تشخیص بیوشیمیایی و تعیین جهشهای شایع در بیماری گالاکتوزمی

*دکتر فرزانه میرزاجانی
دکترای بیوشیمی
رضا میرفخرائی
کارشناس ارشد ژنتیک
ساسان ساکی
کارشناس ارشد بیوشیمی
دکتر مسعود هوشمند
دکترای ژنتیک پزشکی
کلیه نفرات فوق از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری می‌باشند
ندا نقیب زاده
کارشناس ارشد زیست سلولی ملکولی، دانشگاه آزاد اسلامی – واحد علوم و تحقیقات تهران
فرح نباتی
کارشناس ارشد زیست سلولی ملکولی، دانشگاه خاتم
دکتر الهام طلاچیان
فوق تخصص گوارش اطفال، بیمارستان علی اصغر، دانشگاه علوم پزشکی ایران
* E-mail: farzanm@nrcgeb.ac.ir

چکیده

هدف: گالاکتوزمی از بیماریهای متابولیکی مادرزادی است که با الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب به ارث می‌رسد و در اثر فقدان یاکاهش فعالیت آنزیم گالاکتوز ۱ـ فسفات یوریدیل ترانسفراز (GALT EC 2.7.7.12) ایجاد می‌شود.

هدف از این تحقیق، تشخیص بیوشیمیائی و ملکولی بیماری گالاکتوزمی و تعیین شایع‌ترین موتاسیون ایجاد کننده بیماری بوده است که برای اولین بار در ایران انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تشخیص بیوشیمیایی گالاکتوزمی با استفاده از سنجش کیفی فعالیت آنزیم GALT در گلبولهای قرمز به روش Beutler برای ۱۳۵ خانواده (که توسط پزشکان مشکوک به بیماری گالاکتوزمی بودند) انجام گرفت. سپس خانواده‌هایی که گالاکتوزمی در آنها قطعی شده بود برای جهشهای Q188R، K285N، L195P، X380R و Q169K (معروفترین جهش‌های عامل بیماری) به روش PCR-RFLP بررسی شدند.

یافته‌ها: در مجموع ۱۶ خانواده نقص در آنزیم GALT داشتند. ۸خانواده جهش Q188R را نشان دادند و یک بیمار هتروزیگوت مرکب برای جهش K285N یافت شد. جهشهای L195P، X380R و Q169K در هیچ یک از خانواده‌ها شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: راه‌اندازی تشخیص بیوشیمیائی بیماری گالاکتوزمیا در بیمارستانهای بزرگ اطفال بسیار ضروری و حیاتی است. هم‌چنین بیماری گالاکتوزمیا از نظر ملکولی یک بیماری هتروژن است و جهش‌های ژنتیکی مختلفی می‌تواند در ابتلا به این بیماری موثر باشد که از بین آنها جهش Q188R شایع‌ترین جهش می‌باشد.

کلید واژه‌ها: گالاکتوزمی / ژن *GALT* / موتاسیون *Q188R*

مقدمه

گالاکتوزمی از بیماریهای مادرزادی متابولیکی می‌باشد که در اثر فقدان یا کاهش فعالیت آنزیم GALT ایجاد می‌شود. فراوانی بیماری گالاکتوزمی در دنیا به طور متوسط ۱/۶۲۰۰۰ تولد می‌باشد(۱،۲). هر چند فراوانی آن در ایران هنوز مشخص نشده است. علائم بیماری شامل اسهال، استفراغ، زردی، هپاتومگالی (بزرگی کبد)، عقب ماندگی ذهنی، اختلالات حرکتی و آب مروارید می‌باشد(۵، ۴، ۳). ژن GALT روی بازوی کوتاه کروموزوم ۹، در ناحیه p13 قرار دارد. این ژن شامل ۱۱ اگزون بوده و ۴/۳ Kbp طول دارد. تاکنون بیش از ۱۶۰ تغییر نوکلئوتیدی مختلف در ژن GALT شناسایی شده است که بیشتر آنها بیماری زا هستند(۶). جهش Q188R، شایعترین جهش در جمعیت سفیدپوستان می‌باشد که در اگزون ۶ واقع شده و در اثر تغییر آدنین (A) به گوانین (G) در جایگاه ۵۶۳ ایجاد می‌شود و منجر به جانشینی اسید آمینه Arg به Gln در محل اسید آمینه ۱۸۸ می‌گردد(۷). جهش K285N، دومین جهش شایع در جمعیت سفیدپوستان می‌باشد که در اگزون ۹ قرار داشته و در اثر تغییر گوانین(G) به تیمین (T) در موقعیت ۸۵۵ ایجاد می‌شود(۶). جهشهای دیگر در این ژن کمیاب بوده و فراوانی آنها بسته به موقعیت جغرافیایی متفاوت می‌باشد. پژوهش حاضر با هدف راه‌اندازی تست سنجش کیفی فعالیت آنزیم GALT در گلبولهای قرمز برای اولین بار در ایران به منظور تشخیص قطعی بیماری گالاکتوزمی کلاسیک در مرحله اول و سپس تعیین جهشهای آن در بیماران ایرانی مبتلا به گالاکتوزمی در مرحله دوم انجام گرفت.

