

## تعیین فراوانی پلی مورفیسم‌های ژن فوکوزیل ترانسفراز ۳ در اهداکنندگان ایرانی

مهشید ناصری‌راد<sup>۱</sup>، احمد مردانی<sup>۲</sup>، امیر علی نقی<sup>۳</sup>، مجید شهابی<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

ژن *FUT3*، بیان آنتی‌ژن‌های گروه خونی لوئیس از جمله  $Le^a$  و  $Le^b$  را تنظیم می‌کند. افرادی که آنتی‌ژن‌های گروه خونی لوئیس را نمی‌سازند، هاپلوتایپ‌هایی با پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر فعال‌کننده آنزیم دارند که فراوانی آن‌ها در بین نژادهای مختلف متفاوت است. در مطالعه حاضر، فراوانی این پلی مورفیسم‌ها در اهداکنندگان ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی- توصیفی، ۱۰۰ نفر از اهداکنندگان مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون تهران در سال ۱۳۹۶ مورد بررسی قرار گرفتند. از PCR و DNA sequencing برای تعیین پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن لوئیس استفاده شد. هاپلوتایپ‌ها نیز توسط نرم افزار SNP Analyzer مشخص شدند.

#### یافته‌ها

در مجموع ۱۵ پلی مورفیسم شناسایی شد که از این تعداد ۱۰ مورد مرتبط با موتاسیون‌های missense بودند. فراوانی مهم‌ترین پلی مورفیسم‌های شناسایی شده عبارتند از:  $59T>G$  ۲۰٪،  $314C>T$  ۳۷٪،  $202T>C$  ۳۹٪،  $47G>C$  ۸٪ و  $508G>A$  ۹٪. هم چنین ۱۳ هاپلوتایپ نیز شناسایی شد که فراوانی مهم‌ترین هاپلوتایپ‌ها عبارتند از:  $Le$  ۶۶٪،  $Ie^{202,314}$  ۱۷٪،  $Ie^{47,202,314}$  ۴٪،  $Ie^{59}$  ۴٪ و  $Ie^{59,508}$  ۳٪.

#### نتیجه‌گیری

بر اساس این پژوهش، پلی مورفیسم‌های  $202T>C$ ،  $59T>G$  و  $508G>A$  می‌توانند به عنوان SNP های اصلی برای شناسایی آلل‌های لوئیس منفی در تعیین ژنوتیپ گروه‌های خونی لوئیس و مطالعه‌های مرتبط با بیماری‌ها مفید واقع شوند.

**کلمات کلیدی:** پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی، هاپلوتایپ‌ها، آلل‌ها

تاریخ دریافت: ۹۸/۷/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD انگل‌شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- دکترای علوم آزمایشگاهی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD فرآورده‌های بیولوژیک - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

