyporenko M, Livshyts L. Analysis of EX5del4232ins268 and EX5del955 PAH gene mutations in Ukrainian patients with phenylketonuria. Genet Dis 2017;4(2):108-10.
5. Gundorova P, Zinchenko RA, Makaov AK, Polyakov AV. The spectrum of mutations in the PAH gene in patients with hyperphenylalaninemia from the Karachay-Cherkess Republic. Russ J Genet 2017;53(7):813-9.
6. Zhou Y-A, Ma Y-X, Zhang Q-B, Gao W-H, Liu J-P ,Yang J-P, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Shanxi, China. Genet Mol Biol 2012;35(4):709-13.
7. Abbaskhanian A, Zamanfar D, Afshar P, Asadpoor E, Rouhanizadeh H, Jafarnia A, et al. Incidence of Neonatal Hyperphenylalaninemia Based on High-performance Liquid Chromatography Confirmatory Technique in Mazandaran Province, Northern Iran (2007-2015). Int J Prev Med 2017;8:93.
8. Motamedi N, Godarzi E, Rahimi Pordanjani S, Valizadeh R ,Moradi Y, Sohrabivafa M, et al. Incidence of Phenylketonuria in Lorestan Province, West of Iran (2006- 2016). Int J Pediatr 2017;5(4):4713-21.
9. Moradi K, Alibakhshi R, Khatami S. The proportion of tetrahydrobiopterin deficiency and PAH gene deficiency variants among cases with hyperphenyalaninemia in Western Iran. Indian J Hum Genet 2013;19(4):454-8.
10. Pey AL, Stricher F, Serrano L, Martinez A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. Am J Hum Genet 2007;81(5):1006-24.
11. Bonyadi M, Omrani O, Moghanjoghi SM, Shiva S. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian Azeri Turkish patients with phenylketonuria. Genet Test Mol Biomarkers 2010;14(2):233-5.
12. Bagheri M, Rad IA, Jazani NH, Zarrin R, Ghazavi A. Association Between PAH Mutations and VNTR Alleles in the West Azerbaijani PKU Patients. Maedica 2014;9(3):242-7.
13. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem Rev 2008;29(1):31-41.
14. Nemati H, Yousefi SSK, Pourvatan N, Aparviz R, Farzaneh P, Koohpar ZK, et al. Mutation analysis of

phenylketonuria in the North of Iran. Gene Reports 2021;24:101196.

15. Bagheri M, Rad IA, Jazani NH, Zarrin R, Ghazavi A. Frequency of the VNTR-Polymorphisms at the PAH Gene in the Iranian Azeri Turkish Patients with Phenylketonuria. Maedica 2015;10(4):310-4.
16. Abedini G, Khazaei-Koohpar Z. Identifying Variable Number of Tandem Repeat Alleles in Phenylalanine Hydroxylase Gene in Patients with Phenylketonuria in Golestan Province, Iran. J Adv Med Biomed Res 2020;28(129):198-203.
17. Saadat M, Kamkar M, Mohabatkar H, Saadat I. High Frequency of IVS10nt546 Linked to VNTR8 in Iranian PKU Patients from Fars Province. Iran Biomed J 2003;7(3):145.

Original Article

# INVESTIGATION OF THE CORRELATION BETWEEN VNTR AND PAH GENE MUTATIONS IN PKU PATIENTS IN GUILAN PROVINCE, IRAN

*Zeinab Khazaei Koohpar[1], Zahra Eskandarpour[2], Ali Kamran[3], Hadiseh Beheshti Dafchahi[4], Saman Seyfizadeh Saraabestani[5], Najmeh Ranji*[6], Afshin Safaei Asl[7]*

*Received: 04 March, 2022; Accepted: 21 August, 2022*

## Abstract

***Background & Aims:*** VNTR alleles in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene are used for carrier detection and prenatal diagnosis in phenylketonuria families. The aim of this study was to investigate linkage between VNTR alleles and the PAH gene mutations in PKU patients in Guilan province, Iran.

***Materials & Methods*:** In this descriptive cross-sectional study, 19 unrelated PKU patients from 17 Shahrivar children hospital in Rasht were enrolled. Genomic DNA was extracted from blood samples of PKU patients. Amplification of gene fragments was carried out by PCR method and underwent direct sequencing.

***Results*:** Our analysis showed that PKU patients in Guilan province had VNTR3/VNTR3, VNTR3/VNTR7, ND/VNTR7, VNTR7/VNTR7, and VNTR8/VNTR8 genotypes in PAH gene. The frequencies of VNTR3, VNTR7, and VNTR8 alleles were 21.05%, 28.94%, and 47.4%, respectively. Length of one allele was not determined (ND) by frequency 0.03%. The linkage between was observed in some mutations of PAH gene such as R400K, R261X, R261Q, IVS4+5G>T و and IVS10-11G>A with VNTR allelels PKU patients.

***Conclusion*:** VNTR3, VNTR7, and VNTR8 alleles can be considered as useful marker in determining PKU carriers in Guilan. Furthermore, Genetic heterogeneity and geographic variation may be the cause of correlation of different mutations with VNTR alleles in PAH gene in Guilan province.

***Keywords:*** IVS10-11G>A, Mutation, *PAH* Gene, Phenylketonuria, VNTR.

***Address:*** Najmeh Ranji, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
***Tel***: +98 1333424080
***Email:*** n_ranji@iaurasht.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022: 33(01): 61 ISSN: 2717-008X

**Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences**

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[1] *Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonkabon Branch, Islamic Azad University, Tonkabon, Iran*
[2] *Master's Degree in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*
[3] *Master's student in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*
[4] *Master's Degree in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*
[5] *Master's student in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*
[6] *Assistant Professor of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (Corresponding Author)*
[7] *Associate Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Rasht Branch, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran*