مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۶، خرداد ۱۳۹۶، صفحه ۴۹-۴۲

بررسی مولکولی و آنالیز بیوانفورماتیکی دو جهش شایع ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز (PAH) با روش HRM

ملیکا امیر (MSc)[۱]، مجتبی عمادی بایگی (PhD)[۲*]، صادق ولیان (PhD)[۳]، پروانه نیک پور (PhD)[۴]، فاطمه آخوندی (MSc)[۱]

۱-گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد
۲-پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد
۳-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۴-گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

دریافت: ۹۵/۱۰/۱۲، اصلاح: ۹۵/۱۲/۴، پذیرش: ۹۶/۲/۱۰

خلاصه

سابقه و هدف: بیماری فنیل‌کتونوری شایع‌ترین خطای مادرزادی متابولیسم آمینواسید در جهان است و نرخ بروز آن در ایران در حال افزایش است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی کارایی روش HRM به عنوان روشی سریع و مناسب در شناسایی جهش‌های شایع ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز من‌جمله IVS10-11G>A و P281L می‌باشد، تا با کمک به تشخیص زود هنگام این بیماری بتوان از بروز علائم آن جلوگیری کرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی ۲۰ نمونه DNA شامل یک نمونه حاوی جهش IVS10-11G>A و یک نمونه حاوی جهش P281L و ۱۸ نمونه کنترل فاقد بیماری PKU که از خون محیطی استخراج شده و از مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان جمع‌آوری شدند با روش HRM در دستگاه Real time PCR تعیین ژنوتیپ گردیدند. جهت تایید جهش ها، نمونه‌های جهش یافته با روش توالی‌یابی تعیین ژنوتیپ شدند. مطالعه بیوانفورماتیکی برای تعیین اثرات ساختاری و عملکردی جهش P281L بر پروتئین PAH استفاده شد.

یافته‌ها: روش HRM جهش‌های IVS10-11G>A و P281L را با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ شناسایی کرد و نمونه‌های جهش یافته و کنترل در نمودارهای طبیعی-سازی و تمایز به راحتی از هم قابل تفکیک و تمایز بودند. مطالعات بیوانفورماتیکی اثرات ناپایداری و بیماری‌زا بودن پروتئین PAH حاوی جهش P281L را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که روش HRM روشی ساده و سریع است و با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ توانست دو جهش IVS10-11G>A و P281L را شناسایی کند.

واژه‌های کلیدی: فنیل‌کتونوری، حساسیت، اختصاصیت، تعیین ژنوتیپ.

مقدمه

بیماری فنیل‌کتونوری (Phenylketonuria=PKU) شایع‌ترین خطای مادرزادی متابولیسم آمینواسید در جهان است و به دلیل نقص آنزیم فنیل‌آلانین-هیدروکسیلاز (Phenylalanine Hydroxylase =PAH) کبدی ایجاد می‌شود. این نقص منجر به تجمع فنیل‌آلانین (Phenylalanine=Phe) و متابولیت‌های آن در بافت‌ها و مایعات بدن مثل مغز، خون و ادرار در بیماران PKU می‌شود (۱) که یکی از پیامدهای مهم آن عقب‌ماندگی ذهنی است (۲). آنزیم PAH، هیدروکسیلاسیون L-Phe (L enantiomers=L) را به L-Tyr (Tyrosine) کاتالیز می‌کند (۳). مونومر آن متشکل از ۴۵۲ آمینواسید است. ژن PAH انسانی روی بازوی بلند کروموزوم ۱۲ قرار گرفته و حاوی ۱۳ اگزون و ۱۲ اینترون است. میزان بروز بیماری PKU بسته به کشورها یا نواحی مختلف متفاوت است. کشورهایی مثل ایرلند و ترکیه (۴) بالاترین شیوع را دارند و کشورهایی مثل ژاپن (۵) و فنلاند (۶) پایین‌ترین بروز را دارند. مطالعات اخیر در ایران، نشان‌دهنده بروز بالای آن در جمعیت ایرانی در حدود ۱ در ۴۶۹۸ تولد است (۷). بروز بالای بیماری‌های وراثتی اتوزومی مغلوب به دلیل ازدواج‌های فامیلی است. بیش از ۹۰۰ جهش در ژن PAH شناخته شده که در پایگاه داده خاص لوکوس PAHvdb معرفی شده است. حدود ۹۰٪ جهش‌ها، جهش‌های نقطه‌ای هستند(۸). مطالعه انجام شده توسط Vallian و همکاران در اصفهان اشاره به شیوع بالای این بیماری (۵٪) در میان افراد عقب‌مانده ذهنی دارد و طبق گزارش آنها جهش‌های P281L و IVS10-11G>A از جهش‌های شایع در اصفهان می‌باشند (۹). جهش IVS10-11G>A (rs۵۰۳۰۸۵۵) با نام سیستماتیک c.1066-11G>A و نام دیگر IVS10nt546g>a شایع‌ترین جهش نواحی مدیترانه‌ای مثل ترکیه، ایتالیا، اسپانیا، مصر (۱۱و۱۰) و ایران در شهرهایی

▣ این مقاله حاصل پایان نامه ملیکا امیر دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه شهرکرد می‌باشد.

*مسئول مقاله: دکتر مجتبی عمادی بایگی
آدرس: شهرکرد، بلوار رهبر، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک. تلفن: ۰۳۸-۳۲۳۲۴۴۱۹
E-mail: emadi-m@sci.sku.ac.ir

چون آذربایجان، خراسان، سمنان و همدان است (۱۲). جهش P281L (rs۵۰۳۰۸۵۱) دارای نام سیستماتیک c.842C>T می‌باشد (۱۳). در مطالعات Zare-Karizi و همکاران، جهش IVS10-11G>A شایع‌ترین جهش در جمعیت ایرانی است و جهش P281L از شیوع نسبتاً بالایی در جمعیت ایرانی برخوردار است (۱۲). آنالیز ذوب با تفکیک بالا (High Resolution =HRM Melting) از روش‌های جدید پس از PCR برای شناسایی جهش‌های شناخته شده و ناشناخته از جمله جهش‌های ژن PAH است. در این روش، تکثیر هدف در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای در یک لوله بسته طی واکنش PCR انجام می‌شود، به دنبال آن با شروع مرحله HRM و افزایش دما از حدود ۶۵°C تا ۹۵°C منحنی ذوب با واسرشته شدن آرام نمونه DNA ایجاد می‌شود. در طول ذوب، تنها رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای پرتو متصاعد می‌کند و نور فلورسانس به طور مداوم توسط سیستم نوری شناسایی و به صورت نمودار ظاهر می‌شود. با ذوب DNA مولکول‌های رنگ از آن جدا می‌شوند و در نتیجه شدت فلورسانس افت می‌کند. نقطه عطف نمودار مربوطه به عنوان دمای ذوب DNA (Melting temperature=Tm) در نظر گرفته می‌شود. قطعات DNA با طول یکسان چنانچه حتی در یک نوکلئوتید متفاوت باشند Tm متفاوت خواهند داشت (۱۴). در مطالعات Dobrowolski و همکاران از روش HRM برای تعیین ژنوتیپ بیماران PKU استفاده شد و با اختصاصیت و حساسیت ۹۹٪ جهش‌ها شناسایی شدند (۱۵). همچنین از آنالیز HRM برای تعیین ژنوتیپ و پایش کردن (Scanning) بیماری‌های اتوزومی مغلوب دیگر مثل سیستیک فیبروزیس (۱۶) و Bتالاسمی (۱۷) و همچنین سرطان (۱۸) به کار برده شده است. هدف از مطالعه حاضر، تعیین اختصاصیت و حساسیت روش HRM در شناسایی و تعیین ژنوتیپ جهش‌های IVS10-11G>A و P281L در ژن PAH می‌باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA از خون تام: در مطالعه مورد-شاهدی حاضر، ۲۰ نمونه خون شامل دو نمونه جهش یافته یکی حاوی جهش IVS10-11G>A و دیگری حاوی جهش P281L و ۱۸ نمونه کنترل فاقد بیماری از مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان جمع‌آوری و نمونه‌های DNA با روش Miller و همکاران (۱۹) استخراج شدند. رویه های آزمایشگاهی توسط شورای اخلاق پژوهش دانشگاه شهرکرد با کد SKU.REC.۱۳۹۴.۲۷۲ مورد تصویب قرار گرفت. از کلیه افراد نیز رضایت آگاهانه کتبی در مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان اخذ گردید.

طراحی پرایمر: برای طراحی پرایمرهای مربوط به دو جهش IVS10-11G>A و P281L ابتدا توالی ژن PAH با شماره دسترسی آن NG۰۰۸۶۹۰ از سایت National Center for Biotechnology Information (NCBI) گرفته شد و با کمک نرم‌افزار Gene runner (http://www.generunner.net) نسخه (ورژن) ۶/۴/۰۶ پرایمرها طراحی شدند (جدول۱) و توالی آمپلیکون ۱۲۳ bp حاوی جهش P281l و توالی آمپلیکون ۱۲۵ bp حاوی جهش IVS10-11G>A به کمک پرایمرها تکثیر شدند.

واکنش PCR: واکنش PCR در حجم ۲۵ µL در حضور ترکیبی از مواد شامل: ۵/۲µL از بافر ۱۰x، ۵/۰ µL از dNTP (Deoxynucleotide triphosphate) (۴۰ mM)، ۷۵/۰ µL $MgCl_2$ (۱۰۰ mM)، از هر پرایمر Taq DNA polymerase (۱۰ pmol/µlit) ۵/۰ µL، ۲۵/۰ µL از (۵unit/µlit)، ۳µL از DNA (۲۰۰ ng/µL) و ۱۷µL آب دیونیزه انجام شد. تکثیر PCR توسط دستگاه بیوئر (TC-XP-G) و در طی مراحل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۹°C برای جهش P281L و دمای ۵۷°C برای جهش IVS10-11G>A به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها طویل سازی انتهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

برای به دست آوردن دمای مناسب اتصال برای تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر برای جهش P281L از شیب دمایی ۵۷ تا ۵۹ درجه سانتی‌گراد و برای جهش IVS10-11G>A از شیب دمایی ۵۴ تا ۵۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR استفاده شد.

جدول۱. توالی پرایمرهای مربوط به جهش P281L و IVS10-11G>A

نام الیگو	توالی	اندازه قطعه
PAHP281L-Forward	GGATCCAAGCCCATGTATAC-5′-3′	۱۲۳bp
PAHP281L-Reverse	GACCAGCCAGCAATGAAC -5′-3′	
PAHIVS10-11-Forward	GGATGCAGCAGGGAATAC -5′-3′	۱۲۵bp
PAHIVS10-11-Reverse	TTGGATGGCTGTCTTCTC –5′-3′	

آشکارسازی مولکول‌های DNA روی ژل آگارز: به منظور اطمینان از صحت تکثیر نمونه‌های DNA موردنظر، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

واکنش HRM: برای انجام مرحله HRM، از کیت Type it شرکت کیاژن (Qiagen ,Germany) استفاده شد و در دستگاه روتور ژن ۶۰۰۰ (Qiagen, Hilden, Germany) انجام شد. کیت HRM حاوی مستر PCR است که این مستر شامل: DNA پلیمراز HotStarTaqPlus، بافر PCR مدل Type it به همراه رنگ EvaGreen، محلول Q و ترکیب dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) می‌باشد.

واکنش HRM در حجم ۱۰ µL و با ترکیب موادی شامل: ۵ µL مستر HRM، ۵/۰ µL DNA الگو (۲۰۰ ng/µL)، ۳/۰ µL از هر پرایمر (۱۰ pmol/µlit) و ۹/۳ µL آب RNase-free انجام شد.

قبل از فرآیند HRM، واکنش PCR در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای انجام شد که در این واکنش مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵°C به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۹°C برای جهش P281L و ۵۷°C برای جهش IVS10-11G>A به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱۰ ثانیه بود و به دنبال آن مرحله HRM و افزایش دما از دمای کم به زیاد برای هر دو جهش از دمای ۷۸°C تا ۹۵°C انجام شد.

روش توالی‌یابی (sequencing): توالی یابی روش نهایی و استاندارد طلایی جهت تشخیص جهش می‌باشد در نتیجه برای تأیید وجود جهش در نمونه‌های

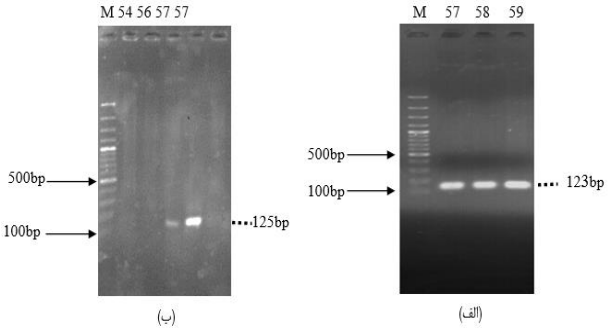
جهش یافته از تعیین توالی استفاده شد. جهت انجام تعیین توالی، از دستگاه ABI3500 (Life Technologies, Foster City, CA, USA) و روش اختتام زنجیره استفاده گردید.

مطالعات بیوانفورماتیکی: ابزارهای بیوانفورماتیکی پیش‌گویی‌های محاسباتی را در مورد اثرات ساختاری و عملکردی تغییرات توالی پروتئینی فراهم می‌آورند.

در مطالعه حاضر برای بررسی اثرات جهش P281L روی ساختار و عملکرد پروتئین PAH از روش‌های بیوانفورماتیکی استفاده شد و پایگاه‌ها و ابزارهای مختلف شامل: I-Mutant، PROVEAN، SNP&GO، PhD-SNP، PANTHER، NetSurfP، HOPE و I-TASSER مورد استفاده قرار گرفت که توصیف آنها در مطالعه Akhoundi و همکاران ذکر شده است (۲۰).