**مقدمه**

تاکنون ۳۶ سیستم گروه خونی که بیش از ۳۰۰ آنتی ژن را در خود جای داده‌اند، روی سطح گلبول‌های قرمز شناسایی شده است (۱، ۲). بعضی از این آنتی ژن‌ها نقش‌های بیولوژیک داشته و بعضی در ارتباط با بیماری‌ها هستند (۳). در این میان سیستم گروه خونی - بافتی لوئیس از دو آنتی ژن عمده  $Le^a$  و  $Le^b$  تشکیل شده که شاخص‌های آن‌ها الیگوساکاریدهایی هستند که در اتصال با گلیکوپروتئین‌ها یا گلیکولیپیدها قرار دارند (۷-۴). آنتی ژن‌های این سیستم نخستین بار روی گلبول‌های قرمز (مورانت - سال ۱۹۴۶) و بعدها در پلاسما، بزاق و دیگر ترشحات یافت شدند (۸، ۹). در واقع، برخلاف سایر گروه‌های خونی، ساخت آنتی ژن‌های لوئیس در بافت‌های اریتروئیدی رخ نمی‌دهد، بلکه این آنتی ژن‌ها به صورت ثانویه توسط غشای اریتروسیت‌ها جذب می‌گردند (۱۰). آنتی ژن‌های این گروه خونی از نظر بیوشیمیایی با آنتی ژن‌های سیستم ABH در ارتباط بوده و از همان پیش‌سازها منشا گرفته‌اند (۵). بیان آنتی ژن‌های لوئیس به دو فوکوزیل ترانسفراز مختلف که محصولات دو جایگاه ژنی مجزا ( $FUT2$  و  $FUT3$ ) روی کروموزوم ۱۹ هستند، نیاز دارد (۱۰). ژن  $FUT2$ ، آنزیم آلفا ۲ فوکوزیل ترانسفراز و ژن  $FUT3$ ، آنزیم آلفا ۳ و ۴ فوکوزیل ترانسفراز را کد می‌کند. این آنزیم‌ها در روده کوچک، کبد، کلیه و پانکراس فعال بوده و آنتی ژن‌های گلیکولیپیدی  $Le^a$  و  $Le^b$  را با اضافه کردن قند فوکوز به پیش‌سازهای اولیگوساکاریدی، می‌سازند.  $Le^a$  و  $Le^b$  مستقیماً توسط آنزیم  $FUT3$  ساخته می‌شوند اما برای ساخت  $Le^b$ ، نیاز است که ابتدا آنزیم  $FUT2$  پیش‌ساز H تیپ ۱ را ساخته باشد (۱۱). افراد لوئیس منفی آنتی ژن‌های لوئیس را نمی‌سازند و در نتیجه گلبول‌های قرمز این افراد با فنوتیپ  $Le(a-b-)$  مشخص می‌شوند (۴). فنوتیپ  $Le(a-b-)$  در نتیجه حضور آلل‌های مختلف ژن  $le$  که ترانسفرازهای فاقد عملکرد کد می‌کنند، به وجود می‌آید. در این حالت صرف نظر از این که فرد سکر تور باشد یا نباشد، آنتی ژن‌های  $Le^a$  و  $Le^b$  بیان نمی‌شوند. واریانت‌های خاموش ژن  $Lewis(le)$  یک سری پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) را در خود جای

داده‌اند که بسیاری از آن‌ها باعث غیرفعال شدن آنزیم می‌شوند. بیش از ۳۷ آلل نول FUT3 گزارش شده است که عمدتاً دارای حداقل دو موتاسیون هستند. بسیاری از آلل‌ها توزیع جغرافیایی و نژادی خاصی را نشان می‌دهند. شایع‌ترین واریانت هاپلوتایپی مربوط به  $le^{59/508}$  است که در آسیای شرقی (۲۴ درصد) و آفریقایی‌ها (۱۹ درصد) شناسایی شده است. در حالی که  $le^{202/314}$  (۱۷ درصد) و  $le^{59/1067}$  (۴ درصد) عمدتاً در جمعیت‌های اروپایی دیده می‌شود (۵). شیوع بالاتر آسم برونشیا و دیابت ملیتوس غیر وابسته به انسولین در افرادی با گروه خونی  $Le(a-b-)$  مطرح شده است. از طرفی این فنوتیپ با شیوع بالاتر بیماری‌های قلبی در ارتباط است. تا آن جا که مطالعه‌ها نشان می‌دهند، چهار موتاسیون  $202T>C$ ،  $314C>T$ ،  $508G>A$  و  $1067T>A$  به طور مشخص با افزایش خطر بیماری‌های قلبی ارتباط دارند (۱۲). با توجه به ارتباط ژن لوئیس با برخی حالات پاتولوژیک و همین‌طور نقشی که در مطالعه‌های جمعیت‌شناسی دارد، برای اولین بار در ایران تعیین پلی مورفیسم‌های ژن لوئیس با استفاده از روش‌های مولکولی PCR و DNA sequencing صورت گرفت. هدف از این مطالعه، شناسایی پلی مورفیسم‌های ژن لوئیس، واریانت‌های هاپلوتایپی و تعیین فراوانی آن‌ها در جمعیت ایرانی و مقایسه آن با سایر جمعیت‌ها بود.

**مواد و روش‌ها**

این مطالعه از نوع مقطعی - توصیفی بود و از روش نمونه‌گیری غیر احتمالی آسان استفاده شد. برای بیان نتایج از روش‌های آماری توصیفی استفاده گردید.

**اهدآکنندگان:**

پنج میلی لیتر خون EDTA دار از ۱۰۰ اهدآکننده مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون تهران در سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. از تمام شرکت‌کنندگان در این پژوهش رضایت‌نامه کتبی اخذ شد.

**روش مولکولی:**

استخراج DNA : DNA ژنومی از خون کامل

نمونه از جمله SNP های هر نمونه و وضعیت توارث آن (هموزیگوت و یا هتروزیگوت بودن) در فایل اکسل ثبت گردید. سپس SNP های یافت شده در نمونه‌ها با SNP های از قبل شناسایی شده‌ی ژن *FUT3* که در پایگاه داده NCBI موجود می‌باشد، مقایسه شد تا در صورت وجود SNP جدید، اقدامات بعدی انجام گیرد. از آن جا که در بین SNP های موجود در نمونه‌ها مورد جدیدی یافت نشد، از نرم‌افزار SNPAnalyzer 2.0 برای بررسی هاپلوتایپ‌ها و شیوع هاپلوتایپی استفاده گردید.

#### یافته‌ها

نتایج تعیین توالی کلیه نمونه‌ها با استفاده از این دو نرم‌افزار به دقت مورد بررسی قرار گرفت. در مورد هر نمونه وضعیت حضور یا عدم حضور SNP در توالی ژنی و همین طور هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن آن ثبت گردید.

جدول ۱: پلی مورفیسم‌های شناسایی شده و فراوانی آن‌ها در نمونه‌های اهداکنندگان

SNPs	تغییر عملکردی	فراوانی
202T>C	Missense	٪۳۹
314C>T	Missense	٪۳۷
59T>G	Missense	٪۲۰
508G>A	Missense	٪۹
47G>C	Missense	٪۸
858A>G	Synonymous	٪۴
290G>T	Missense	٪۱
522G>A	Synonymous	٪۱
321C>T	Synonymous	٪۱
258C>T	Synonymous	٪۱
374C>T	Missense	٪۱
272G>A	Missense	٪۱
974C>T	Missense	٪۱
1067T>A	Missense	٪۲
612A>G	Synonymous	٪۱

اهداکنندگان با استفاده از کیت ستونی استخراج شد(کره)، GeneAll® Exgene™ Blood SV min. به منظور ارزیابی کیفیت DNA و آگاهی از میزان خلوص آن، از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

#### روش PCR:

توالی کد کننده آنزیم *FUT3*، بخشی از اگزون ۳ این ژن می‌باشد که از ۱۰۸۶ جفت باز تشکیل شده است (۴). تکثیر بخش کد کننده آنزیم *FUT3* با استفاده از آغازگر پیشرو [5'- AAT GAC CCT CAC TCC TCT CTC C-3'] و آغازگر پیرو [5'-CCCAGGCAGATGAGGTTCCC-3'] صورت گرفت. برای انجام این روش از غلظت ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA، آغازگرهای مذکور، Master Mix PCR 2x (یکتا تجهیز آزما- ایران) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر استفاده شد. به جهت حصول به محصول اختصاصی، واکنش‌های PCR به صورت Touchdown و به شرح زیر انجام شد: یک چرخه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، ۱۰ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، در ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، ۱۲ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، در ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) و ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصول حاصل از تکثیر PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ مورد بررسی قرار گرفت.

#### تعیین توالی:

محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران (ژن فن‌آوران، تهران، ایران) ارسال گردید. سپس توالی‌های ارسال شده از سوی این شرکت با نرم‌افزارهای Chromas 2.6.6 و DNA Baser 5.15.0 مورد بررسی قرار گرفتند.

#### بررسی هاپلوتایپی:

پس از بررسی توالی نمونه‌ها، اطلاعات مرتبط با هر

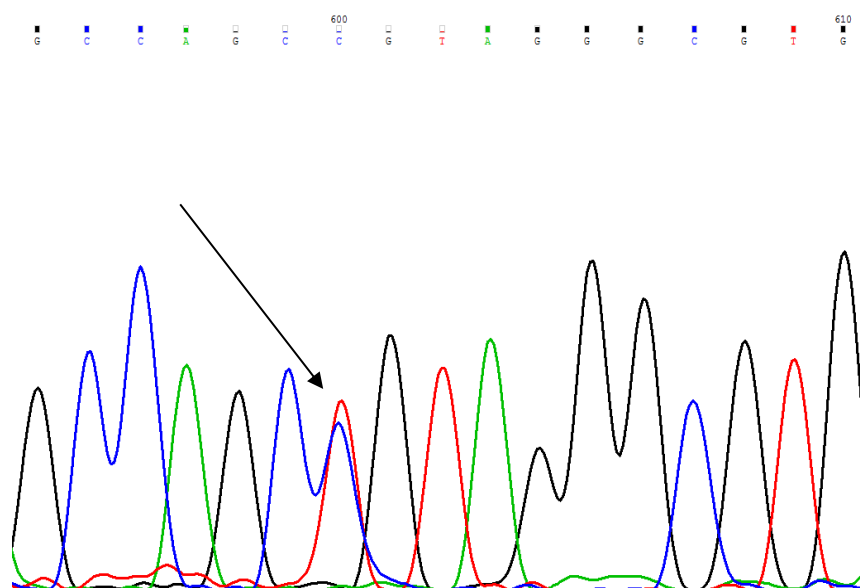
جدول ۲: هاپلوتایپ های شناسایی شده توسط نرم افزار SNP Analyzer

فرکانس	سکانس	آلل	هاپلوتایپ
۰/۶۶۳	GTTCGGCCGACT	Le(wild type)	19-1-h1
۰/۱۷۶	GTCCGGTCGACT	le <sup>202,314</sup>	19-1-h2
۰/۰۲۳	CTCCGGTCGACT	le <sup>47,202,314</sup>	19-1-h3
۰/۰۴۱	GGTCGGCCGACT	le <sup>59</sup>	19-1-h4
۰/۰۳۵	GGTCGGCCAAC	le <sup>59,508</sup>	19-1-h5
۰/۰۰۷	GGTCGGCCAGCT	le <sup>59,508,858</sup>	19-1-h6
۰/۰۰۵	GTCCGGTCGGCT	le <sup>202,314,858</sup>	19-1-h7
۰/۰۰۵	GGCCGGCCGACT	le <sup>59,202</sup>	19-1-h8
۰/۰۰۵	GTTCGTCCGACT	le <sup>290</sup>	19-1-h9
۰/۰۰۵	GGTTGGCCGACA	le <sup>59,258,1067</sup>	19-1-h10
۰/۰۰۵	GGTCAGCCGATT	le <sup>59,272,974</sup>	19-1-h11
۰/۰۰۵	GTCCGGTTGACT	le <sup>202,314,374</sup>	19-1-h12
۰/۰۰۴	GGCCGGCCGACA	le <sup>59,202,1067</sup>	19-1-h13

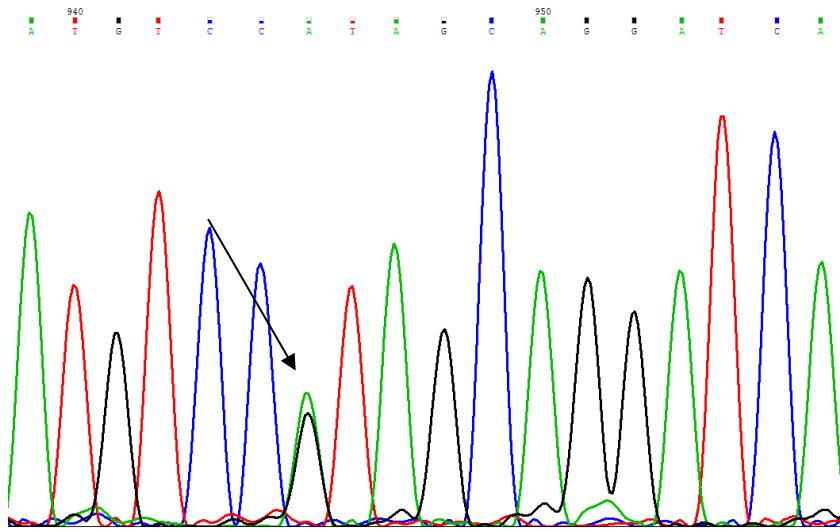
شناسایی نشد. پلی مورفیسم های شناسایی شده در بین نمونه ها و تاثیری که روی توالی آمینواسیدی پروتئین کد شده می گذارند در جدول ثبت شده است (جدول ۱) (شکل های ۱ و ۲).

