

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

زینب خزائی کوهپر^{۱*}، نجمه رنجی^۲، افشین صفائی اصل^۳، ثریا شعبانی^۴

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

چکیده

پیش زمینه و هدف: فنیل کتونوری (PKU) یک اختلال مادرزادی متابولیسم اسید آمینه است که حاصل نقص فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) است. تاکنون بیش از ۸۰۰ موتاسیون در ژن PAH شناسایی شده و در پایگاه اطلاعاتی PAHdb ثبت گردیده است و طیف این موتاسیون‌ها در جمعیت‌های مختلف متفاوت است. تظاهر بالینی مهم بیماران درمان نشده عقب ماندگی 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 یک ساله ثبت نام کردند. DNA ژنومی از لوکوسیت‌ها با استفاده از High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) استخراج شد و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز-تعیین توالی برای شناسایی موتاسیون‌ها استفاده گردید.

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

بحث و نتیجه گیری: هرچند مطالعه حاضر فراوانی ۶ موتاسیون ژن PAH را بررسی کرده، این موتاسیون‌ها تنها در ۳۲ درصد کروموزوم‌ها یافت شده است. از این رو 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 اسید آمینه در جهان است، آن یک اختلال ژنتیکی اتوزومال مغلوب است که به وسیله 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 از جمله مغز می‌گردد و در صورت عدم درمان موجب عقب ماندگی ذهنی می‌شود (۲). بر اساس اولین مطالعات انجام شده در بیماران مبتلا به PKU در ایران، فراوانی بالای بیماری (۵-۲۱ درصد) در میان افراد عقب مانده ذهنی نشان داد

که PKU می‌تواند یکی از علل اصلی عقب ماندگی 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 میکرومول بر لیتر) ۳-هایپر فنیل آلانینمیی خفیف (فنیل آلانین سرم کمتر از ۶۰۰ میکرومول بر لیتر) (۱). بر این اساس شدت

^۱ استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران. (نویسنده مسئول)

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۳ دانشیار، گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، گیلان، ایران

^۴ کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

بیماری نیز از هایپر فنیل آلانینی 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. به‌عنوان مثال شیوع PKU در جمعیت ترکی حدود ۱ در ۲۶۰۰ و جمعیت فنلاندی و یهودی 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). زن مسئول بیماری، PAH با طولی حدود ۹۰ کیلو باز روی کروموزوم ۱۲q 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 و p.R261Q را با فراوانی‌های متفاوتی گزارش نموده است. به‌طوری‌که بیش‌ترین فراوانی مربوط به جهش‌های فوق در ایران به‌ترتیب ۹/۴ درصد (۱۰)، ۱۲/۸۶ درصد (۱) و ۸ درصد (۲) می‌باشد. لازم به ذکر است که جهش R261Q یک جهش شایع در دنیا است و دومین جهش شایع در ترکیه می‌باشد (۲). بعلاوه فراوانی آن در سایر کشورها مثل ایتالیا ۲۲/۵ درصد، برزیل ۱۲/۲ درصد، آلمان ۶ درصد، کره ۰/۶ درصد، لیتوانی ۰/۵ درصد، پرتغال ۱۰/۴ درصد، مصر ۱/۵ درصد و کوپا ۵/۸ درصد (۲) گزارش شده است. گرچه ایتالیا بالاترین فراوانی را برای جهش مذکور نشان می‌دهد اما در جمعیت این کشور جهش R261X از فراوانی پایینی (۲ درصد) برخوردار است (۲). با توجه به موارد فوق هدف از مطالعه حاضر، بررسی حضور موتاسیون‌های p.R261Q, p.R252W,

مواد و روش کار

بیماران:

در این مطالعه مقطعی - توصیفی، ۲۵ بیمار PKU 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 بیماران 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 Template محصول 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 سانتریفوژ، شستشو با بافر شستشو شماره ۲ صورت گرفت. بعد از سانتریفوژ 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) و ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):

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

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 (۳۶ درصد)، PKU خفیف (۳۲ درصد) و HPA خفیف (۳۲ درصد) قرار داشتند. و از نظر جنسیت شامل هم مرد و هم زن بوده و در محدوده سنی ۱ تا ۲۱ سال قرار داشته‌اند. ترکیب قومیتی آن‌ها نیز شامل گیلک (۷۶ درصد)، تالش (۱۲ درصد) و ترک (۱۲ درصد) بود.