یافته‌ها

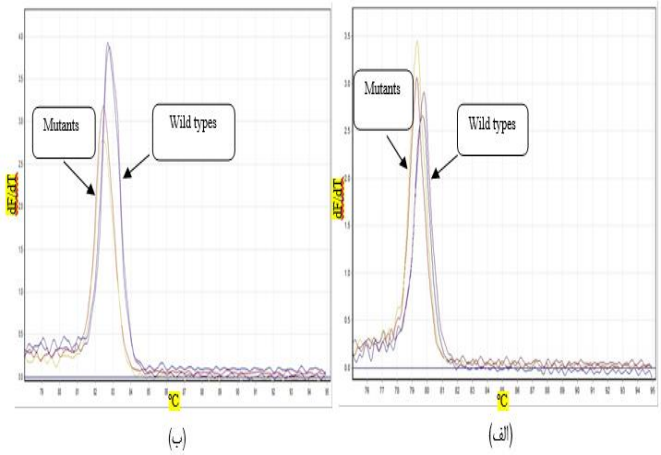
مشاهده نتایج PCR در ژل آگارز: در این مطالعه، پس از استخراج نمونه‌های DNA و تکثیر آن‌ها باند بدون اسمیر در ژل مشاهده شد و اطمینان از صحت تکثیر حاصل شد. پس از استفاده از PCR با شیب دمایی، دمایی که باند بارزی در اندازه مورد نظر داد به عنوان دمای مناسب اتصال انتخاب شد (شکل۱).



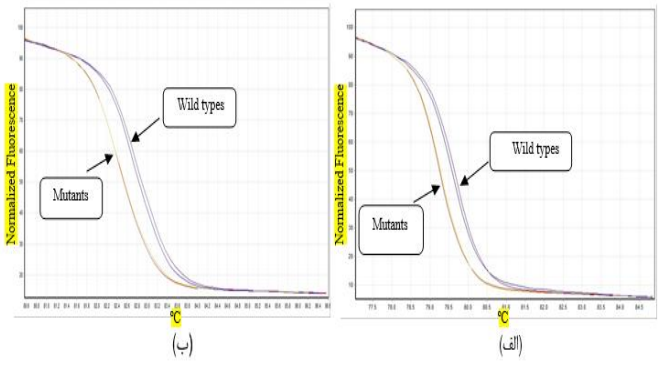
شکل۱. نتایج الکتروفورز تکثیر قطعه‌ی۱۲۳ جفت بازی مربوط به جهش P281L (الف) و ۱۲۵ جفت بازی مربوط به جهش IVS10-11G>A (ب) در ژن PAH با شیب دمایی مورد نظر. چاهک شماره ۱ (M) مارکر وزن مولکولی (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) و چاهک‌های شماره ۲،۳ و ۴ نتیجه تکثیر قطعه در دمای مورد نظر را نشان می‌دهد. در شکل الف در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد باند بهتری مشاهده شد و در شکل ب فقط در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد باند مشاهده شد.

نتایج واکنش HRM و توالی‌یابی: واکنش HRM برای تعیین ژنوتیپ ۲۰ نمونه DNA انجام شد و طی ۴۰ چرخه، تکثیر قطعات DNA انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار روتور ژن ۶۰۰۰ نسخه ۲/۰/۲ نمودارهای طبیعی سازی (Normalized graph)، تمایز (Difference graph) و آنالیز منحنی ذوب (melt curve analysis) ترسیم شد. نمونه‌های هموزیگوت بر اساس تفاوت در نقطه ذوب قابل تمایز با نمونه‌های طبیعی هستند و نمونه‌های هتروزیگوت بر اساس شکل منحنی قابل تمایزند. در آنالیز منحنی ذوب، تفاوت در الگوی تک رشته‌ای شدن DNA که برای قطعه‌های مختلف DNA کاملاً اختصاصی است نشان داده شد (شکل۲). در نمودار طبیعی سازی (شکل۳) که تنها بازه دمایی در مرحله ذوب را نشان می‌دهد، فلورسنس اولیه برابر ۱۰۰٪ و فلورسنس باقیمانده بعد از جدا شدن DNA، صفر درصد در نظر گرفته شد. در نمودار تمایز (شکل۴) که تجسم بهتری از تفاوت‌های کوچک بین منحنی‌های ذوب افراد ایجاد می‌کند و هر ژنوتیپ می‌تواند به عنوان رفرنس انتخاب شود که معمولاً نمونه نرمال است یک نمونه نرمال به عنوان کنترل استفاده شد و تفکیک نمونه دارای جهش PAH از نمونه‌ی نرمال به راحتی انجام شد. جهت تایید ژنوتیپ نمونه های جهش یافته، تعیین توالی به انجام رسید که موید وجود جهش های ذکر شده در نمونه ها بود (شکل ۵).