از مجموع ۱۵ مورد پلی مورفیسم شناسایی شده، ۵ مورد مرتبط با موتاسیون های هم معنی بوده و تغییری در توالی آمینواسیدی آنزیم حاصل ایجاد نمی کنند. از میان این موارد، SNP های 612A>G و 321C>T، 522G>A هر یک تنها در یک نمونه و به صورت منفرد و با توارث هتروزیگوت حضور داشتند. از آن جا که این SNP ها روی فعالیت آنزیم تاثیری نداشته و به صورت منفرد و در عدم حضور موتاسیون های بی معنی (non sense) ظاهر شده اند، در بررسی های هاپلوتایپی بعدی نادیده گرفته شدند. اما موتاسیون های 858A>G و 258C>T با وجود این که در توالی آمینواسیدی آنزیم حاصل تاثیری ندارند، ولی به دلیل این که در نمونه هایی ظاهر شده بودند که دارای موتاسیون های بد معنی (missense) بودند، در بررسی های هاپلوتایپی بعدی لحاظ شدند. نرم افزار SNP Analyzer برای جمعیت مورد مطالعه، ۱۳ نوع هاپلوتایپ مختلف را تخمین زدند (جدول ۲).

به طور کلی در این بررسی ها، در مجموع هر ۱۰۰ نمونه، ۱۵ SNP شناسایی گردید. با استفاده از پایگاه داده NCBI مشخص شد که همه موارد شناسایی شده، در مطالعه های قبلی که در مورد ژن *FUT3* در سراسر جهان انجام شده، گزارش گردیده است و از این رو پلی مورفیسم جدیدی



شکل ۱: کروماتوگرام مربوط پلی مورفیسم 202T>C که به صورت هتروزیگوس می باشد و با پیکان نمایش داده شده است.



شکل ۲: کروماتوگرام مربوط پلی مورفیسم  $508G>A$  که به صورت هتروزیگوس می باشد و با پیکان نمایش داده شده است.

سوئدی مورد توجه قرار گرفت (۱۵). پنج پلی مورفیسم شایعی که در بیشتر جمعیت ها دیده شده عبارتند از:  $202T>C$ ،  $314C>T$ ،  $59T>G$ ،  $508G>A$  و  $1067T>A$  (۱۶)، (۹، ۱۱، ۱۲). در مطالعه حاضر که برای نخستین بار در ایران به منظور بررسی پلی مورفیسم های ژن  $FUT3$  روی ۱۰۰ اهداکننده مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون تهران با استفاده از روش های مولکولی PCR و DNA sequencing انجام گرفت، ۱۵ پلی مورفیسم شناسایی شدند. از بین این موتاسیون ها ۵ مورد مرتبط با جهش های هم معنی و بقیه موارد، مرتبط با جهش های بدمعنی بودند. این جهش های هم معنی عبارتند از:  $612A>G$ ،  $858A>G$ ،  $258C>T$ ،  $321C>T$  و  $522G>A$ . شایع ترین پلی مورفیسم ها به ترتیب عبارتند از:  $202T>C$  (۳۹٪)،  $314C>T$  (۳۷٪)،  $1067T>A$  (۲۰٪)،  $59T>G$  (۹٪)،  $508G>A$  (۸٪) و  $474G>C$  (۲٪). هم چنین ۱۳ نوع هاپلوتایپ مختلف در جمعیت مورد مطالعه تخمین زده شد. در این میان ۵ هاپلوتایپ بیشترین فراوانی را داشتند که عبارتند از:  $Le$  (۶۶/۲٪)،  $le^{59,508}$  (۳/۴٪)،  $le^{59}$  (۴/۱٪)،  $le^{47,202,314}$  (۴/۳٪)،  $le^{202,314}$  (۳/۴٪) و  $le^{59,508}$  (۳/۴٪). مطالعه ای که توسط سوجیما و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی سه جمعیت قفقازی (۱۰۰ نفر)، غنایی (۱۰۶ نفر) و مغولی (۵۰ نفر) با روش Direct sequencing انجام شد، نشان داد که پلی مورفیسم های  $59T>G$ ،  $202T>C$

در گام بعدی هاپلوتایپ های هر نمونه بررسی شده و وضعیت هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن افراد تعیین گردید. با انجام این بررسی ها مشخص شد که ۴۸٪ افراد به صورت  $Le/Le$ ، ۳۴٪ به صورت  $Le/le$  و ۱۸٪ نیز  $le/le$  هستند.

