

میزان بیان ژن vWF در بیماران و ناقلین فون ویلبراند نوع ۳ با روش Real-time RT PCR

مهشید زکیانی رودسری^۱، شیرین شهبازی^۲، رضا مهدیان^۳، فرزاد بنی احمد^۴، اسکندر امیدنی^۵

چکیده

سابقه و هدف

بیماری فون ویلبراند، شایع ترین اختلال خونریزی دهنده ارثی است که در نتیجه نقص و ساختار غیر طبیعی فاکتور فون ویلبراند ایجاد می شود. این فاکتور که نقش اساسی در انعقاد خون بازی می کند، توسط ژن vWF کد می شود. نوع ۳، وخیم ترین فرم بیماری است که دارای توارث اتوزومال مغلوب می باشد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر موتاسیون های مختلف ژن vWF بر بیان mRNA در افراد مبتلا به بیماری فون ویلبراند بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه کاربردی، نمونه خون افراد مبتلا از میان گروهی از بیماران که جهش های آنان قبلاً شناسایی شده بود، گرفته شد. به منظور بررسی سطح بیان ژن vWF، پلاکت های خون محیطی جداسازی شد و استخراج RNA از آنها صورت پذیرفت. سپس با استفاده از روش Real-time RT PCR بر روی نمونه های cDNA پلاکتی، بیان ژن vWF در تمام افراد بیمار و ناقل مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

بررسی افراد خانواده ای که واجد جهش بی معنی در اگزون ۳۵ بودند، نشان داد که فرد بیمار هموزیگوت در مقایسه با افراد هتروزیگوت خانواده، بیان بسیار کمتری از ژن vWF را دارا می باشد (p= ۰/۰۰۵). مطالعه در خانواده دوم که دارای بیماری با جهش هموزیگوت جایگاه پیرایش واقع در اگزون ۱۰ بودند، مشخص کرد که بیان ژن vWF در افراد بیمار و ناقل تفاوت معناداری ندارد.

نتیجه گیری

هر جهش اثر خاص خود را بر بیان ژن می گذارد. تحقیقات نشان داده حتی جهش هایی که از نظر ماهیت مشابه هستند، می توانند اثرات مختلفی بر بیان ژن داشته باشند. مکانیسم NMD یکی از روندهایی است که می تواند در این انتخاب برای تخریب نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: بیماری فون ویلبراند، بیان ژن، فاکتور فون ویلبراند

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات - گروه زیست شناسی - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
- ۳- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی - انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۴- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی - انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۵- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

مقدمه

فاکتور فون ویلبراند (vWF) von Willebrand Factor یک پروتئین بزرگ مولتی مر و با عملکردهای متنوع است که به اجزای ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شود و در سیستم انعقادی نقش مهمی را بر عهده دارد (۱). مشخص شده است که سلول‌های اندوتلیال رگ‌های کوچک و بزرگ، مویرگ‌ها، آئورت و شریان‌ها، vWF را ساخته و ترشح می‌کنند. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که ژن vWF در سلول‌های اندوتلیال بافت‌های مختلف بیان می‌شود. علاوه بر سلول‌های اندوتلیال، پلاکت‌ها نیز حاوی ذخیره vWF می‌باشند که به وسیله پیش‌سازهای پلاکت یعنی مگاکاریوسیت‌ها تولید شده است (۲). vWF دارای دو نقش مهم در هموستاز می‌باشد: (۱) موجب چسبندگی پلاکت‌ها در زمان آسیب به اندوتلیوم می‌شود (۲) با اتصال به فاکتور ۸ انعقادی به عنوان ناقل اختصاصی آن عمل می‌کند (۳). ژن vWF کلون شده و جایگاه آن در کروموزوم ۱۲ p ۱۳/۲ شناسایی شده است. ژن vWF یک ژن بزرگ، حدود ۱۷۸ kb و شامل ۵۲ اگزون می‌باشد (۴). یک ژن کاذب غیر کد شونده (Non coding) مرتبط به ژن vWF در کروموزوم شماره ۲۲ شناسایی شده است. این ژن کاذب متشکل از توالی ژنی از اگزون ۲۳ تا ۳۴ بوده و دارای ۹۷٪ همولوژی با ژن اصلی می‌باشد. محصول اولیه ژن vWF، یک پروتئین ۲۸۱۳ آمینواسیدی است که از یک پپتید نشانه (Signal) ۲۲ اسید آمینه‌ای تشکیل شده و پری-پپتید (Pre-peptid) هم نامیده می‌شود. یک پروپپتید بزرگ متشکل از ۷۴۱ اسید آمینه و یک مولکول vWF بالغ متشکل از ۲۰۵۰ اسید آمینه است. شمارش از اولین اسید آمینه پپتید نشانه شروع می‌شود. بنابراین از اسید آمینه ۷۶۴، پروتئین بالغ است (۵). مناطق مختلف پروتئینی، ۴ نوع دومین تکرار شونده cDNA را ایجاد می‌کنند (C1, C2, B, D4, A2, A1, D3, D', D2, D1) که مسؤول عملکردهای مختلف مولکولی است. vWF بالغ در نتیجه پردازش‌های داخل سلولی به وجود می‌آید که منتج به گروه‌های هتروژن ذخیره‌ای و یا ترشحی از گلیکوپروتئین‌های مولتی‌مر-مولتی دومین می‌شود و مجموعاً به عنوان vWF شناخته می‌گردند (۳، ۶).

