خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۴ زمستان ۹۱ (۳۹۸-۳۹۱)

مقاله پژوهشی

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

مهشید زکیانی رودسری[۱]، شیرین شهبازی[۲]، رضا مهدیان[۳]، فرزاد بنی‌احمد[۴]، اسکندر امیدی‌نیا[۵]

چکیده

سابقه و هدف

بیماری فون‌ویلبراند، شایع‌ترین اختلال خونریزی‌دهنده ارثی است که در نتیجه نقص و ساختار غیر طبیعی فاکتور فون‌ویلبراند ایجاد می‌شود. این فاکتور که نقش اساسی در انعقاد خون بازی می‌کند، توسط ژن *vWF* کد می‌شود. نوع ۳ ، وخیم‌ترین فرم بیماری است که دارای توارث اتوزومال مغلوب می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر موتاسیون‌های مختلف ژن *vWF* بر بیان mRNA در افراد مبتلا به بیماری فون‌ویلبراند بود.

مواد و روش‌ها

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

یافته‌ها

بررسی افراد خانواده‌ای که واجد جهش بی‌معنی در اگزون ۳۵ بودند، نشان داد که فرد بیمار هموزیگوت در مقایسه با افراد هتروزیگوت خانواده، بیان بسیار کمتری از ژن *vWF* را دارا می‌باشد($p= ۰/۰۰۵$). مطالعه در خانواده دوم که دارای بیمارانی 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 می‌گذارد. تحقیقات نشان داده حتی جهش‌هایی که از نظر ماهیت مشابه هستند، می‌توانند اثرات مختلفی بر بیان ژن داشته باشند. مکانیسم NMD یکی از روندهایی است که می‌تواند در این انتخاب برای تخریب نقش داشته باشد.

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

تاریخ دریافت : ۹۰/۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

مقدمه

فاکتور فون‌ویلبراند von Willebrand Factor (*vWF*)، یک پروتئین بزرگ مولتی‌مر 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 می‌شود۲) 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 kb ۱۷۸ 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 peptid) 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(A1، A2، B، D4، C2، C1، 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- مولتی‌دومین می‌شود و مجموعاً" به عنوان *vWF* شناخته می‌گردند(۶، ۳).

بیماری فون‌ویلبراند von Willebrand disease (*vWD*)، شیوعی برابر با حدود یک درصد در کل جمعیت دارد. تظاهرات و نشانه‌های خونریزی متفاوتند: خونریزی‌های جلدی ـ مخاطی در همه موارد *vWD* شایع هستند. مواردی که نقص نسبی کمی در *vWF* دارند، نوع(تغییر قاب خوانش = 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 allel) است. بیشتر ناهنجاری‌های ژنی به آلل پوچ(Null allel) 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

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 سیتراته 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 ۰/۰۱۰۹ 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 Mini Kit (ساخت شرکت کیاژن) انجام شد. ساخت cDNA از mRNA به دست آمده از پلاکت‌ها، با استفاده از کیت QuantiTect Reverse Transcription (ساخت شرکت کیاژن) 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 برگیرنده نواحی اتصال اگزون – اینترون 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 ـ کره)، ۱ میکرولیتر primer Mix با غلظت نهایی ۲۰۰ نانو مول 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 *vWF*1 ، *vWF*2 و GAPDH، به صورت هم‌زمان انجام شد(جدول ۱).

Real-time RT-PCR :

دو قطعه ژن *vWF*1 و *vWF*2 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 ماکرولیتر شامل ۱۲/۵ ماکرولیتر Master Mix SYBR Green (بیوسیستم ، انگلیس)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر با

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

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	TCTGTGGATTCAGTGGATGCA	۸۵
vWF-RNA1-R	CGTAGCGATCTCCAATTCCAA	
vWF-RNA2-F	AGAAACGCTCCTTCTCGATTATTG	۸۴
vWF-RNA2-R	TGTCAAAAAATTCCCCAAGATACAC	
hGAPDH-F	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	۱۱۲
hGAPDH-R	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	

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 بود، نتایج به صورت زیر دسته‌بندی شده است:

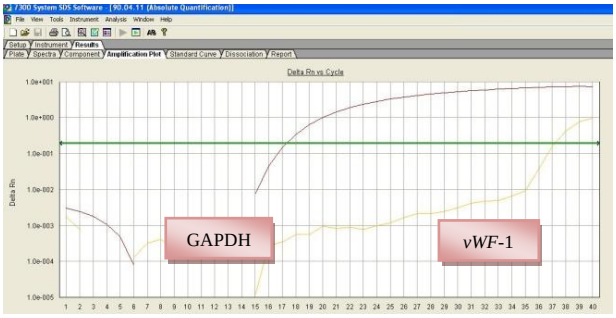
جهش‌های بی‌معنی:

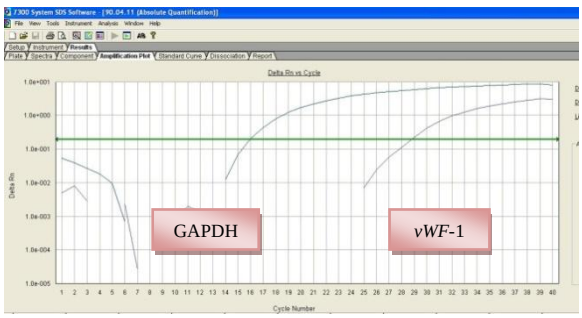
بررسی اثر این نوع جهش در خانواده دارای جهش G/T ۵۹۴۱ در اگزون ۳۵ صورت پذیرفت. پدر و مادر ناقل بیماری، خویشاوند درجه یک بوده و دارای یک فرزند بیمار می‌باشند. از یکی از اعضای دیگر خانواده که علایم بیماری را نداشت، نیز نمونه‌گیری انجام شد. نتایج نشان داد که فرد هموزیگوت در مقایسه با افراد هتروزیگوت بیان 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 شاهدی 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 اینترون 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 G/A۱۱۱۰–۱ 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]





شکل ۱: راست) نمودار منحنی تکثیری یک فرد هتروزیگوت دارای این جهش بی‌معنی 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 می‌شود.

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.

جهش محل ویرایش اگزون ۱۰	PLATELET *vWF* mRNA		
	نرمال(n= ۱۰)	حامل(n= ۲)	بیمار(n= ۲)
mΔCt (*vWF*-GAPDH)	۶/۲ ± ۰/۸	۶/۷ ± ۰/۹۷۵	۷/۲ ± ۱/۰۵
mΔΔCt	۰	۰/۵ ± ۰/۰۷۵	۱ ± ۰/۱۵
Mean RATIO	۱/۰۰۰ ± ۰/۱۵	۰/۷۰۷ ± ۰/۱۰۶۰۵	۰/۵۰۰۰ ± ۰/۰۷۵

جهش بی‌معنی در اگزون ۳۵	PLATELET *vWF* mRNA		
	نرمال(n= ۱۰)	حامل(n= ۲)	بیمار(n= ۲)
mΔCt (*vWF*-GAPDH)	۶/۴ ± ۰/۹	۸/۵ ± ۱/۲	۱۲/۴ ± ۱/۸
mΔΔCt	۰	۲/۱ ± ۰/۳	۶ ± ۰/۹
Mean RATIO	۱/۰۰۰ ± ۰/۱۳	۰/۲۵۰ ± ۰/۰۳۷۵	۰/۰۱۶ ± ۰/۰۰۲۴

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، میزان‌های کم بیان را نیز آشکار می‌سازد. با وجود این در خصوص بررسی بیان ژن *vWF* ، یک روش نوپا است و به تازگی توجه محققین را برای این منظور به خود جلب نموده است.

اولین استفاده از Real-time RT PCR در سنجش بیان فاکتور فون‌ویلبراند توسط کر و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت. البته این مطالعه بر روی نمونه‌های انسانی و یا بیماران نبود بلکه در رده‌های سلولی بهینه‌سازی انجام شد. آن‌ها سنجش جدیدی برای مقدارهای کمی mRNA فاکتور فون‌ویلبراند انسانی با استفاده از سیستم PCR کمی توسعه دادند. این روش اجازه اندازه‌گیری صحیح و دقیق غلظت mRNA در نمونه‌ها را می‌دهد(۷).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

پیرلینک و همکاران در سال ۱۹۹۲ بر روی یک خانواده فون‌ویلبراند 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 اسیدآمینه 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 فون‌ویلبراند، 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).

کابررا و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی جهش جدید دگر معنی(p.Q ۸۹۵ H) C. ۲۶۸۵ G>C در ژن *vWF* که سطح بسیار پایینی از mRNA این ژن را نشان می‌دهد، مطالعه کردند. این گروه با استفاده از بررسی‌های پلی‌مورفیسم تک رشته‌ای(SSCP)، الکتروفورز ژل حساس ترکیبی(CSGE) و توالی‌یابی الگوی غیرنرمال به بررسی و آنالیز ژن *vWF* در سطح mRNA پرداختند. نتایج بررسی های ژنتیکی ژن *vWF* تایید کرد که بیماران برای جهش های(R۸۵۴Q) C. ۲۶۵۱ G>A و (p.Q۸۹۵H) C. ۲۶۸۵ G>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 فون‌ویلبراند 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 mRNA های دیگر جهش‌یافته که تحت تاثیر NMDقرار نگرفتند، پروتئین‌های بریده ایجاد می‌کنند. به علاوه مکانیسم حذف(Decay) درmRNA های 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 توالی یابی محصولات PCRنشان داد که جهش جدید جایگاه پردازش، باعث از بین رفتن اگزون ۵۰ منجر به(premature translation termination codons) PTC در اگزون ۵۱ می‌شود. داده‌ها نشان داد که پروتئین‌های بریده *vWF* به طور غیر محتملی 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 NMDشناخته 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 آلل را اندازه‌گیری نمودند. این سه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

خانواده هم انواعی از جهش‌ها را داشتند که اثر آن‌ها نیز بر روی mRNA متفاوت بود(۱۳).

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که هر جهش اثر خاص خود را بر بیان ژن می‌گذارد. حتی جهش‌هایی که از نظر ماهیت مشابه هستند می‌توانند اثرات مختلفی بر بیان ژن داشته باشند. این که هر جهش چگونه در این فرآیند نقش بازی می‌کند به بررسی‌های گسترده‌تری نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاون پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، جناب آقای دکتر یعقوب فتح‌اللهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 9(4): 391-398

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]

[1]Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Biotechnology 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 platletes 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 hetrozygote 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]