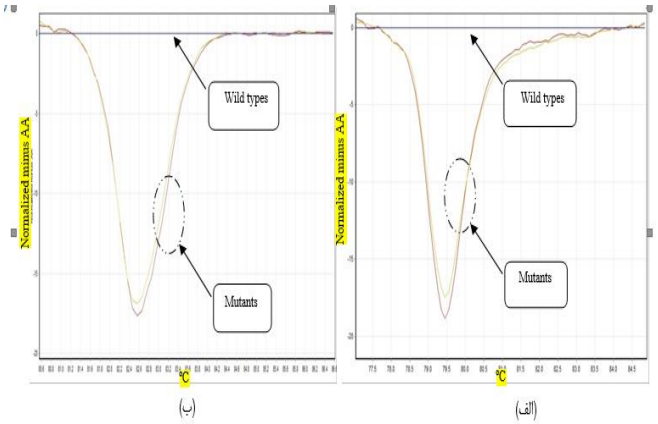
نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی: با به کارگیری پایگاه‌های مختلف بیوانفورماتیکی ناپایداری و بیماری‌زا بودن پروتئین PAH حاوی جهش P281L نشان داده شد و تطابق نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی (In silico) و تجربی (In vivo) حاصل شد. در مجموع، روش HRM توانست با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪، افراد مبتلا به PKU دارای دو جهش P281L و IVS10-11G>A را از سایر افراد تمایز دهد.



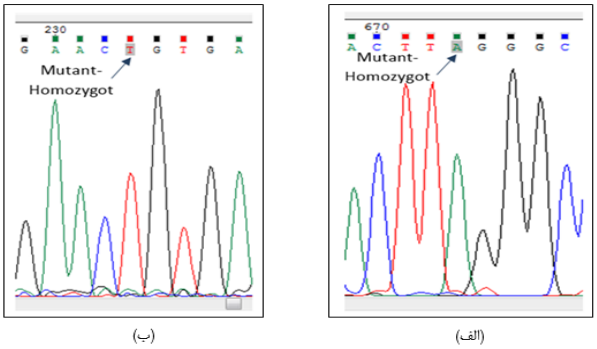
شکل۲. منحنی ذوب خام داده‌ها مربوط به جهش‌های IVS10-11G>A (الف) و P281L (ب). همان‌طور که نشان داده شده است دمای ذوب نمونه نرمال و جهش‌یافته متفاوت است. رنگ قرمز و خردلی نمودارهای نمونه‌های جهش‌یافته و رنگ آبی و بنفش نمودارهای نمونه‌های طبیعی را نشان می‌دهند



شکل۳. نمودار طبیعی سازی نمونه‌های نرمال و جهش‌دار مربوط به جهش‌های IVS10-11G>A (الف) و P281L (ب). در این نوع نمودار نمونه‌های نرمال و جهش‌یافته به صورت از هم تفکیک شده نشان داده شدند. رنگ قرمز و خردلی نمودارهای نمونه‌های جهش‌یافته و رنگ آبی و بنفش نمودارهای نمونه‌های طبیعی را نشان می‌دهند



شکل ۴. تمایز نمونه‌های جهش یافته از حالت نرمال به وسیله نمودار تمایز مربوط به جهش‌های IVS10-11G>A (الف) و P281L (ب). همان‌طور که در شکل مشخص است این نوع نمودار، باعث تفکیک نمونه‌های هموزیگوت جهش یافته از نمونه نرمال شد. رنگ قرمز و خردلی نمودارهای نمونه‌های جهش‌یافته و رنگ آبی و بنفش نمودارهای نمونه‌های طبیعی را نشان می‌دهند



شکل ۵. نتایج به دست آمده از توالی‌یابی مربوط به جهش‌های IVS10-11G>A (الف) و P281L (ب). در شکل الف نوکلئوتید G به A تبدیل شده است. و در شکل ب نوکلئوتید C به T تبدیل شده است.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر روش HRM توانست دو جهش IVS10-11G>A و P281L را با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ شناسایی نماید. تحقیقاتی که به وضوح با استفاده از روش HRM مبادرت به تعیین ژنوتیپ این دو جهش نموده باشند بسیار محدود می باشند. در همین راستا، Dobrowolski و همکاران توانستند ۹۵/۵٪ آلل های جهش یافته ژن PAH را در ۶۷ بیمار لهستانی مبتلا به PKU با روش HRM شناسایی نمایند. علت اصلی عدم موفقیت در شناسایی ۱۰۰٪ جهش های ژن PAH در آن مطالعه به عدم توانایی این روش در شناسایی جهش های حذفی بر می گردد (۹).