بیماری فون ویلبراند (vWD) von Willebrand disease، شیوعی برابر با حدود یک درصد در کل جمعیت دارد. تظاهرات و نشانه‌های خونریزی متفاوتند: خونریزی‌های جلدی - مخاطی در همه موارد vWD شایع هستند. مواردی که نقص نسبی کمی در vWF دارند، نوع (تغییر قاب خوائش = Frame shift) vWD را ایجاد می‌کنند که با تظاهرات خونریزی‌دهنده متنوعی روبرو هستند. در حالی که نقصان‌های کیفی در ساختار vWF، نوع ۲ vWD را باعث می‌شوند. نوع ۳ vWD کمیاب‌تر است و بیماران مبتلا، خونریزی‌های شدید تا متوسط دارند و این امر به دلیل عدم حضور vWF به واسطه الگوی مغلوب وراثتی است (۶).

بیش از ۱۰۰ جهش مجزا در ارتباط با نوع ۳ بیماری شناسایی شده است. انواع جهش‌های تشخیص داده شده در این بیماری شامل جهش‌های تغییر چارچوب (Nonsense)، بی‌معنی (Splice site)، جایگاه پیرایش (Missense) و دگر معنی (Null allele) است. بیشتر ناهنجاری‌های ژنی به آلل پوچ (Null allele) منتهی می‌شوند که توسط حذف‌های بزرگ یا کوچک، درج‌های کوچک (Small insertion)، جهش‌های نقطه‌ای بی‌معنی و جهش‌های جایگاه پیرایش به وجود می‌آیند (۱).

مطالعه‌های گوناگون نشان داده‌اند که جهش‌های ژن vWF در سطوح مختلفی می‌توانند به نقص عملکرد منجر شوند. تخریب mRNA واجد جهش پوچ، یکی از این موارد می‌باشد. حدس زده می‌شود جهش‌هایی که به آلل پوچ منجر می‌شوند، قبل از حضور در مسیر ترجمه توسط مکانیسم تخریب (Decay) از بین می‌روند تا از ایجاد یک پروتئین ناقص (Truncated protein) جلوگیری به عمل آید. تحقیقات در این زمینه بر روی جهش‌های مختلف ژن صورت پذیرفته، با این وجود هنوز نمی‌توان با قطعیت تعیین کرد که هر جهش چه اثری بر روی میزان بیان و یا دوام mRNA خواهد گذاشت.