### بحث

در این مطالعه فراوانی آلل های ژن  $FUT3$  در گروهی از اهداکنندگان خون در تهران بررسی شد که در مجموع ۱۵ پلی مورفیسم و ۱۳ هاپلوتایپ شناسایی شد. تمامی این پلی مورفیسم ها قبلاً گزارش شده بودند و شایع ترین آن ها پلی مورفیسم  $202T>C$  بود. شروع مطالعه های مولکولی مرتبط با موتاسیون های ژن لوئیس به سال های ۱۹۹۳ و ۱۹۹۴ بر می گردد. در ابتدا موتاسیون  $1067T>A$  در میان اندونزیایی ها و موتاسیون های  $1067T>A$  و  $508G>A$  در میان ژاپنی ها شناسایی گردید (۹، ۱۳). سپس این موتاسیون ها در مطالعه هایی که روی جمعیتی سوئدی انجام گرفت نیز شناسایی شد. در این مطالعه ها علاوه بر موتاسیون های مذکور، موتاسیون های  $314C>T$  و  $202T>C$  نیز برای اولین بار معرفی شدند. به علاوه نشان داده شد که آلل لوئیس منفی  $le^{202,314}$  در افرادی با فنوتیپ  $Le(a-b-)$  حضور دارد (۱۴). موتاسیون بدمعنی  $59T>G$  نیز از جمله موتاسیون هایی بود که در جمعیت های اندونزیایی، ژاپنی و

پلی مورفیسم‌ها و آلل‌های ژن FUT3 در جمعیت‌های مختلف متفاوت بوده اما می‌توان گفت که تعدادی از آن‌ها در همه جمعیت‌ها البته با فراوانی متفاوت وجود داشته که نشان‌دهنده به وجود آمدن آن‌ها قبل از جدا شدن جمعیت‌های مختلف انسانی می‌باشد. اهمیت گروه خونی لوئیس علاوه بر نقش آن در طب انتقال خون، تاثیر در استعداد ابتلا به بیماری‌های عفونی و غیرعفونی می‌باشد که می‌تواند زمینه مطالعه‌های فراوانی در جمعیت ایرانی باشد (۲۰-۱۷).

### نتیجه‌گیری

شناسایی پلی مورفیسم‌های ایجادکننده گروه‌های خونی با روش مولکولی می‌تواند در شرایطی که روش‌های سرولوژیک محدودیت دارند، راهگشا باشد. به علاوه با توجه به ارتباط واریانت‌های مختلف این گروه‌ها با بیماری‌های مختلف، تعیین آلل‌ها و هاپلوتایپ‌ها در جمعیت ایرانی می‌تواند مطالعه‌ها روی بیماری‌های مختلف را تسهیل کند. ضمناً نتایج این پژوهش در مطالعه‌های جمعیت‌شناسی نیز کاربرد خواهد داشت.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق موضوع پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته خون‌شناسی و علوم انتقال خون با کد اخلاق IR.tmi.rec.1396.033 می‌باشد که هزینه آن توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین شده است.

314C>T, 508G>A و 1067T>A در هر سه جمعیت وجود داشتند (۴). از طرفی بررسی‌های هاپلوتایپی نشان داد که هاپلوتایپ‌های Le<sup>59,508</sup>, Le<sup>59,1067</sup> و Le<sup>202,314</sup> در هر سه جمعیت حضور دارند اما در مطالعه ما از بین هاپلوتایپ‌های مذکور، هاپلوتایپ Le<sup>59,1067</sup> حضور نداشت. آلل Le<sup>47,202,314</sup> نیز که در جمعیت قفقازی با شیوع کم و در حد ۲/۵٪ دیده شده بود، در جمعیت ما با فراوانی ۴/۳٪ قابل رؤیت بود. فراوانی آلل عملکردی لوئیس در جمعیت‌های مغولی، قفقازی و غنایی به ترتیب معادل ۶۱٪، ۷۰/۵٪ و ۴۴/۳٪ اما در جمعیت مورد مطالعه ما ۶۶/۲٪ بود. فراوانی آلل Le<sup>59,508</sup> نیز در سه جمعیت مغولی، غنایی و قفقازی به ترتیب ۲۴٪، ۱/۵٪ و ۱۸/۹٪ و در جمعیت ما ۳/۴٪ بود.

