

بررسی مولکولی فاکتور A-۱۳ انعقادی در بیماران با کمبود ارثی فاکتور ۱۳

غلامحسین تمدن^۱، احمد کاظمی^۲، قاسم رستگاری^۳، فریدون علاء^۴، شبنم حجازی^۵

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور ۱۳ انعقادی، آخرین آنزیم آبشار انعقادی است و ژن زیر واحد A روی کروموزم شش قرار گرفته است. کمبود ارثی فاکتور ۱۳، در حدود ۱/۲۰۰۰۰۰۰ نفر جمعیت رخ می‌دهد. این تحقیق با هدف شناسایی جهش‌ها در ژن زیر واحد A بیماران و روش غربالگری مناسب ناقلین انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه کاربردی، پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه، نمونه خون از ۲۱ بیمار مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ و خانواده آن‌ها گرفته شد. ابتدا هر آگزون از ژن تکثیر داده و سپس با روش الکتروفورز ژل حساس بررسی شد. چنانچه هر آگزون بر روی ژل دارای هترو دو بلکس بود، جهت سکانس انتخاب می‌شد. پس از تعیین موتاسیون، غربالگری ناقلین هر خانواده با روش RFLP صورت گرفت.

یافته‌ها

جهش‌های شناسایی شده شامل دوازده بیمار در آگزون ۴ به علت جایگزینی T به جای C، یک بیمار دخول سه تایی G در آگزون ۷، دو بیمار با جهش جایگزینی T به جای C در آگزون ۹، سه بیمار جایگزینی G به جای A در آگزون ۱۰ و سه بیمار به علت جایگزینی G به جای A در آگزون ۱۵ بود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق نشان داد که ناحیه مرکزی آنزیم نسبت به تغییرات بار الکتریکی و دنباله اسیدهای آمینه بسیار حساس می‌باشد، به همین علت جهش‌های مؤثر بر این ناحیه موجب تغییر شدید فعالیت آنزیم شده است. از طرفی حوزه‌های مرتبط با کلسیم این پروتئین، در ایجاد ساختار چهار زنجیره‌ای نیز به تغییرات نوع اسید آمینه به علت جهش در ژن بسیار حساس می‌باشند که می‌تواند در غربالگری ناقلین بسیار مفید باشد.

کلمات کلیدی: فاکتور ۱۳، کمبود فاکتور ۱۳، فاکتورهای انعقادی خون، هموفیلی

تاریخ دریافت: ۱۹/۱۰/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/ ۸/ ۵

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - مربی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان - ایران

۲- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی - دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - ایران - صندوق پستی: ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵

۳- PhD هماتولوژی - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - ایران

۴- فوق تخصص خون و انعکولوژی - درمانگاه جامع کودکان هموفیل ایران - تهران - ایران

۵- کارشناس علوم آزمایشگاهی - درمانگاه جامع کودکان هموفیل ایران - تهران - ایران

مقدمه

فاکتور ۱۳ انعقادی، پروآنزیمی است که در حالت فعال، خاصیت ترانس گلوتامینازی دارد (۱). این فاکتور آخرین واکنش آبشار انعقادی را کاتالیز کرده و لخته فیبرینی فاقد پیوند کووالانسی، به وسیله فعالیت این آنزیم پایدار می‌شود. با این عمل، فیبرین در مقابل هجوم پلاسمین مقاوم می‌گردد (۲).

این فاکتور از دو زیر واحد A و B که ساختار تترامری (A₂B₂) دارد تشکیل شده است. این دو زیر واحد، توسط ژن‌های جدا از یکدیگر کد می‌شوند. ژن زیر واحد A با ۱۵ آگزون بر روی کروموزم ۶ و ژن زیر واحد B با ۱۲ آگزون بر روی کروموزم شماره ۱ قرار دارد (۳).

کمبود فاکتور ۱۳ انعقادی، اختلال خونریزی‌دهنده نادری است که اولین مرتبه در سال ۱۹۶۰ توسط دوکرت گزارش شده است (۱). بیماران مبتلا، دچار علائم میل به خونریزی می‌شوند (۴). این اختلال به میزان تقریبی ۱/۲۰۰۰۰۰۰ نفر جمعیت رخ می‌دهد (۴).

از آن جا که زیر واحد A نقش کاتالیتیکی و B نقش حامل را دارد، قابل انتظار است که بروز بیماری بیشتر به علت جهش در ژن زیر واحد A باشد و در بررسی‌های انجام شده از نظر ژنتیکی، جهش‌های مختلفی که گزارش شده‌اند غالباً به علت جایگزینی باز می‌باشند (۴).

مطالعه‌های کریستالوگرافی، وجود چهار حوزه را در ساختمان زنجیره A (شامل سان‌ویچ بتا، بارل ۱ و ۲ مرکز کاتالیتیکی) نشان داده است (۵). این حوزه‌ها به وسیله پیوندهای هیدروژنی و نمکی با حوزه‌های مشابه در زنجیره A مقابل باند می‌شوند (۵، ۶).

هم چنین مشخص شده اسیدهای آمینه سیستئین ۳۱۴ (در آگزون ۷)، هیستیدین ۳۷۳ و آسپاراژین ۳۹۶ (هر دو در آگزون ۹) به عنوان تریاد کاتالیتیک در تشکیل باند ایزوپپتیدی شرکت می‌کنند (۶). فاکتور ۱۳ انعقادی برای فعال شدن نیاز به تاثیر ترومبین دارد. ترومبین با برش پیوند بین آرژنین ۳۷ و گلیسین ۳۸ در حضور پلیمر فیبرین، آنزیم را فعال می‌نماید. به همین دلیل است که بخش کد شونده آگزون ۱ در پروتئین فعال وجود ندارد و موجب جدایی زنجیره A از B می‌گردد (۶). با عملکرد آنزیم، باند

پپتیدی بین گلوتامین از زنجیره گامای یک فیبرین و لیزین زنجیره گامای فیبرین دیگر ایجاد می‌شود (۷). این واکنش وابسته به یون کلسیم بوده و یک مولکول آمونیاک نیز آزاد می‌شود (۸). اتصالات عرضی ایجاد شده موجب استحکام فیبرین می‌گردد (۸).

ژن فاکتور A-۱۳ بر روی بازوی کوتاه کروموزم ۶ (6P24-P25) قرار دارد و دارای ۱۵ آگزون و بیش از ۱۶۰ کیلوباز طول می‌باشد. پروتئین کد شده توسط این ژن، ۷۳۱ اسید آمینه دارد (۹). هر چند پلی مورفیسم‌های متعددی در این ژن شناخته شده اما مهم‌ترین آن‌ها Val 34 Leu است که با اختلالات ترمبوتیک همراه می‌باشد (۱۰).

بازه طبیعی فعالیت فاکتور ۱۳ انعقادی بین ۵۰ تا ۲۲۰ درصد می‌باشد که طولانی‌ترین نیمه عمر (۱۰-۸ روز) را در بین فاکتورهای انعقادی دارد. چنانچه میزان فاکتور به کمتر از ۱ درصد برسد، علائم بالینی شامل خونریزی از بند ناف، دیر بهبود یافتن زخم‌ها، خونریزی درون جمجمه‌ای و سقط در خانم‌ها و خونریزی در بافت‌ها به صورت هماتوم و خونریزی طولانی به دنبال اعمال جراحی می‌باشد (۱۲)، (۱۱).

بیماران با کمبود این فاکتور، آزمایش‌های انعقادی (PT، PTT، TT) طبیعی داشته اما آزمایش ذوب لخته در اوره ۵ مولار و یا اسیداستیک ۱ درصد غیر طبیعی دارند (۱۳). هر چند دقیق‌ترین روش تعیین جهش، تعیین توالی اسید نوکلئیک می‌باشد اما روش CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) روشی حساس، دقیق و ارزان برای تعیین جهش به خصوص جایگزینی می‌باشد (۱۴).

این مطالعه با هدف شناسایی جهش‌های آگزون ۲ تا ۱۵ ژن فاکتور A-۱۳ در مبتلایان به کمبود این فاکتور که آزمون حلالیت لخته در اسید استیک غیر طبیعی داشتند، در مانگه هموفیلی ایران و بیمارستان علی‌اصغر زاهدان تشکیل پرونده داده بودند و هیچ بررسی ژنتیکی بر روی آن‌ها صورت نگرفته بود، انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه از نوع بنیادی کاربردی بوده و بر روی بیماران

رانر(۳/۰۵ ver) با توالی طبیعی مطابقت داده و موتاسیون ایجاد شده شناسایی شد. هم چنین آنزیم اختصاصی برای جهش یافت شده به منظور تایید و سهولت استفاده به روش RLFP تعیین شد. از روش RLFP به منظور غربالگری و شناسایی ناقلین استفاده شد. سایر نتایج با جهش‌های موجود در بایگانی جهش‌های ثبت شده فاکتور ۱۳ و NCBI مقایسه و در پایگاه NCBI به ثبت رسید.

یافته‌ها

در این تحقیق ۲۱ بیمار که دارای علائم بالینی میل به خونریزی، آزمایش‌های انعقادی طبیعی و آزمون حل شدن لخته غیر طبیعی در اسید استیک بودند و ۲۴ نفر خانواده قابل دسترس که در درمانگاه جامع هموفیلی ایران و بیمارستان علی‌اصغر زاهدان ثبت نام شده بودند، به روش نمونه‌گیری در دسترس، بدون در نظر گرفتن سن و جنس انتخاب شدند.

بعد از انجام PCR هر آگزون و بررسی به روش CSGE و تعیین توالی، به تفکیک مشخص شد ۱۲ بیمار دارای جهش مشترک در آگزون ۴ به شکل تغییر توالی TGG کدکننده تریپتوفان به CGG کدکننده آرژنین، بودند (Try187Arg)(شکل‌های ۳-۱). از این تعداد ۱۱ بیمار اهل زاهدان بودند. پس از مقایسه توالی طبیعی با نوع جهش یافته، مشخص شد که آنزیم Styl-1 قادر است که قطعه تکثیر یافته ۳۵۵ بازی را در افراد سالم در نقطه ۳۰۰ برش داده و آن را به دو قسمت تبدیل کند اما بیماران هیچ جایگاه برشی برای این آنزیم نداشتند(شکل ۴).

به دنبال تعیین آنزیم، نمونه‌های خانواده بیماران به روش ریال RFLP جهت تعیین ناقل بودن مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یک بیمار با جهش آگزون ۷ از نوع دخول سه باز G که موجب اضافه شدن اسید آمینه گلايسين در موقعیت ۲۸۶ شده بود، مشخص گردید(شکل‌های ۵ و ۶).

در مقایسه با DNA سالم که فاقد نقطه برش بود، بخش تکثیر یافته دارای ۲۹۴ باز بود که در DNA موتانت به وسیله آنزیم Acid-1 برش خورده و به دو قطعه ۱۲۲ و ۱۷۲ نوکلئوتیدی تبدیل شده بود. به دنبال غربالگری جهش

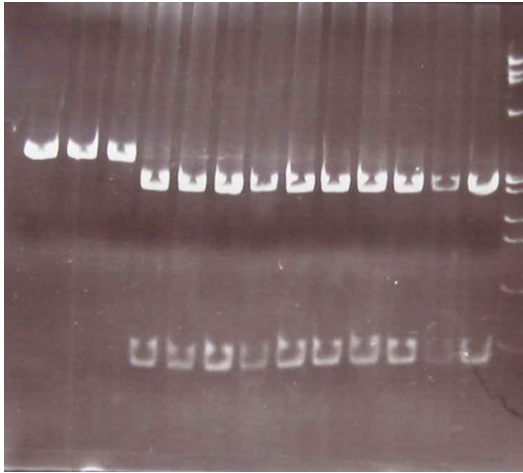
با علائم بالینی میل به خونریزی، خونریزی از بند ناف در هنگام تولد، آزمایش‌های انعقادی (BT، TT، PTT، PT) طبیعی و آزمایش حل شدن لخته غیر طبیعی که در بایگانی درمانگاه هموفیلی ایران و بیمارستان علی‌اصغر زاهدان ثبت شده بودند، انجام شد. ابتدا رضایت‌نامه انجمن هموفیلی ایران تکمیل و شجره‌نامه مربوط به هر خانواده در پرونده بیماران رسم شد(خانواده‌ها نسبت فامیلی با یکدیگر نداشتند).

سپس به روش نمونه‌گیری در دسترس، نمونه خون از ۲۱ بیمار و ۲۴ نفر از خانواده بیماران که در مجموع ۴۵ نفر بودند، در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. به روش هضم لکوسیت‌ها با کمک آب مقطر سرد، پروتئیناز K، دترجنت‌های یونی و اتانل، DNA استخراج شد(۱۵). جهت ارزیابی کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. توالی ژن فاکتور ۱۳ از بانک ژن استخراج و آغازگرهای هر آگزون از بایگانی فاکتور ۱۳ انتخاب و به صورت تجاری خریداری شد(۱۶). هر آگزون طبق برنامه PCR (حرارت ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه در ۳۰ سیکل) تکثیر داده شد.

پس از تکثیر محصولات PCR بر روی ژل اکرلامید ۸ درصد و با ولتاژ و زمان مناسب بر حسب اندازه قطعه، الکتروفورز انجام شد و بعد از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید، مورد ارزیابی قرار گرفت.

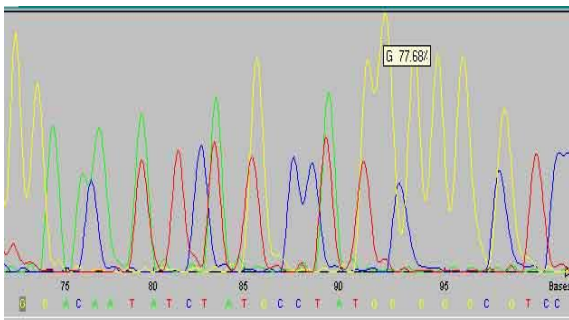
پس از PCR، هر آگزون بر اساس روش CSGE غربالگری گردید. محصولات PCR در دمای ۹۸ °C به مدت ۵ دقیقه جهت دناتوره کردن و ۶۵ °C به مدت ۳۰ دقیقه برای آنیلینگ مجدد قرار داده شد. پس از آن با الکتروفورز بر روی ژل CSGE (اتیلن گلیکول ۱۰ درصد، فرمامید ۱۵ درصد، اکرلامید BAP ۱۰ درصد و ۰/۵ درصد TTE20x)، آگزون‌هایی که دارای هترو دو بلکس بودند با احتمال وجود موتاسیون انتخاب و محصول PCR همان آگزون با استفاده از دستگاه آلف اکپرس(آمرشیم فارماسیا - بیوتک) تعیین توالی شده و جهش بیماران شناسایی شد. پس از مشخص شدن جهش، همولوژی توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار ژن

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳



شکل ۱: ژل CSGE اگزون ۴ ژن فاکتور A-۱۳، حضور هترو دوپلکس در چاهک‌های شماره ۵ تا ۸

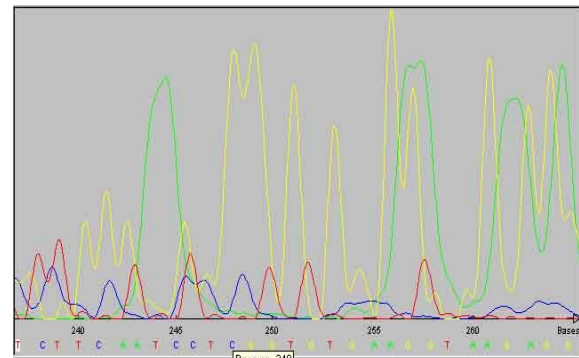
شکل ۴: چاهک‌های ۲-۴ مربوط به DNA بیماران که تحت اثر آنزیم Styl-1 قرار گرفته و هیچ گونه برشی در آنها ایجاد نشده است. چاهک‌های ۴ به بعد مربوط به DNA نرمال بوده که تحت اثر آنزیم برش خورده و دو باند ایجاد گردیده است. چاهک اول مارکر می‌باشد.



شکل ۵: سکانس اگزون ۷ ژن فاکتور A-۱۳ بیمار، insertion ۳ باز G در مقایسه با سکانس فرد سالم

GTGAATGCCAAAGATGACGAAGGTGTCCT
CGTTGGATCCTGGGACAATATCTATGCCT
ATGGCGTCCCCCATCGGCCTGGACTGGA
AGCGTTGACATTCTATTGGAATACGGGAG
CTCTGAGAATCCAGTCCGGTATGGCCAAT
GCTGGGTTTTTGCTGGTGTCTTTAACACA
T

شکل ۶: سکانس طبیعی اگزون ۷ ژن فاکتور A ۱۳



شکل ۲: سکانس اگزون ۴ ژن فاکتور A-۱۳، جایگزینی C به جای T در مقایسه با سکانس فرد سالم

CGCTACCCA CAG GAGAAC A AG
GGA ACC TAC ATCCCA GTG CC
TATAGTCTCAGAGTTACAA AGT
GGAAAGTGGGGGGCCAAGATT
GTCATGAGAGAGGACAGGTCT
GTGCGGCTGTCCATCCAGTCTT
CCCCCAAATGTTATTGTGGGGA
AATTCCGCATGTATGTTGCTGT
CTGGACTCCCTATGGCGTACTT
CGAACCAAGTCGAAACCAGAA
ACAGACACGTACATTCTCTTCA
ATCCTTGGTGTGAAG

شکل ۳: سکانس طبیعی رشته forward اگزون ۴ ژن فاکتور A-۱۳، باز مشخص شده T در انتهای اگزون ۴، محل موتاسیون است.

جدول ۱: جهش‌های یافت شده در زنجیره A فاکتور ۱۳، ۲۱ خانواده با کمبود فاکتور ۱۳

تعداد بیماران	اگزون	ناحیه	باز تغییر یافته	اسید آمینه تغییر یافته
۱۲	۴	مرکزی	TGG → CGG	Try 187 Arg
۱	۷	مرکزی	GGG insertion	Gly 286
۲	۹	مرکزی	ATG → AAG	Met 380 Lys
۳	۱۰	مرکزی	CGG → CAG	Arg 408 Gln
۳	۱۵	بارل ۲	GCC → GTC	Arg 703 Gln

جدول ۲: جهش‌های یافت شده در زنجیره A فاکتور ۱۳، ۲۴ نفر اعضای خانواده بیماران با کمبود فاکتور ۱۳

تعداد افراد خانواده بیماران شرکت کننده	اگزون	ناحیه	باز تغییر یافته	اسید آمینه تغییر یافته	تعداد افراد ناقل
۱۵	۴	مرکزی	TGG → CGG	Try 187 Arg	۱۲
۳	۹	مرکزی	ATG → AAG	Met 380 Lys	۲
۴	۱۰	مرکزی	CGG → CAG	Arg 408 Gln	۲
۱	۱۵	بارل ۲	GCC → GTC	Arg 703 Gln	۱

بحث

در این مطالعه، ۲۱ بیمار دارای موتاسیون هموزیگوت و از ۲۴ نفر خانواده بیماران، ۱۵ نفر دارای جهش‌های هتروزیگوت و یا به عبارتی ناقل بودند. از ۱۲ بیماری که جهش اگزون ۴ به صورت تغییر توالی TGG به CGG را که موجب تغییر رمز تریپتوفان به جای آرژنین می‌شود داشتند، ۱۱ نفر از خانواده‌های ساکن استان سیستان و بلوچستان بودند. با توجه به بررسی عشقی و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی ۱۶ خانواده از بیماران کمبود فاکتور ۱۳ این استان که عیناً همین جهش را گزارش نمودند، می‌توان انتظار داشت که این تغییر ژنتیکی به صورت یک جهش مشترک باشد، هر چند نیاز به مطالعه بیشتری در بین بیماران این منطقه می‌باشد (۱۷).

از طرفی با توجه به ازدواج‌های قومی و فامیلی، انتظار می‌رود که جمعیت افراد مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ در این استان بیشتر از موارد گزارش شده در جمعیت عمومی باشد و با توجه به علایم بالینی گزارش شده توسط عشقی و همکاران در سال ۲۰۰۴، غربالگری بالینی مراجعین به مراکز درمانی منطقه زاهدان قابل توجه است (۱۸). از آن

با روش CSGE برای تعداد ۲ بیمار در اگزون ۹ و تعیین توالی، مشخص شد که توالی ATG به AAG تغییر یافته که باعث تغییر Lys ۳۸۰ Met شده است (جدول ۱).