مطالعه حاضر به بررسی اثر دو جهش مختلف بر روی میزان بیان mRNA در دو خانواده بیمار نوع ۳ فون ویلبراند پرداخته است. این تحقیق با هدف ارزیابی تاثیر جهش‌ها چه از نظر ماهیت چه از نظر مکان قرارگیری بر روی بیان پایداری mRNA صورت پذیرفته است. یافته‌های این

تحقیق به شناسایی ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ در بیماران نوع ۳ فون ویلبراند کمک می‌نماید. به عنوان یکی از اولین مطالعه‌ها در این زمینه، از روش Real-time RT PCR کمی با رنگ‌آمیزی Cyber Green استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع کاربردی بود. بیمارانی وارد مطالعه شدند که جهش‌های آنان قبلاً شناسایی شده و اطلاعات کامل ژنوتیپ آن‌ها به صورت تعیین توالی DNA در دسترس بود. تشخیص بالینی و آزمایش‌های هماتولوژیک بیماران نیز قبلاً شرح داده شده است (۱). پس از کسب رضایت کتبی، خون بیماران مبتلا و افراد مورد نظر فامیل آن‌ها به همراه نمونه‌های کنترل به صورت سیراته تهیه شد. نمونه‌گیری به صورتی انجام گرفت که نهایتاً ۸ نمونه از ناقلین و بیماران در هر خانواده و ۲۰ نمونه از افراد سالم برای بهینه‌سازی مراحل جداسازی پلاکت، استخراج RNA و Real-time RT PCR تهیه شد. افراد کنترل از میان افراد سالمی که سابقه اختلال انعقادی نداشتند، انتخاب شدند. امکان بیماری انعقادی آنان توسط سؤالاتی که در چهار چوب پرسشنامه استاندارد پرسیده می‌شد، رد شد. از هر فرد مورد آزمایش، ۱۳/۵ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد که با ماده ضد انعقاد محلول سیترات سدیم ۰/۱۰۹ مولار ترکیب گشت. لوله تا قبل از جداسازی پلاسمای غنی از پلاکت (PRP = Platelet Rich Plasma) در دمای محیط نگهداری شد و چندین مرتبه تکان داده شد تا به آرامی با سیترات ترکیب گردد.

جداسازی و آماده‌سازی پلاکت:

جداسازی پلاکت طبق دستورالعمل‌های رایج آزمایشگاهی صورت پذیرفت. PRP حاصله یا در فریزر -۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و یا مستقیماً وارد مراحل استخراج RNA شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy Plus (ساخت شرکت کیژن) انجام شد. ساخت

cDNA از mRNA به دست آمده از پلاکت‌ها، با استفاده از کیت QuantiTect Reverse Transcription (ساخت شرکت کیژن) انجام شد. تمام مراحل طبق دستورالعمل‌های پیشنهادی صورت پذیرفت.

طراحی آغازگر و RT-PCR:

برای دو ناحیه مجزا از cDNA به دست آمده از vWF، آغازگرهای اختصاصی در برگرفته نواحی اتصال آگزون - ایترون طراحی گردید. به عنوان کنترل نیز از ژن GAPDH استفاده شد. بعد از ساخت cDNA جهت بررسی‌های اولیه و قبل از انجام Real-time RT PCR، مراحل RT-PCR معمولی (Conventional) به صورت زیر انجام شد: درون هر تیوپ مخلوطی به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر MasterMix Accua Power PCR PreMix (بیونر - کره)، ۱ میکرولیتر primer Mix با غلظت نهایی ۲۰۰ نانومول و ۵ میکرولیتر cDNA با غلظت ۴۰۰ ng/μL تهیه شد. سپس نمونه‌ها در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفت. واکنش، مطابق با برنامه دمایی- زمانی زیر انجام شد: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت‌سازی cDNA الگو در مدت زمان ۳ دقیقه در چرخه اول و سپس برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۹ ثانیه. تکثیر نهایی شامل ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ دقیقه بود. واکنش‌های هر نمونه cDNA برای هر سه قطعه ژنی vWF1، vWF2 و GAPDH، به صورت هم‌زمان انجام شد (جدول ۱).

Real-time RT-PCR:

دو قطعه ژن vWF1 و vWF2 به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع انتخاب شدند. سپس واکنش Real-time RT-PCR برای ژن‌های هدف و مرجع بر روی نمونه‌های نرمال و افراد بیمار به صورت زیر انجام گرفت: درون هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (سنگاپور، بیوسیستم، Microamo) مخلوطی به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix SYBR Green (بیوسیستم، انگلیس)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر با

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه برای تکثیر ژنهای هدف (vWF 1,2) و مرجع (GAPDH)

نام	سکانس	Amplicon size
vWF-RNA1-F	TCTGTGGATTCACTGGATGCA	۸۵
vWF-RNA1-R	CGTAGCGATCTCCAATTCCAA	
vWF-RNA2-F	AGAAACGCTCCTTCTCGATTATTG	۸۴
vWF-RNA2-R	TGTCAAAAAATTCCCCAAGATACAC	
hGAPDH-F	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	۱۱۲
hGAPDH-R	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	

بود، نتایج به صورت زیر دسته‌بندی شده است:

جهش‌های بی‌معنی:

بررسی اثر این نوع جهش در خانواده دارای جهش ۵۹۴۱ G/T در اگزون ۳۵ صورت پذیرفت. پدر و مادر ناقل بیماری، خویشاوند درجه یک بوده و دارای یک فرزند بیمار می‌باشند. از یکی از اعضای دیگر خانواده که علائم بیماری را نداشت، نیز نمونه‌گیری انجام شد. نتایج نشان داد که فرد هموزیگوت در مقایسه با افراد هتروزیگوت بیان بسیار کمتری از ژن vWF را داشته است (بیان نسبی ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۱۶ در برابر ۰/۰۳۷ ± ۰/۲۵۰ و p= ۰/۰۰۵) و این امر خود شهادی بر احتمال تخریب mRNA با مکانیسم NMD (Non sense Mediated mRNA Decay) می‌باشد.

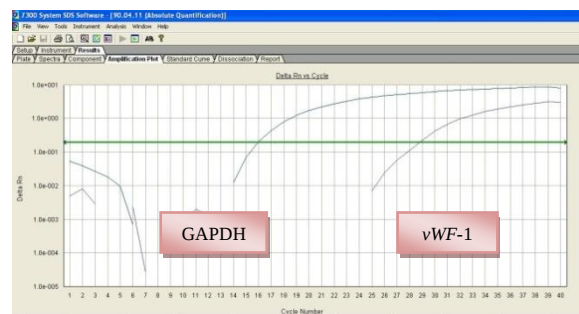
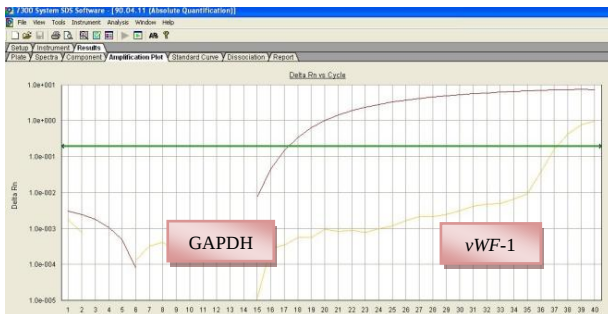
جایگاه برش:

جهش در جایگاه پیرایشی دهنده (Splice donor site = GT) و جایگاه پیرایشی پذیرنده (Splice acceptor site = AG)، معمولاً به پیرایش بیراهه (Aberrant) منجر می‌شود. این فرآیند می‌تواند به حذف توالی رمزدار (پرش یا دررفتن اگزون) (Exon skipping) یا نگهداری توالی ایترون بی‌انجامد. خانواده دوم مورد مطالعه، دارای جهش جایگاه پیرایش بودند. نتایج Real-time RT PCR آن‌ها مشخص کرد که این نوع جهش اثری بر میزان بیان ژن vWF نداشته (بیان نسبی ۰/۰۷۵ ± ۰/۵۰۰ در بیماران و ۰/۱۰۶ ± ۰/۷۰۷ در ناقلین) و ژن دارای بیان می‌باشد. نوع جهش در این خانواده ۱۱۱۰-G/A شناسایی شده بود. در میان افراد خانواده از دو بیمار که خواهر و برادر بودند، به همراه پدر و مادر ناقل آن‌ها نمونه‌گیری انجام شد. والدین، خویشاوند درجه یک بودند. خلاصه نتایج حاصل از

غلظت نهایی ۲۰۰ نانو مول و ۵ میکرولیتر cDNA با غلظت ۴۰۰ ng/μL تهیه شد. Real-time RT-PCR در دستگاه (Applied ABI 7300 Sequence Detection Systems CA، بیوسیستم) و مطابق با برنامه دمایی - زمانی زیر انجام پذیرفت: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت - سازی cDNA الگو در مدت زمان ۱۰ دقیقه در چرخه اول و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه. هر مرحله تکثیری کامل، توسط یک مرحله تفکیک (Dissociation) که شامل: ۹۵ درجه سانتی - گراد برای مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه می‌باشد به منظور تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ادامه یافت. واکنش‌های دو گانه برای هر نمونه cDNA و برای هر سه قطعه ژنی، به صورت هم زمان انجام شد و میانگین Ct (چرخه آستانه) برای هر ژن محاسبه شد.

یافته‌ها

در مرحله بهینه‌سازی، میزان بیان ژن vWF در ۲۰ فرد طبیعی اندازه‌گیری شد. جهت راه‌اندازی آزمایش، ابتدا RT-PCR معمولی صورت پذیرفت. از آن جایی که این روش دقت لازم برای ارزیابی کمی بیان ژن را ندارد و به میزان بالایی از RNA نیازمند است، از روش Real-time RT PCR به عنوان روش اصلی اندازه‌گیری استفاده شد. اهمیت این مطالعه در راه‌اندازی روشی بود که با مقادیر بسیار ناچیز RNA پلاکتی نیز قابل انجام باشد و حجم مورد نیاز نمونه‌های خون افراد بیمار و خانواده آنان به کمترین حد ممکن کاهش یابد تا باعث ایجاد مشکل برای آن‌ها نشود. بر اساس نوع جهشی که در هر خانواده شناسایی شده



شکل ۱: راست) نمودار منحنی تکثیر یک فرد هتروزیگوت دارای این جهش بی معنی نشان داده شده است که بیانی مشابه با افراد کنترل نرمال دارد. در صورتی که در شکل ۱: چپ) یک فرد بیمار هموزیگوت نشان داده شده است که نسبت به فرد هتروزیگوت بیان بسیار کمتری دارد. این میزان بیان تقریباً برابر با صفر در نظر گرفته می شود.

جدول ۲: میانگین نسبت بیان ژن vWF در دو خانواده مورد بررسی در این مطالعه. میزان بیان ژن نسبت به ژن مرجع (GAPDH) تصحیح شده و در مقایسه با گروه کنترل، نرمال گزارش شده است. جهش پوچ در اگزون ۳۵ باعث مستعد شدن mRNA به تخریب با واسطه مکانیسم NMD شده و سطح mRNA در فرد هموزیگوت بیمار نزدیک به صفر تعیین شده است.

PLATELET vWF mRNA			جهش محل ویرایش اگزون ۱۰
بیمار (n= ۲)	حامل (n= ۲)	نرمال (n= ۱۰)	
$7/2 \pm 1/05$	$6/7 \pm 0/975$	$6/2 \pm 0/8$	mΔCt (vWF-GAPDH)
$1 \pm 0/15$	$0/5 \pm 0/075$	۰	mΔΔCt
$0/5000 \pm 0/075$	$0/707 \pm 0/10605$	$1/000 \pm 0/15$	Mean RATIO

PLATELET vWF mRNA			جهش بی معنی در اگزون ۳۵
بیمار (n= ۲)	حامل (n= ۲)	نرمال (n= ۱۰)	
$12/4 \pm 1/8$	$8/5 \pm 1/2$	$6/4 \pm 0/9$	mΔCt (vWF-GAPDH)
$6 \pm 0/9$	$2/1 \pm 0/3$	۰	mΔΔCt
$0/016 \pm 0/0024$	$0/250 \pm 0/0375$	$1/000 \pm 0/13$	Mean RATIO

تازگی توجه محققین را برای این منظور به خود جلب نموده است.

اولین استفاده از Real-time RT PCR در سنجش بیان فاکتور فون ویلبراند توسط کر و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت. البته این مطالعه بر روی نمونه های انسانی و یا بیماران نبود بلکه در رده های سلولی بهینه سازی انجام شد. آن ها سنجش جدیدی برای مقادیر کمی mRNA فاکتور فون ویلبراند انسانی با استفاده از سیستم PCR کمی توسعه دادند. این روش اجازه اندازه گیری صحیح و دقیق غلظت mRNA در نمونه ها را می دهد (۷).

محاسبه میزان بیان mRNA ژن vWF در ۳ فرد بیمار و ۴ فرد ناقل نسبت به افراد نرمال در هر دو خانواده در جدول ۲ آمده است.

بحث

در این مطالعه از روش Real-time RT PCR کمی برای سنجش بیان ژن vWF استفاده گردیده است که روشی کارآمد در ارزیابی بیان ژن بوده و با حساسیت و دقت بالا، میزان های کم بیان را نیز آشکار می سازد. با وجود این در خصوص بررسی بیان ژن vWF، یک روش نوپا است و به

پیرلینک و همکاران در سال ۱۹۹۲ بر روی یک خانواده فون ویلبراند نوع ۱ که در کدون ۸۵۴ واقع در اگزون ۲۰ یک جایگزینی CAG به CGG داشتند، مطالعه‌هایی انجام دادند. این جهش تک نوکلئوتیدی منجر به جایگزینی اسید آمینه گلوتامین به آرژنین می‌شود. این گروه ابتدا با استفاده از روش RT-PCR بر روی RNAهای پلاکت به عنوان الگو، نقایص مولکولی بیمار را شناسایی کردند (۸). آن‌ها متوجه شدند که بیماران هتروزیگوت نوع ۱ فون ویلبراند، در سطح cDNA تنها توالی واجد جهش را نشان می‌دهند در حالی که بررسی‌ها در سطح DNA ژنومی به صورت هتروزیگوت بود. این تحقیق جزو اولین شواهدی بود که نشان داد اثرات جهش‌ها بر بیان ژن می‌تواند کاملاً متفاوت باشد. هم چنین مشخص شد که اثر بیان ژن متعاقب جهش می‌تواند رقابتی باشد. با مشخص شدن وضعیت هتروزیگوت مرکب بیمار، دسته‌بندی او در نوع ۳ بیماری مطرح گردید (۸).

کابرا و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی جهش جدید دگر معنی (p.Q ۸۹۵ H) G>C. ۲۶۸۵ در ژن vWF که سطح بسیار پایینی از mRNA این ژن را نشان می‌دهد، مطالعه کردند. این گروه با استفاده از بررسی‌های پلی مورفیسم تک رشته‌ای (SSCP)، الکتروفورز ژل حساس ترکیبی (CSGE) و توالی‌یابی الگوی غیرنرمال به بررسی آنالیز ژن vWF در سطح mRNA پرداختند. نتایج بررسی‌های ژنتیکی ژن vWF تایید کرد که بیماران برای جهش‌های (p.Q ۸۹۵ H) G>C. ۲۶۸۵ و (p.Q ۸۵۱ H) G>A. ۲۶۵۱ C. که در انتهای ۳' اگزون ۲۰ قرار دارند، هتروزیگوت مرکب هستند (۴).

مطالعه دیگری در این زمینه به بررسی جهش شایع جمعیت اروپایی C2680Δ در آمریکا پرداخت. محققین ضمن ذکر این نکته که به نظر نمی‌رسد این جهش در جمعیت آمریکا شایع باشد، گزارشی نیز از بیان ژن در بیمارانشان داشتند. این جهش که یک حذف تک نوکلئوتیدی است و منجر به تغییر در قاب خواندن می‌شود، در سطح بیان mRNA هیچ اختلالی ایجاد نکرده بود. مشکل به وجود آمده در این بیمار بعد از ترجمه و با گیر افتادن پروتئین فاکتور فون ویلبراند در داخل شبکه اندوپلاسمی و