نتیجه کمی و کیفی DNA استخراج شده:

نانواسپکتروفتومتر کمیت و کیفیت DNA استخراج شده را از نمونه خون بیماران به ترتیب در محدوده ۱۰۰۲-۱۰۷ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ را در محدوده ۱/۷۹-۲ 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 ۳۵۸ bp در شکل 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 ذکر شده 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.P281L و p.p.R243X, E280K و R261X) 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 اسید آمینه 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 بد معنی 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 اسید آمینه 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

منظور DNA ژنومی و جفت پرایمر (پیکومول ۲۰) به مخلوط واکنش اضافه گردید و با آب استریل به حجم ۵۰ میکرولیتر رسید. میکروتیوب‌های حاوی اجزای واکنش، در دستگاه ترموسایکلر مدل TC-۴۰۰ (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 طولیل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و نهایتاً در دمای طولیل‌سازی 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 ۱۰۰ bp (Biotechrabbit) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد 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 سکونسر ABI3730 (شرکت ماکروژن کره جنوبی) انجام شد سپس از نرم‌افزارهای Chromas و CLC main work bench 5 جهت خوانش توالی‌ها و مقایسه نتایج دستگاه سکونسر با توالی رفرنس در سایت NCBI استفاده شد.

آنالیز آماری:

برای محاسبه فراوانی نسبی آلل‌ها از آمار توصیفی استفاده شد. بدین ترتیب که تعداد آلل‌های شناسایی شده برای یک جهش خاص بر تعداد کل آلل‌های 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 شدند و درموردی که خانواده‌ای بیش از یک

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

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

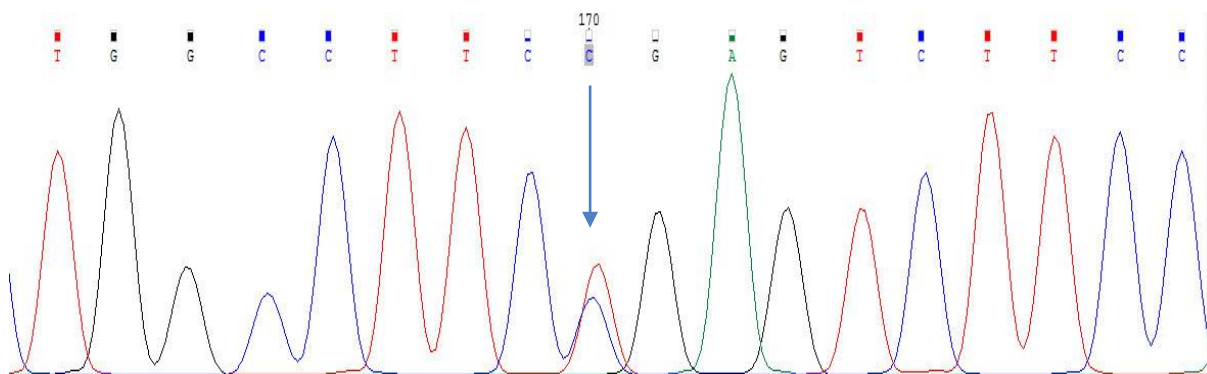
جهش در سطح پروتئین	جهش در سطح DNA	نوع جهش	تعداد آلل ها	فراوانی نسبی (%)	تغییرات بازی
p.P281L	c.842C>T	بدمعنی	۰	۰	CCG>CTG
p.R243X	c.727C>T	بی‌معنی	۰	۰	CGA>TGA
p. R252W	c.754 C>T	بدمعنی	۰	۰	CGG>TGG
p.R261Q	c.782G>A	بدمعنی	۵	۱۰	CGA>CAA
p.R261X	c.781C>T	بی‌معنی	۱۱	۲۲	CGA>TGA
p. E280K	c.838G>A	بدمعنی	۰	۰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