این اگزون ۲۴۱ باز طول داشته و آنزیم Mob II، DNA موتانت را به دو قطعه ۱۳۵ و ۱۰۶ بازی تبدیل و بر روی DNA سالم فاقد تاثیر می‌باشد. در اگزون ۱۰ مشخص گردید که ۳ بیمار دارای سکانس CAG در مقایسه با سکانس طبیعی CGG بودند که منجر به Arg 408 Gln شده است. با استفاده از نرم‌افزار ژن رانر، هیچ آنزیمی برای به کارگیری RFLP این اگزون یافت نشد. ۳ بیمار در اگزون ۱۵ دارای سکانس GCT بودند که در مقایسه با سکانس طبیعی GCC با توجه به جدول ۱، موجب جایگزینی گلوتامین به جای آرژنین در موقعیت ۷۰۳ می‌شود. آنزیم ALWN 1، اگزون ۱۵ را در وضعیت موتانت برش داده و این اگزون ۲۵۰ بازی را به دو قطعه ۱۰۵ و ۱۴۵ بازی تبدیل می‌نماید.

مطابق روش RFLP به منظور تعیین ناقلین، تمامی خانواده بیماران شرکت کننده در این طرح با این روش از جهت ناقل بودن مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۲).

الکتروستاتیکی، موجب کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا می‌شود و دنباله لیزین و گلوتامین از طریق ایجاد ممانعت فضایی مانع از به فرم فعال در آمدن آنزیم می‌گردد (۲۱). جهش شناخته شده در آگزون ۱۵ بخش کد کننده در ناحیه بارل بوده که در تمایل و اتصال آنزیم به کلسیم و پیچ خوردگی آنزیم نقش دارد و حضور این ناحیه همراه با کلسیم برای قرارگیری وضعیت پایدار فعال برای فاکتور ۱۳ ضروری است (۲۲). احتمال داده می‌شود جایگزینی اسید آمینه آرژنین در موقعیت ۷۰۳ به وسیله گلوتامین، باعث کاهش تمایل آنزیم در اتصال به کلسیم و یا تغییر در پیچ خوردگی طبیعی آن و موجب ناپایداری و تجزیه زودرس آن گردیده باشد (۲۳).

نتیجه‌گیری

بررسی مولکولی ساختمان فاکتور A-۱۳ انعقادی و آگزون‌های کد کننده در وضعیت طبیعی و بیماری، نقش هر حوزه پروتئینی را در ساختار و عملکرد مشخص می‌نماید. به شکلی که تغییر یک باز به صورت هموزیگوت، منجر به بروز علائم بالینی می‌گردد. از طرفی با توجه به ازدواج‌های فامیلی و قومی در کشور، افزایش بروز جهش‌های ژنتیکی به ویژه اختلالات خونریزی‌دهنده را در پی خواهد داشت. لذا مشاوره ژنتیک قبل از ازدواج و بررسی مولکولی در خانواده‌هایی که علائم بالینی این گونه مشکلات را دارند در پیشگیری، شناسایی موارد هموزیگوت و هتروزیگوت و کنترل عوارض بیماری‌ها ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و کارکنان گروه هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی، تمامی بیماران و خانواده‌هایی که در این تحقیق مشارکت نموده و هم چنین عزیزان شاغل در درمانگاه جامع کودکان هموفیل ایران به ویژه مدیریت و همکاران آزمایشگاه ژنتیک که بی‌حمایت و راهنمایی آن‌ها این بررسی ممکن نبود، نهایت سپاسگزاری و تشکر را دارند.

جایی که آنزیم styl-1 قادر است قطعه تکثیر یافته ۳۵۵ بازی آگزون ۴ را در افراد سالم در نقطه ۳۰۰ برش دهد و آن را به دو بخش تقسیم کند و حال آن که بر روی DNA افراد موتانت فاقد اثر می‌باشد، لذا در این منطقه می‌توان به شیوه ساده RLFP به همراه مشاوره ژنتیکی قبل از ازدواج، ناقلین را غربالگری نمود.