روش بررسی

از ۱۳۵ خانواده مراجعه‌کننده مشکوک به بیماری گالاکتوزمی (بیمار، پدر، مادر) حدود ۵ ml خون گرفته شد که ۴/۵ml به صورت محلول در EDTA و ۰/۵ ml در ویالهای هپارینه نگهداری گردید.

سنجش کیفی فعالیت آنزیم GALT در گلبولهای قرمز (RBC) به روش Beutler(۸):

در گلبولهای قرمز خون که به طور طبیعی حاوی آنزیم GALT می‌باشند، این آنزیم می‌تواند واکنشهای آنزیمی تبدیل سوبسترای گالاکتوز ۱ـ فسفات و یوریدین دی فسفو گلوکز به محصول نهایی را انجام دهد که منجر به تبدیل $NADP^+$ به NADPH شده که این ماده در زیر نور ماوراء بنفش خاصیت فلورسانس دارد. در این سنجش خون هپارینه بدست آمده از بیمار، پدر و مادر برای سنجش فعالیت به صورت کیفی به کار رفت. نمونه خون بیمار در مقایسه با خون فرد سالم و کنترل مثبت (فرد بیمار) در معرض واکنشهای بیوشیمیایی قرار گرفته و محصول نهایی در زیر نور ماوراء بنفش مشاهده گردید. در این روش از دو ویال که یکی به عنوان ویال تست (T) حاوی یوریدین دی فسفوگلوکز (۹/۵ mmol/lit)، گالاکتوز ۱ـ فسفات (۲۷ mmol/lit)، $NBDP^+$ (۶/۶ mmol/lit)، EDTA (۰/۵۴ mmol/lit)، ساپونین (۲۵ g/lit)، بافر تریس ـ ۱ استات (۰/۷۵ mmol/lit , PH = ۸) و آب مقطر بود و ویال بلانک که حاوی مواد بالا به جزء یوریدین دی فسفوگلوکز و گالاکتوز ۱ـ فسفات بود استفاده گردید. ۱۰μl نمونه خون بیمار پس از سانتریفوژ و ۳ مرتبه شست‌و شو با محلول سالین (۰/۱۵mmol/lit) به هرکدام از ویالها اضافه گردید و پس از انکوبه کردن در ۳۷ درجه سانتیگراد در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه خارج و با قرار دادن حدود ۱۰ μl نمونه بر روی کاغذ واتمن نتایج مشاهده گردید.

استخراج DNA از خون:

از ۴/۵ ml خون مخلوط با EDTA به روش Salting out، DNA استخراج گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز:

DNA ژنومی نمونه‌های مذکور، با استفاده از پرایمرهایی که برای این جهش‌ها طراحی شده‌اند تکثیر شد. دمای annealing برای پرایمر Q188R، ۶۴ درجه سانتیگراد، برای پرایمر K285N، ۶۰ درجه سانتیگراد برای پرایمر L195P، ۶۵ درجه سانتیگراد برای X380R، ۶۲ درجه سانتیگراد و برای Q169K ۶۷ درجه سانتیگراد بود.

هضم آنزیمی قطعات PCR (RFLP):

برای برش محصولات PCR مربوط به پرایمرهای Q188R، K285N، L195P، X380R و G169K به ترتیب از آنزیمهای، *Rsa*، *paH pa*، *HCai* و *H ph* استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید:

محصولات حاصل از هضم آنزیمی، روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ برده شد، ژل با روش رنگ‌آمیزی نقره رنگ شد و نتایج بررسی گردید.

یافته‌ها

وجود رنگ فلورسنت پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون نشان دهنده طبیعی بودن فرد مورد آزمایش است. در فرد ناقل تا مدت ۱ ساعت هیچ فلورسنتی دیده نمی‌شود اما پس از ۲ ساعت این رنگ قابل مشاهده است. در بیمار گالاکتوزمی تا پایان ۲ ساعت، رنگ فلورسنت مشاهده نمی‌گردد و هیچ تفاوتی بین نمونه شاهد و آزمایش وجود ندارد.