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

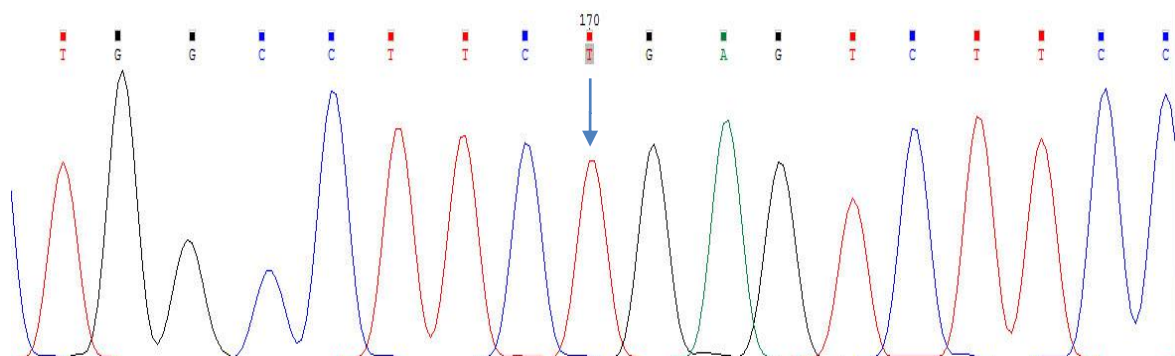
بیمار	ژنوتیپ		فنوتیپ متابولیک	قومیت
	آلل ۱	آلل ۲		
۲	R261X		cPKU	ترک
۳	R261X	R261X	mHPA	گیلک
۴	R261X		mHPA	گیلک
۵	R261Q		mHPA	گیلک
۶	R261X		cPKU	نالش
۷	R261X		mPKU	ترک
۸	R261Q		cPKU	گیلک
۱۳	R261X		cPKU	گیلک
۱۴	R261Q		cPKU	گیلک
۱۶	R261X		cPKU	ترک
۱۷	R261X	R261X	mHPA	گیلک
۱۸	R261X		mPKU	گیلک
۲۲	R261Q	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



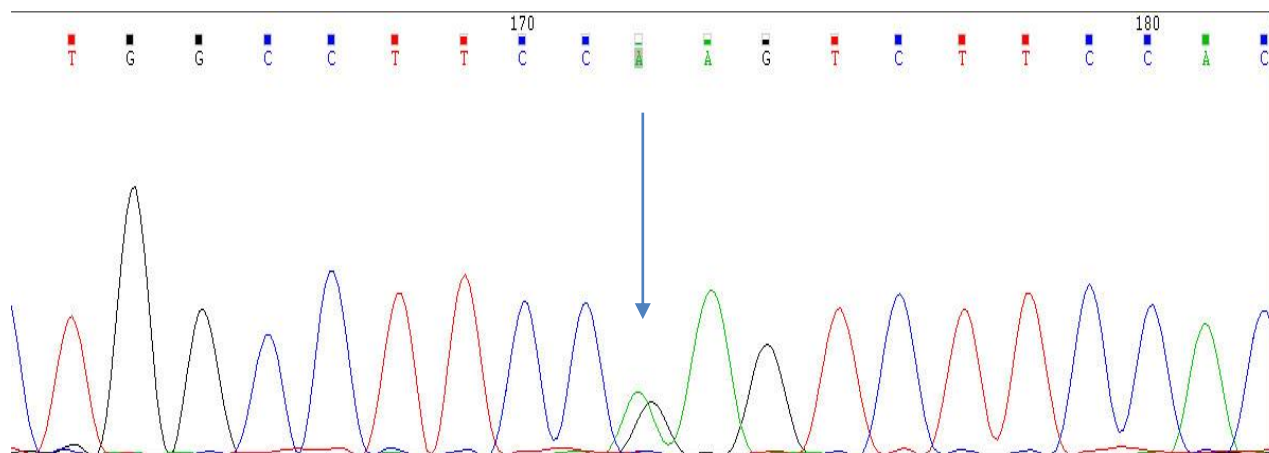
شکل (۱): نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط به قطعه مورد مطالعه (۳۵۸ جفت باز) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، M (سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز)، شماره‌های ۱-۳ و ۴-۶ مربوط به نمونه بیمار و C- کنترل منفی



شکل (۲): الکتروفروگرام جهش Arg>Term(CGA>TGA)R261X به صورت هتروزایگوت مربوط به بیمار شماره ۱۶ (توالی رفت)



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



شکل (۴): الکتروفورگرام جهش Arg>Gln(CGA>CAA)R261Q به صورت هتروزایگوت مربوط به بیمار شماره ۸ (توالی رفت)