بیماران جهت پیشگیری از خونریزی و بالا نگه داشتن سطح فاکتور ۱۳ نیاز به تزریق فاکتور ۱۳ تغلیظ شده دارند لذا با توجه به تعداد افراد ثبت نام شده در بخش هموفیلی بیمارستان علی اصغر زاهدان، لزوم تهیه فاکتور ۱۳ تغلیظ شده ضروری به نظر می‌رسد (۱۹). جهش شناسایی شده در آگزون ۴ در بخش بتا ساندویچ و ابتدای ناحیه کاتالیتیکی می‌باشد که در اتصالات هیدروژنی و تشکیل پل‌های نمکی زنجیره A نقش دارد و هرگونه تغییر بار الکتریکی در این ناحیه موجب از هم گسستن دو زنجیره A می‌شود (۱۷).

آگزون ۷ و ۹ در کد کردن بخش ناحیه کاتالیتیکی شرکت دارند، مشخص شده که اسیدهای آمینه سیستئین ۳۱۴ و هیستیدین ۳۷۳ در آگزون ۷ و آسپاراژین ۳۹۶ در آگزون ۹ قرار دارند که به عنوان تریاد کاتالیتیکی در تشکیل باند ایزوپپتیدی رشته‌های فیبرین شرکت می‌کنند (۶). هر گونه تغییر بار الکتریکی و یا دنباله زنجیره‌ای اسیدهای آمینه به دنبال جابه‌جایی اسیدهای آمینه در این نواحی، به شدت فعالیت آنزیم را متاثر می‌سازد.

در این مطالعه، جهش‌های شناسایی شده با استفاده از مدل‌سازی پروتئین به کمک نرم‌افزار Ras Mol (version: ۲/۶) در وضعیت طبیعی و موتانت مورد مطالعه قرار گرفتند. مشاهده شد که قرارگیری یک گلایسین اضافی در آگزون ۷ به نظر می‌رسد که موقعیت سیستئین ۳۱۴ را در بخش کاتالیتیکی آنزیم جابه‌جا کرده و اثر فعالیت آن را به شدت کاهش دهد (۲۰).

جهش‌های یافت شده در آگزون‌های ۹ و ۱۰ که موجب جایگزینی اسید آمینه لیزین به جای متیونین در موقعیت ۳۸۰ و گلوتامین به جای آرژنین در موقعیت ۴۰۸ آگزون ۱۰ شده بود، احتمال داده می‌شود که باعث تاثیر بر روی تریاد کاتالیتیکی شده و از طرفی با تغییر بالانس

References :