در مطالعه مشابهی که توسط متزولد و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت، نمونه خون ۱۰۰ نفر از اهداکنندگان در اتریش با روش DNA sequencing مورد بررسی قرار گرفته و تنوع ژنتیکی و فراوانی آللی فوکوزیل ترانسفرازهای ۱، ۲ و ۳ در جمعیت مورد مطالعه تعیین شد (۱۶). در این مطالعه فراوانی آلل Le تقریباً مشابه با مطالعه ما و در حدود ۶۵٪ بود. فراوانی آلل‌های شایع دیگر به ترتیب Le<sup>202,314</sup> (۲۱٪)، Le<sup>59,1067</sup> (۶٪)، Le<sup>59,508</sup> (۲٪) و Le<sup>59</sup> (۱٪) و Le<sup>47,202,314</sup> (۱٪) بود. در مطالعه ما برخلاف این مطالعه، آلل Le<sup>59,1067</sup> شناسایی نشد و فراوانی آلل‌های مذکور نیز اندکی تفاوت داشت.

به طور کلی آن چه از مطالعه حاضر و مقایسه آن با سایر مطالعه‌ها برمی‌آید، نشان‌دهنده این است که فراوانی

### References:

- Raud L, Férec C, Fichou Y. From genetic variability to phenotypic expression of blood group systems. *Transfus Clin Biol* 2017; 24(4): 472-5.
- Daniels G. *Human Blood Groups*. USA: John Wiley & Sons; 2013. p. 57-63.
- Shanthi B, Babu K. Analysis of ABO group discrepancies in a tertiary care centre south india. *J Evol Med Dent Sci* 2017; 6(79): 5615-8.
- Soejima M, Munkhtulga L, Iwamoto S, Koda Y. Genetic variation of FUT3 in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians. *Transfusion* 2009; 49(5): 959-66.
- Corvelo TC, de Loiola Rdo S, Aguiar DC, de Matos Gde C, *et al.* The Lewis histo-blood group system: molecular analysis of the 59T> G, 508G> A, and 1067T> A polymorphisms in an Amazonian population. *PLoS One* 2013; 8(7): e69908.
- Vestergaard EM, Hein HO, Meyer H, Grunnet N, Jørgensen J, Wolf H, *et al.* Reference values and biological variation for tumor marker CA 19-9 in serum for different Lewis and secretor genotypes and evaluation of secretor and Lewis genotyping in a Caucasian population. *Clin Chem* 1999; 45(1): 54-61.
- Yazawa S, Nishihara S, Iwasaki H, Asao T, Nagamachi Y, Matta KL, *et al.* Genetic and enzymatic evidence for Lewis enzyme expression in Lewis-negative cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55(7): 1473-8.