در هر حال، برای تشخیص مولکولی این دو جهش از روش‌های دیگری نیز استفاده شده است. برای مثال برای شناسایی جهش‌های IVS10-11G>A و P281L به عنوان جهش‌های شایع در خراسان رضوی از روش توالی‌یابی استفاده شد (۲۱). همچنین برای شناسایی این جهش‌ها در ترکیه ابتدا از روش DHPLC و سپس از روش توالی‌یابی استفاده شد (۲۲) و از روش SSCP و توالی‌یابی در شمال چین (۲۳) و از روش‌های DGGE، RFLP و توالی‌یابی در آلمان استفاده شد (۲۴). میزان تشخیص فرآیند SSCP حدود ۷۰٪ است اما مشکل عمده این روش عدم شناسایی بسیاری از جهش‌ها به دلیل عدم تأثیر بسیاری از آنها بر رشته دارای جهش می‌باشد. در نتیجه در الگوی مهاجرت قطعه‌ها تفاوتی مشاهده نمی‌شود.

قدرت تشخیص روش DGGE بالای ۹۵٪ است اما روش آن پیچیده است و نیاز به تجهیزات نسبتاً پیچیده‌ای دارد. قدرت تشخیص روش DHPLC بالای ۹۶٪ است. از معایب آن این است که بهینه‌سازی روش اگرچه کوتاه است نیاز به ورود مستقیم اپراتور دارد که مانع اتوماسیون می‌شود. بعلاوه، بعضی از قطعات چندین دومین ذوب دارند که به راحتی با روش انتخاب دمایی ذوب تجربی نادیده گرفته می‌شوند. در RFLP قطعات محدودکننده با الکتروفورز جدا می‌شوند. از معایب این تکنیک این است که نیاز به ایجاد یا از بین‌بردن یک مکان تشخیص آنزیم محدودکننده دارد. بعلاوه، بعضی آنزیم‌های محدودکننده گران هستند. روش توالی‌یابی (sequencing) روش نهایی و استاندارد طلایی جهت تشخیص جهش می‌باشد که تعیین ژنوتیپ و غربالگری را همزمان فراهم می‌کند. از معایب آن این است که هزینه زیادی دارد و محصولات PCR نیاز به خالص‌سازی دارند (۲۵و۲۶).

روش‌های ذکر شده به غیر از HRM گران و زمان‌بر هستند و خطر آلودگی به همراه دارند، همچنین نیاز به جداسازی نمونه روی یک ژل یا ماتریکس، پردازش اضافی و واکنش‌های آنزیمی یا شیمیایی دارند. هر پردازش، خطر آلودگی را در واکنش‌های آینده افزایش می‌دهد؛ چون محصولات PCR در معرض محیط هستند. اما روش HRM نسبت به سایر روش‌ها سریع و مقرون به صرفه تر هست و خطر آلودگی کمتری دارد؛ چون در یک لوله بسته انجام می‌شود؛ نیاز به ماتریکس و ماده واسرشت کننده ندارد؛ بنابراین می‌تواند نسبت به سایر روش‌ها ارجح‌تر باشد (۲۵). روش HRM برای پیدا کردن واریانت تک بازی توالی مانند پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (۲۷)، تعیین ژنوتیپ پروب بدون بر چسب (Label) (۲۸) و تطابق HLA (Human Leukocyte Antigen) (۲۹) مورد استفاده قرار می‌گیرد. محدودیت اصلی روش HRM این است که ماهیت دقیق جهش به آسانی قابل شناسایی نمی‌باشد، بنابراین در صورت لزوم نیاز دارد که همراه روش توالی‌یابی مورد استفاده قرار گیرد. از دیگر معایب آن محدودیت در طول آمپلیکون می‌باشد، ولی به طور کلی آنالیز HRM چندین مزیت شامل کاهش نیروی انسانی، صرفه جویی در زمان و کاهش ریسک آلودگی نسبت به روش‌های ذکر شده در بالا را دارا می‌باشد (۲۵).

در مطالعات Okano و همکاران و Dworniczak و همکاران آنالیز بیان آلل جهش یافته در سلول‌های کشت داده شده پستانداران، غیاب پروتئین PAH در سلول‌های ترانسفکت شده با این جهش بدمعنی و غیاب فعالیت PAH در سلول‌های ترانسفکت شده با الل جهش یافته را نشان می‌دهد (۳۰, ۳۱). هرچند طبق این مطالعات پروتئینی که این جهش را دارد از لحاظ عملکردی بیان و فعالیت ناچیزی را دارا می‌باشد، اما در مطالعه حاضر هدف از انجام کارهای In Silico آن بود که نشان داده شود که این تغییر نوکلئوتیدی در سطح DNA چه اثراتی را بر پایداری پروتئین، تغییر انرژی آزاد آن، دسترسی آمینواسید وحشی و جهش یافته به حلال (خصوصیات بیوفیزیکی پروتئین) بر جای می‌گذارد. به‌علاوه پیامد این تأثیرات بیوفیزیکی بر بیماری‌زا بودن پروتئین تغییریافته نیز تخمین زده شده است که به خوبی با یافته‌های تجربی همخوانی دارد. در ارتباط با تأثیر عملکردی جهش IVS10-11G>A بر پروتئین PAH نیز نشان داده شده