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه فعلی ۶ موتاسیون شایع ژن *PAH* شامل *p. R261Q*, *p. R252W*, *p. R261X*, *p. R243X*, *p. P281L* و *p. E280K* در ۲۵ فرد مبتلا به PKU از استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت و دوجیش *p. R261Q* و *p. R261X* به ترتیب 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 از جمله در مطالعه بنیادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بیماران ترکی آذری ایرانی جهش *P281L* یکی از شایع‌ترین (۱۹/۳ درصد) جهش‌ها بود (۸). شیخ‌الاسلام و همکاران نیز با مطالعه ۱۴۰ بیمار PKU کلاسیک (غالباً از نواحی مرکزی ایران) جهش *P281L* را با فراوانی ۱۹/۳ درصد گزارش نمودند (۱).

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

یکی دیگر از ۶ جهش مورد مطالعه جهش بی‌معنی *R243X* بود، از جمله گزارشانی که در مورد جهش مذکور در جمعیت PKU ایران موجود است می‌توان به مطالعه بنیادی و همکاران در بیماران PKU ترکی آذری ایرانی (۸)، زارع‌کاریزی در بیماران PKU در مناطق مختلف ایران ۶/۹ درصد (۴)، مرادی در کرمانشاه

۲ درصد (۲)، حمزه‌لوئی در خراسان‌رضوی ۳/۲ درصد (۱۰)، عجمی در خوزستان ۶/۲۵ درصد (۱۱)، علی‌بخشی در کرمانشاه ۱/۸ درصد (۱۴) و رضی‌پور و همکاران در خانواده‌های ایرانی با نقص *PAH* ۷/۴۱ درصد (۵) اشاره نمود؛ به علاوه شیخ‌الاسلام و همکاران با مطالعه ۱۴۰ بیمار PKU کلاسیک (غالباً از نواحی مرکزی ایران) جهش *R243X* را با فراوانی ۲/۵ درصد 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* اولین بار در سال ۲۰۰۳ در اصفهان توسط ولیان و همکاران با فراوانی ۱۵/۳۸ درصد گزارش شد (۹). از آن پس مطالعات دیگر در مناطق مختلف ایران این موتاسیون را با فراوانی‌های مختلف گزارش کردند از جمله می‌توان به مطالعه در مناطق مختلف ایران ۴/۸ درصد (۴)، خراسان‌رضوی ۱/۶ درصد (۱۰)، خوزستان ۲/۵ درصد (۱۱) و آذربایجان غربی ۳/۷۵ درصد (۱۵) اشاره نمود. متعاقب آن در دو مطالعه دیگر از ایران به ترتیب با فراوانی ۲/۱۴ درصد (۱) و ۲/۳۶ درصد (۱۳) گزارش گردید. در حالی که 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 به ترتیب مربوط به جمعیت ترکی آذری ایرانی با فراوانی ۲/۳ درصد (۸)، مناطق مختلف ایران ۰/۸ درصد (۴)، خراسان‌رضوی ۶/۴ درصد (۱۰) و استان‌های قزوین و زنجان ۲/۵۶ درصد (۱۲) می‌باشد. مطالعات سال ۲۰۱۷ فراوانی جهش *E280K* را در بیماران PKU ایرانی ۰/۶۲ درصد (۵) و سال ۲۰۱۸ فراوانی جهش فوق را در ایران ۰/۷۱ درصد (۱) گزارش نموده است. به علاوه شیرزاد و همکاران نیز

کشورهایی چون کروواسی ۴ درصد، ایتالیا ۲ درصد، برزیل ۰ درصد، آلمان ۱٪، کره ۶/۵ درصد، لیتوانی ۵/۵ درصد، پرتغال ۴/۰ درصد (۲)، سیسیل ۳/۸ درصد (۱۹) و ناحیه Novosibirsk روسیه ۶۷/۰ درصد (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 ۴/۵ درصد 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 ۴/۸ درصد 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 ۸ درصد 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 استان کرمانشاه در ۲۷ فرد مبتلای غیرخویشاوند میزان این جهش ۷/۴ درصد 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 ۵/۱۲ درصد بود (۱۲). به‌علاوه طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ در ایران این جهش با فراوانی ۴/۹۴ درصد 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 به ترتیب ۲/۳ درصد و ۰ درصد گزارش شد (۷). با توجه به مطالعات فوق، بیش‌ترین فراوانی (۲۲ درصد) 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 هتروژنیته 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

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.