عدم آزاد شدن آن به جریان خون، تشخیص داده شد (۹). در بررسی دیگری نیز بر روی خانواده‌ای دارای نوع ۱ بیماری vWD، مطالعه‌ای صورت گرفت. بررسی‌های ژنتیکی نمایان ساخت که بیماران برای جهش ۱۵۳۴-C>A۳ در توالی جایگاه برش پذیرنده اینترون ۱۳ از ژن vWF، هموزیگوت هستند. این گروه یادآور شدند که تنها mRNA طبیعی منجر به ترجمه vWF طبیعی می‌شود در حالی که mRNAهای دیگر جهش‌یافته که تحت تاثیر NMD قرار نگرفتند، پروتئین‌های بریده ایجاد می‌کنند. به علاوه مکانیسم حذف (Decay) در mRNAهای جهش یافته به خصوص در حضور کدون‌های خاتمه زودرس مشاهده می‌شود (۱۰).

در تحقیقی دیگر، به منظور دانستن این که آیا مکانیسم NMD در جهش‌های ژن vWF حضور دارد یا نه، بر روی ۳ فرد ایتالیایی غیر خویشاوند مطالعه‌ای انجام دادند. به منظور ارزیابی اثر جهش جدید، cDNA اگزون ۲۱-۱۸ و ۵۲-۴۹ توسط PCR تکثیر شد و توالی‌یابی محصولات PCR نشان داد که جهش جدید جایگاه پردازش، باعث از بین رفتن اگزون ۵۰ منجر به (premature translation) PTC (termination codons) در اگزون ۵۱ می‌شود. داده‌ها نشان داد که پروتئین‌های بریده vWF به طور غیر احتمالی همان طور که تخریب mRNA صورت می‌گیرد، تولید می‌شوند به علاوه آن‌ها اثبات کردند که حساسیت NMD برای رونویس‌های vWF وابسته به موقعیت PTC است. هم چنین پیشنهاد کردند که برخی از جهش‌های معرفی‌کننده PTC از تخریب فرار می‌کنند حتی اگر آن ژن به عنوان هدف برای NMD شناخته شود (۱۱).

مطالعه نسبتاً جدیدی در همین زمینه که تنها جهش‌های جایگاه برش را مورد بررسی قرار داده بود، در ارزیابی mRNA لکوسیتی و پلاکتی به نتایجی مشابه مطالعه‌های دیگر دست یافت. بدین معنی که هر جهش اثر خاص خود را بر mRNA گذاشته است. این تاثیر حتی به صورت تغییر برش و انواع حذف اگزونی نیز بوده است (۱۲). مطالعه جامع دیگری با بررسی سه فامیل که هفت نفر آن‌ها سالم بودند، در تعیین توالی با تخمین ناحیه زیر منحنی به کمک نرم‌افزار، نسبت بیان هر آل را اندازه‌گیری نمودند. این سه

ژن داشته باشند. این که هر جهش چگونه در این فرآیند نقش بازی می کند به بررسی های گسترده تری نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاون پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، جناب آقای دکتر یعقوب فتح الهی تشکر و قدردانی می گردد.

خانواده هم انواعی از جهش ها را داشتند که اثر آن ها نیز بر روی mRNA متفاوت بود (۱۳).

نتیجه گیری

در مجموع می توان نتیجه گرفت که هر جهش اثر خاص خود را بر بیان ژن می گذارد. حتی جهش هایی که از نظر ماهیت مشابه هستند می توانند اثرات مختلفی بر بیان

References :