است که اگرچه محتوای پروتئین PAH کبد در بیماران هموزیگوت، نرمال است؛ ولی هیچ فعالیت کاتالیتیک دارا نمی باشد. این فقدان فعالیت آنزیمی به احتمال زیاد به دلیل تغییرات کانفورماسیون ایجاد شده در حضور سه آمینواسید اضافی (Gln ،Leu ،Gly) بین توالی‌های نرمال کدشده توسط اگزون ۱۰ و اگزون ۱۱ است (۳۲). به استثنای روش توالی‌یابی که روش استاندارد طلایی می‌باشد، بر اساس مطالعات انجام شده در زمینه مزایا و معایب روش های شناسایی جهش ها با تمرکز بر جهش های ژن PAH در بیماری PKU، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که روش HRM با صرف زمان و خطر آلودگی کمتر جهش‌ها را با اختصاصیت و حساسیت حداقل ۹۶٪ شناسایی می‌کند؛ هر چند که در مطالعه حاضر به علت ماهیت جهش های مورد بررسی، این روش توانست با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ جهش‌های IVS10-11G>A و P281L را در ژن PAH شناسایی کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهرکرد جهت حمایت مالی از این تحقیق و همچنین از همکاری و مساعدت آقای فرهاد بنی مهدی تشکر و قدردانی می‌گردد.

Molecular assessment and bioinformatic analysis of two common mutations of phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by HRM

M. Amir (MSc)[1], M. Emadi Baygi (PhD) *[2], S. Vallian (PhD)[3], P. Nikpour (PhD)[4], F. Akhondi (MSc)[1]

1.Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, shahrekord, I.R.Iran
2.Biotechnology Research Center, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan I.R.Iran
3.Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.Iran
4.Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(6); Jun 2017; PP: 42-9
Received: Jan 1st 2017, Revised: feb 22th 2017, Accepted: Apr 30th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Phenylketonuria (PKU) is the most prevalent inborn error of amino acid metabolism in the world and its incidence rate is increasing in Iran. The aim of the present study was to assess the efficiency of HRM technique as a fast and suitable method in identifying common mutations of phenylalanine hydroxylase gene including IVS10-11G>A and P281L in order to improve the early detection of the disease to prevent the occurrence of it.

METHODS: In this case-control study, 20 DNA samples including one sample with IVS10-11G>A mutation , one sample with P281L mutation and 18 control samples were extracted from peripheral blood collected in Medical Genetic Center of Isfahan and were genotyped with HRM technique. To validate the mutations, the mutant samples were genotyped using sequencing. Bioinformatic analyses were used for determining structural and functional effects of P281L mutation on the of PAH protein.

FINDINGS: HRM analysis identified IVS10-11G>A and P281L mutations with a sensitivity and specificity of 100% and the mutant and normal samples differentiated well in normalized and difference plots. Bioinformatic analyses demonstrated instability and pathological effects of PAH protein containing P281L mutation.

CONCLUSION: HRM is a simple and fast technique detecting the two IVS10-11G>A and P281L mutations with 100% sensitivity and specificity.

KEY WORDS: *Phenylketonuria, Sensitivity, Specificity, Genotyping*.

Please cite this article as follows:

Amir M, Emadi Baygi M, Vallian S, Nikpour P, Akhondi F. Molecular assessment and bioinformatic analysis of two common mutations of phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by HRM. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(6):42-9.

* **Corresponding author: M. Emadi Baygi (PhD)**
Address: Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, University of Shahrekord, Rahbar Blvd, Shahrekord, I.R.Iran
Tel: +98 38 32324419
E-mail: emadi-m@sci.sku.ac.ir