دو جهش 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. دامینه شدن ۵- متیل سائیتوزین در این دی‌نوکلئوتیدها باعث تبدیل آرژنین به گلوآمین و یا آرژنین به کدون خاتمه می‌شود (۲).

جهش R261Q یک جهش بد معنی است که در این مطالعه با فراوانی ۱۰ درصد در ۵ بیمار به‌صورت هتروزیگوت مشاهده گردید. در این جهش تغییر باز در کدون ۲۶۱ م ژن باعث تبدیل CGA>CAA و تغییر اسید آمینه 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 ۷/۶۹ درصد (۹)، در جمعیت ترکی آذری ایرانی ۵/۷ درصد (۸)، در مناطق مختلف ایران ۱۲/۱ درصد (۴)، کرمانشاه ۲ درصد (۲)، خوزستان ۲/۵ درصد (۱۱)، کرمانشاه ۱/۸ درصد (۱۴)، استان‌های زنجان و قزوین ۷/۶۹ درصد (۱۲) و در دو استان شمالی ایران مازندران و گلستان به ترتیب ۶/۸ درصد و صفر درصد (۷) می‌باشد. همچنین در سه مطالعه‌ای که اخیراً در جمعیت PKU ایرانی صورت گرفته به ترتیب به فراوانی‌های ۸/۰۲ درصد (۵)، ۱۲/۸۶ درصد (۱) و ۱۰/۷ درصد (۱۳) اشاره شده است. در مطالعه ما از استان گیلان نیز این جهش با فراوانی ۱۰ درصد 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 ۸/۷ درصد (۱۶)، Xinjiang چین ۰/۸ درصد (۱۷)، روسیه ۸ درصد (۱۸)، کروواسی ۹ درصد، ایتالیا ۲/۵ درصد، برزیل ۱۲/۲ درصد، آلمان ۶ درصد، کره ۶/۰ درصد، لیتوانی ۵/۵ درصد، پرتغال ۴/۱۰ درصد، مصر ۱/۵ درصد و کوبا ۸/۵ درصد (۲) گزارش شده است.

جهش R261X یک جهش بی‌معنی است که در این مطالعه با فراوانی ۲۲ درصد در دو بیمار به‌صورت هموزیگوت و در هفت بیمار به‌صورت هتروزیگوت مشاهده گردید. در این جهش تغییر باز در کدون ۲۶۱ م ژن PAH باعث تبدیل CGA>TGA و تغییر اسید آمینه Arg>Term شده است. فراوانی جهش R261X در

شده است. از این رو جهش‌های مختلف، مسئول بیماری PKU در شمال ایران هستند و مطالعات بیش‌تر برای شناسایی تمام جهش‌های ژن PAH در منطقه توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن با شماره ۸۳۴۵، ۹۷/۴/۱۶ می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به‌دلیل حمایت‌های مالی از این طرح قدردانی می‌نمایند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

حدودی به قرابت یا عدم قرابت پیشینه‌ای 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 موتاسیون‌های متعدد در ژن PAH عامل PKU و عدم وجود بودجه کافی جهت بررسی همه موتاسیون‌ها، در این تحقیق تنها چند موتاسیون ژن PAH در جمعیت PKU این منطقه مورد مطالعه قرار گرفت. بنابراین شناسایی طیف کامل موتاسیون‌های ژن PAH در بیماران PKU استان گیلان نیازمند بررسی کل طول ژن PAH می‌باشد.

نتیجه‌گیری

اگر چه مطالعه حاضر به بررسی فراوانی ۶ جهش در ژن PAH پرداخته است، این جهش‌ها فقط در ۳۲ درصد کروموزوم‌ها مشاهده

References:

- 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
- 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.
- Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem Rev 2008;29(1): 31-41.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ajami, N, Kazeminezhad S.R, Foroughmand A.M, Hasanpour M, and Aminzadeh. M, A. A preliminary

- 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 residual in vitro phenylalanine 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. Guldborg 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.

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

Zeinab Khazaei -Koothpar ^{*1}, Najmeh Ranji ², Afshin Safaei Asl ³, Soraya Shabani⁴

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 Assistant 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