- 1- Shahbazi S, Mahdian R, Ala FA, Lavergne JM, Denis CV, Christophe OD. Molecular characterization of Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Haemophilia* 2009 ; 15(5): 1058-64.
- 2- de Wit TR, van Mourik JA. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14(2): 241-55.
- 3- Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, *et al.* Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30(3): 264-70.
- 4- Cabrera N, Casaña P, Cid AR, Haya S, Moret A, Aznar JA. Novel missense mutation c.2685G>C (p.Q895H) in vWF gene associated with very low levels of vWF mRNA. *Ann Hematol* 2009; 88(3): 245-7.
- 5- Robertson J, Lillicrap D, James PD. Von Willebrand disease. *Pediatr Clin North Am* 2008 ; 55(2): 377-92, viii-ix.
- 6- Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica* 2003; 88(1): 94-108.
- 7- Kerr R, Stirling D, Rae M, White AR, Ludlam CA. A novel method for quantitation of human von Willebrand factor messenger RNA. *Thromb Res* 2002; 106(4-5): 237-41.
- 8- Peerlinck K, Eikenboom JC, Ploos Van Amstel HK, Sangtawesin W, Arnout J, Reitsma PH, *et al.* A patient with von Willebrand's disease characterized by compound heterozygosity for a substitution of Arg854 by Gln in the putative factor-VIII-binding domain of von Willebrand factor (vWF) on one allele and very low levels of mRNA from the second vWF allele. *Br J Haematol* 1992; 80(3): 358-63.
- 9- Mohlke KL, Nichols WC, Rehemtulla A, Kaufman RJ, Fagerstrom HM, Ritvanen KL, *et al.* A common frameshift mutation in von Willebrand factor does not alter mRNA stability but interferes with normal propeptide processing. *Br J Haematol* 1996; 95(1): 184-91.
- 10- Gallinaro L, Sartorello F, Pontara E, Cattini MG, Bertomoro A, Bartoloni L, *et al.* Combined partial exon skipping and cryptic splice site activation as a new molecular mechanism for recessive type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2006; 96(6): 711-6.
- 11- Platè M, Duga S, Baronciani L, La Marca S, Rubini V, Mannucci PM, *et al.* Premature termination codon mutations in the von Willebrand factor gene are associated with allele-specific and position-dependent mRNA decay. *Haematologica* 2010; 95(1): 172-4.
- 12- Corrales I, Ramírez L, Altisent C, Parra R, Vidal F. The study of the effect of splicing mutations in von Willebrand factor using RNA isolated from patients' platelets and leukocytes. *J Thromb Haemost* 2011; 9(4): 679-88.
- 13- Castaman G, Platè M, Giacomelli SH, Rodeghiero F, Duga S. Alterations of mRNA processing and stability as a pathogenic mechanism in von Willebrand factor quantitative deficiencies. *J Thromb Haemost* 2010; 8(12): 2736-42.

Original Article

vWF gene expression analysis in type3 von willebrand affected patients using real-time PCR

Zakiani Roudsari M.¹, Shahbazi Sh.², Mahdian R.³, Baniahmad F.³, Omidinia E.³

¹Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

von Willebrand Disease (vWD) is the most common inherited haemorrhagic abnormality. The disease is caused by deficiency of von Willebrand Factor (vWF). vWF is encoded by vWF gene and vWD type3 is the severest form of the disease inherited in autosomal recessive pattern. In the present study, the impact of various vWF gene mutations on mRNA expression was investigated in vWD patients.

Materials and Methods

Blood samples were obtained from vWD patients with known mutations to determine the vWF gene expression level. Peripheral blood platelets were isolated and the total RNA was extracted. To evaluate the vWD gene expression of patients and carriers, the quantitative real-time PCR of the platelet cDNAs was performed.

Results

Patients in families with the nonsense mutation in exon 35 showed significantly lower levels of vWF mRNA compared to the heterozygote carriers of the mutation and normal controls ($p=0.005$). However, there was no significant difference between vWF mRNA levels in patients and carriers in the other families who had splice site mutation in exon 10 ($p=0.288$). The impact of the mutation on the protein synthesis and function has yet to be investigated.

Conclusions

Each mutation in vWF gene has its particular impact on the gene expression. It has been shown that even mutations of the same type may have different effects on mRNA expression. Evaluation of cDNA is not applicable in the cases in which the mRNA is affected by NMD pathway.

Key words: von Willebrand Diseases, Gene Expression, von Willebrand Factor

Received: 1 Nov 2011

Accepted: 28 Feb 2012

Correspondence: Shahbazi Sh., PhD of Genetics. Assistant Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82884556; Fax: (+9821) 82884555
E-mail: sh.shahbazi@modares.ac.ir