- 8- Grubb R, Morgan W. The "Lewis" blood group characters of erythrocytes and body-fluids. *Br J Exp Pathol* 1949; 30(3): 198-208
- 9- Nishihara S, Narimatsu H, Iwasaki H, Yazawa S, Akamatsu S, Ando T, *et al.* Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 29271-8
- 10- Soejima, M. and Y. Koda, Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Leg Med (Tokyo)* 2005; 7(4): 266-9.
- 11- Previato M, Borim MP, Liberatore RD Jr, Pires AC, Dias MA, Brandão de Mattos CC, *et al.*, Lewis histo-blood group system phenotyping and genotyping reveal divergence in the association of Le (a- b-) phenotype and type 1 diabetes. *Vox Sang* 2015; 108(3): 281-6.
- 12- Grahn A, Elmgren A, Aberg L, Svensson L, Jansson PA, Lönnroth P, *et al.* Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum Mutat* 2001; 18(4): 358-9.
- 13- Mollicone R, Reguigne I, Kelly RJ, Fletcher A, Watt J, Chatfield S, *et al.* Molecular basis for Lewis alpha (1, 3/1, 4)-fucosyltransferase gene deficiency (FUT3) found in Lewis-negative Indonesian pedigrees. *J Biol Chem* 1994; 269(33): 20987-94.
- 14- Elmgren A, Börjeson C, Svensson L, Rydberg L, Larson G. DNA sequencing and screening for point mutations in the human Lewis (FUT3) gene enables molecular genotyping of the human Lewis blood group system. *Vox Sang* 1996; 70(2): 97-103.
- 15- Elmgren A, Mollicone R, Costache M, Börjeson C, Oriol R, Harrington J, *et al.* Significance of individual point mutations, T202C and C314T, in the human Lewis (FUT3) gene for expression of Lewis antigens by the human  $\alpha$  (1, 3/1, 4)-fucosyltransferase, Fuc-TIII. *J Biol Chem* 1997; 272(35): 21994-8
- 16- Matzhold EM, Helmberg W, Wagner T, Drexler C, Ulrich S, Winkler A, *et al.* Identification of 14 new alleles at the fucosyltransferase 1, 2, and 3 loci in Styrian blood donors, Austria. *Transfusion* 2009; 49(10): 2097-2108.
- 17- Brandão de Mattos CC, de Mattos LC. Histo-blood group carbohydrates as facilitators for infection by *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol.* 2017;53:167-174.
- 18- Pérez-Ortín R, Vila-Vicent S, Carmona-Vicente N, Santiso-Bellón C, Rodríguez-Díaz J, Buesa J. Histo-Blood Group Antigens in Children with Symptomatic Rotavirus Infection. *Viruses* 2019; 11(4): 339.
- 19- Stowell CP, Stowell SR. Biologic roles of the ABH and Lewis histo-blood group antigens Part I: infection and immunity. *Vox Sang* 2019; 114(5): 426-42.
- 20- Stowell SR, Stowell CP. Biologic roles of the ABH and Lewis histo-blood group antigens part II: thrombosis, cardiovascular disease and metabolism. *Vox Sang* 2019; 114(6): 535-52.

*Original Article*

## Determination of fucosyltransferase 3 gene polymorphisms frequency in Iranian blood donors

Naseri Rad M.<sup>1</sup>, Mardani A.<sup>1</sup>, Naghi A.A.<sup>1</sup>, Shahabi M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

### Abstract

#### **Background and Objectives**

The FUT3 gene regulates the expression of Lewis blood group antigens mainly L<sup>ea</sup> and L<sup>eb</sup>. The Lewis negative phenotype, is the result of an inactivated FUT3 enzyme that lacks glycosidase activity. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) may cause enzyme inactivation with different racial distribution. This study aimed to determine the frequency of these SNPs in Iranian blood donors.

#### **Materials and Methods**

In this cross sectional descriptive study, one hundred blood donors from Tehran Blood Transfusion Center were analyzed. Genomic DNA was extracted and the coding sequence of FUT3 gene was amplified with specific primers. PCR products were directly sequenced. Haplotypes were inferred by SNP Analyzer software.

#### **Results**

A total of 15 SNPs including 10 nonsense SNPs were recognized. The frequency of most common SNPs was detected as 39%(202T>C), 37%(314C>T), 20%(59T>G), 9%(508G>A), and 8%(47G>C). Haplotype analysis revealed 13 haplotypes. The frequency of major haplotypes was detected as 66.2%(Le), 17.5%(le<sup>202,314</sup>), 4.3 %(le<sup>47,202,314</sup>), 4.1 %(le<sup>59</sup>), and 3.4%(le<sup>59,508</sup>).

#### **Conclusions**

Our findings indicate that 202T > C, 59T > G and 508G > A are useful as major SNPs for detection of Lewis-negative alleles in genotyping of Lewis blood groups; they can also play an effective role in large-scale studies associated with diseases in our population.

**Key words:** SNPs, Haplotypes, Alleles

Received: 8 Oct 2019

Accepted: 24 Jun 2020

Correspondence: Shahabi M., PhD of Biological Science. Assistant professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.  
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601558; Fax: (+9821) 88601542  
E-mail: majshahabi@yahoo.com