References

1.Schuck PF, Malgarin F, Cararo JH, Cardoso F, Streck EL, Ferreira GC. Phenylketonuria pathophysiology: On the role of metabolic alterations. Aging Dis. 2015;6(5):390-9.
2.Jahja R, Spronsen FJ, Sonneville LM, Meere JJ, Bosch AM, Hollak CE, et al. Social-cognitive functioning and social skills in patients with early treated phenylketonuria: a PKU-COBESO study. J Inherit Metab Dis. 2016;39(3):355-62.
3.Richardson SC, Aspbury RA, Fisher MJ. The role of reversible phosphorylation in the hormonal control of phenylalanine hydroxylase in isolated rat proximal kidney tubules. Biochem J. 1993;292(2):419-24.
4.Ozalp I, Coşkun T, Tokatli A, Kalkanoğlu H, Dursun A, Tokol S, et al. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. Turk J Pediatr. 2001;43(2):97-101.
5.Kimura T, Ikeda H, Akaba K, Guldberg P, Güttler F, Maki K, et al. Mutation analysis of phenylketonuria in Yamagata prefecture, Japan. Pediatr Int. 2001;43(1):1-3.
6.Guldberg P, Henriksen KF, Sipilä I, Güttler F, de la Chapelle A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. J Med Genet. 1995;32(12):976-8.
7.Senemar S, Ganjekarimi H, Fathzadeh M, Tarami B, Bazrgar M. Epidemiological and clinical study of Phenylketonuria (PKU) disease in the national screening program of neonates, fars province, Southern Iran. Iran J Pub Health. 2009;38(2):58-64.
8.Li N, Jia H, Liu Z, Tao J, Chen S, Li X, et al. Molecular characterisation of phenylketonuria in a Chinese mainland population using next-generation sequencing. Sci Rep. 2015;5:15769.
9.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;102(2):116-21.
10.Daniele A, Cardillo G, Pennino C, Carbone M, Scognamiglio D, Correra A, et al. Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. Ann Hum Genet. 2007;71(2):185-93.
11.Zare-Karizi S, Hosseini-Mazinani S, Khazaei-Koohpar Z, Seifati S, Shahsavan-Behboodi B, Akbari M, et al. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. Mol Genet Metab. 2011;102(1):29-32.
12.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.
13.Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics. 2007;8(6):597-608.
14.Dobrowolski SF, Ellingson C, Coyne T, Grey J, Martin R, Naylor EW, et al. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene identified in 95 patients with phenylketonuria using novel systems of mutation scanning and specific genotyping based upon thermal melt profiles. Mol Genet Metab. 2007;91(3):218-27.
15.Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor R, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. Clin Chem. 2005;51(10):1770-7.
16.Lin M, Jiao J-W, Zhan X-H, Zhan X-F, Pan M-C, Wang J-L, et al. High resolution melting analysis: A rapid screening and typing tool for common β-thalassemia mutation in Chinese population. PLoS One. 2014;9(8):e102243.
17.Liu Y-P, Wu H-Y, Yang X, Xu H-Q, Chen D, Huang Q, et al. Diagnostic accuracy of high resolution melting analysis for detection of KRAS mutations: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2014;4:7521.
18.Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16(3):1215.
19.Akhoundi F, Parvaneh N, Modjtaba E-B. In silico analysis of deleterious single nucleotide polymorphisms in human BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B gene. Meta Gene. 2016;9:142-50.
20.Hamzehloei T, Hosseini S, Vakili R, Mojarad M. Mutation spectrum of the PAH gene in the PKU patients from Khorasan Razavi province of Iran. Gene. 2012;506(1):230-2.
21.Lüleyap HÜ, Alptekin D, Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H, Demirhindi H, et al. The importance of arginine mutation for the evolutionary structure and function of phenylalanine hydroxylase gene. Mutat Res. 2006;601(1):39-45.
22.Song F, Qu Y-j, Zhang T, Jin Y-w, Wang H, Zheng X-y. Phenylketonuria mutations in northern China. Mol Genet Metab. 2005;86:107-18.

23.Djordjevic M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, et al. Molecular genetics and genotype-based estimation of BH4-responsiveness in Serbian PKU patients: spotlight on phenotypic implications of p. L48S. JIMD Rep. 2013;9:49-58.
24.Noori-Daloii M, Faraji K. High resolution melt analysis (HRM) and its strategic applications especially in molecular genetics. Horizon Med Sci. 2016;22(1):77-88. [In Persian].
25.Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, et al. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. Clin Chem. 1999;45(8):1133-40.
26.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(7):1156-64.
27.Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, Wang L, Wittwer CT. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. Clin Chem. 2004;50(8):1328-35.
28.Zhou L, Vandersteen J, Wang L, Fuller T, Taylor M, Palais B, et al. High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity. Tissue Antigens. 2004;64(2):156-64.
29.Dworniczak B, Grudda K, Stümper J, Bartholomé K, Aulehla-Scholz C, Horst J. Phenylalanine hydroxylase gene: novel missense mutation in exon 7 causing severe phenylketonuria. Genomics. 1991;9(1):193-9.
30.Okano Y, Wang T, Eisensmith RC, Longhi R, Riva E, Giovannini M, et al. Phenylketonuria missense mutations in the Mediterranean. Genomics. 1991;9(1):96-103.
31.Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Kalaydjieva L, Bartholome K, Grudda K, Horst J. Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: the major cause for phenylketonuria in parts of southern Europe. Genomics. 1991;11(2):242-6.