- 1- Anwar R, Miloszewski KJ. Factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 1999; 107(3): 468-84.
- 2- Ichinose A, Asahina T, Kobayashi T. Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and perinatal management. *Curr Drug Targets* 2005; 6(5): 541-9.
- 3- Muszbek L, Yee VC, Heressy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999; 94: 271-305.
- 4- Anwar R, Minford A, Gallivans L, Trinh CH, Markham AF. Delayed umbilical bleeding--a presenting feature for factor XIII deficiency: clinical features, genetics, and management. *Pediatrics* 2002; 109(2): E32.
- 5- Lorand L, Ong HH, Lipinski B, Rule NG, Downey J, Jacobsen A. Lysine as amine donor in fibrin cross-linking. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 25: 629-37.
- 6- Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphism. *Blood* 2002; 100(3): 743-54.
- 7- weiss MS, Metzner HJ, Hilgenfeld R. Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII Function. *FEBS Lett* 1998; 423(3): 291-6.
- 8- chung SI, Lewis MS, Folk JE. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. *J Biol Chem* 1974; 249(3): 940-50.
- 9- Board PG, Webb GC, McKee J, Ichinose A. Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6P24----P25. *Cytogenet cell Genet* 1988; 48(1): 25-7.
- 10- Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma tranlutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(16): 5829-33.
- 11- Nugent DJ. Prophylaxis in rare coagulation disorders--factor XIII deficiency. *Thromb Res* 2006; 118 Suppl 1: S23-8.
- 12- Lak M, Peyvandi F, Alisharifian A, Karimi K, Mannucci PM. Pattern of symptoms in 93 Iranian patients with severe factor XIII deficiency. *J Thromb Hemost* 2003; 1(8): 1852-3.
- 13- Kitchen S, McCraw A. Laboratory manual- Diagnostic of hemophilia and other bleeding disorders. 1st ed. New York: Churchill Livingstone; 2005: 68-73.
- 14- Körkkö J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Ala-Kokko L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(4): 1681-5.
- 15- Williams IJ, Goodeve AC. PCR mutation detection protocols. *Methods in molecular biology* 2002; 187: 137-50.
- 16- Vysokovsky A, Saxena R, Landau M, Zirelin A, Eskaraev R, Rosenberg N. Seven novel mutations in the factor XIII A-subunit gene causing hereditary factor XIII deficiency in 10 unrelated families. *J Thromb Haemost* 2004; 2(10): 1790-7.
- 17- Chi H, Walid SH ElSayed, E shghi P, Miri-Moghaddam E, Zadeh -vakili A, Markham F, Anwar R. Molecular analysis of sixteen unrelated factor XIII deficient families from south-east of Iran. *Br J Haematol* 2008 140(5): 581-4.
- 18- Trinh CH, Sh Elsayed W, Eshghi P, Miri-Moghaddam E, Zadeh-Vakili A, Markham AF, *et al.* Molecular analysis of sixteen unrelated factor XIII deficient families from south-east of Iran. *Br J Haematol* 2008; 140(5): 581-4.
- 19- Eshghi P, Mahjour SB, Naderi M, Dehbozorgian J, Karimi M. Long-term prophylaxis in patients with factor XIII deficiency complicated by intracranial haemorrhage in Iran. *Haemophilia* 2010; 16(2): 383-5.
- 20- Mikkola H, Yee VC, Syrjälä M, Seitz R, Egbring R, Petrini P, *et al.* Four novel mutations in deficiency of coagulation factor XIII: consequences to expression and structure of the A-subunit. *Blood* 1996; 87(1): 141-51.
- 21- Mikkola H, Syrjälä M, Rasi V, Vahtera E, Hämäläinen E, Peltonen L, *et al.* Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 1994 ; 84(2): 517-25.
- 22- Fox BA, Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, *et al.* Identification of the calcium binding site and a novel ytterbium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography. *J Biol Chem* 1999; 274(8): 4917-23.
- 23- Takahashi N, Tsukamoto H, Umeyama H, Castaman G, Rodeghiero F, Ichinose A. Molecular mechanisms of type II factor XIII deficiency: novel Gly562-Arg mutation and C-terminal truncation of the A subunit cause factor XIII deficiency as characterized in a mammalian expression system. *Blood* 1998; 91(8): 2830-8.

Original Article

Molecular study of coagulation factor XIII-A among patients with inherited factor XIII-A deficiency

Tamaddon GH.¹, Kazemi A.², Rastgari GH.², Ala F.³, Hejazi SH.³

¹Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

²Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Center of Pediatric Hemophilia, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Factor XIII is the last enzyme in the clotting cascade. The gene of A chain is located on chromosome 6. Deficiency of factor XIII in autosomal recessive conditions occurs at a frequency of 1 in 2 million general population. The aim of this study was to detect the mutations of subunit A in both patients and carriers.

Materials and Methods

In this study we have investigated the molecular basis of inherited FXIII deficiency among patients from 21 unrelated Iranian families. Mutation were detected by amplifying each exon. Those exons exhibiting the presence of hetero duplex formation sensitive gel electrophoresis, were selected for direct sequencing. After sequencing, detected mutation was carried out by restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Results

All patients having entered the study had mutations. Twelve patients had homologues substitution of TGG→CGG in exon 4, 1 insertion mutation occurring in exon 7 triple G, 2 patients demonstrated mutation exon 9 ATG→ AAG, 3 patients had substitution of CGG→ CAG in exon 10, and 3 patients showed a homologue substitution mutation in exon 15 GCC→ GTC.

Conclusions

Our findings suggest that the activity of enzyme is highly dependent on the core domain. Changes in charge, amino acid tail and conformation lead to decreased enzyme activity. Also tetrameric structure is calcium related. It seems that changes of amino acid sequence convert enzyme stability.

Key words: Factor XIII , Factor XIII Deficiency, Blood Coagulation Factors, Hemophilia
Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 8(4):298-305

Received: 17 Jan 2011

Accepted: 27 Oct 2011

Correspondence: Kazemi A., PhD of Hematology. Associate Professor of Hematology Department, Tehran University of Medical Sciences.
P.O.Box: 14155-6183, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88622576; Fax : (+9821) 88054355
E-mail: a-kazemi@tums.ac.ir