از ۱۳۵ خانواده بیمار که توسط پزشکان برای تشخیص بیماری گالاکتوزمی‌به مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی مراجعه کردند فقط ۱۶ خانواده نقص در آنزیم GALT را نشان دادند. نمونه‌ها ابتدا برای جهش Q188R مورد هضم آنزیمی قرار گرفت در صورت وجود این جهش قطعه bp ۳۴۸ تولید شده به‌کمک PCR تحت تأثیر آنزیم به دو قطعه bp ۱۸۴ و bp ۱۶۴ بریده می‌شود که این جهش در ۸ خانواده مشاهده گردید (تصویر ۱). به طوری که پدر و مادر هتروزیگوت و فرزند آنها هموزیگوت برای این جهش بودند. در مرحله بعد، نمونه‌های DNA خانواده‌های مبتلا به گالاکتوزمی‌برای جهش K285N، PCR شده وتحت هضم آنزیمی قرار گرفت(تصویر ۲). با توجه به اینکـــه در جهش K285N در صورت وجود الل طبیعی، قطعه bp ۱۴۱ تولید شده توسط PCR، تحت تأثیر *RsaI* به دو قطعه ۱۱۷ و bp ۲۴ بریده می‌شود در یک خانواده این جهش مشاهده گردید یعنی قطعه bp ۱۴۱ برش نیافت. قطعات تولید شده bp ۱۹۴ توسط PCR برای جهش L195P در صورت وجود جهش به دو قطعه bp ۱۷۲ و bp ۲۲ بریده می‌شود که در هیچ خانواده‌ای مشاهده نگردید.

همچنین قطعات bp ۱۲۷ حاصله از PCR برای جهش X380R توسط آنزیم *Cai* به دو قطعه bp ۱۰۹ و bp ۱۷ بریده می‌شود که این جهش نیز مشاهده نگردید و نهایتاً این که قطعه تکثیر شده توسط PCR برای جهش Q169K در الل طبیعی تحت تأثیر *H phI* به سه قطعه ۲۰۱، ۵۲ و ۳۰ بریده می‌شود در حالیکه این جهش یافته تحت تأثیر همین آنزیم چهار قطعه ۱۵۴، ۵۲، ۷۴ و ۳۰ تولید می‌کند. جهش فوق نیز در هیچ خانواده‌ای مشاهده نگردید.

بحث

همان طور که ذکر شد، با تشخیص صحیح و به موقع بیماری گالاکتوزمی‌و با رعایت رژیم غذایی فاقد لاکتوز و گالاکتوز، در روزها و حتی ماههای اولیه زندگی نوزاد از ایجاد بسیاری از علائم این بیماری جلوگیری می‌شود. مطالعه حاضر گام مهمی در تشخیص بیوشیمیایی بیماری گالاکتوزمی‌و همچنین تعیین جهشهای شایع این بیماری در جمعیت ایرانی است و این در حالی است که تابحال هیچ مطالعه‌ای در نوزادان بیمار در ایران صورت نپذیرفته است. تاکنون تشخیص بیماری گالاکتوزمی‌با تکیه بر علائم بیماری و تستهای کروماتوگرافی قندهای ادرار انجام می‌شده است مقایسه نتایج حاصله از کروماتوگرافی قندهای ادرار و سنجش آنزیمی بیانگر این مطلب است که عده قابل توجهی از بیماران که توسط تست ادرار مبتلا به گالاکتوزمی تشخیص داده می‌شوند، بیماری به غیر از گالاکتوزمی‌کلاسیک دارند و بی جهت از قند حیاتی گالاکتوز که هم در تولید انرژی و هم در ساختار بسیاری از بخشهای بدن مانند غشاهای سلولی و عصبی نقش دارد، محروم مانده‌اند. لذا ضرورت اجرای این تست در بخشهای اختصاصی تست‌های تشخیص کودکان بسیار محسوس می‌نماید. همان گونه که قبلاً اشاره شد بیشتر از ۱۶۰ تغییر نوکلئوتیدی مختلف در ژن GALT شناخته شده که تعداد کمی از آنها رایج بوده و بیشتر آنها کمیاب هستند. جهش‌های Q188R و K285N در جمعیت سفیدپوستان شایع است. بنابراین در این مطالعه غربالگری به ترتیب برای جهشهای Q188R و K285N به عنوان شایعترین جهشهای سفیدپوستان انجام گرفت. با این که جهش Q188R فراوانترین جهش بیماری گالاکتوزمی‌در دنیا می‌باشد اما فراوانی آن در میان نژادها و قومیتهای مختلف، متفاوت است. این جهش در میان سفیدپوستان اروپایی ۶۴٪ اللهای جهش یافته را تشکیل میدهد. دراین مطالعه فراوانی جهش Q188R در بیماران ایرانی ۵۳٪ تخمین زده می‌شود. جهش K285N کمیاب‌تر از جهش Q188R می‌باشد و فراوانی کلی آن در اروپا ۸٪ بوده اما در اروپای مرکزی فراوانی بالایی دارد(۹). در این مطالعه از ۸ خانواده مبتلا فقط یک خانواده جهش K285N را دارا بود. فرزند بیمار این خانواده یک هتروزیگوت مرکب برای این جهش بود و این جهش را از پدر به ارث برده بود. به هر حال این نکته نیز مشخص شد که جهش K285N نیز در ایران نادر نمی‌باشد اما به فراوانی Q188R نیست.

بدلیل هتروژن بودن بیماری گالاکتوزمی‌می‌بایستی از روشهائی نظیر SSCP و Sequencing برای شناسائی جهش‌های ناشناخته در جمعیت ایرانی استفاده نمود.

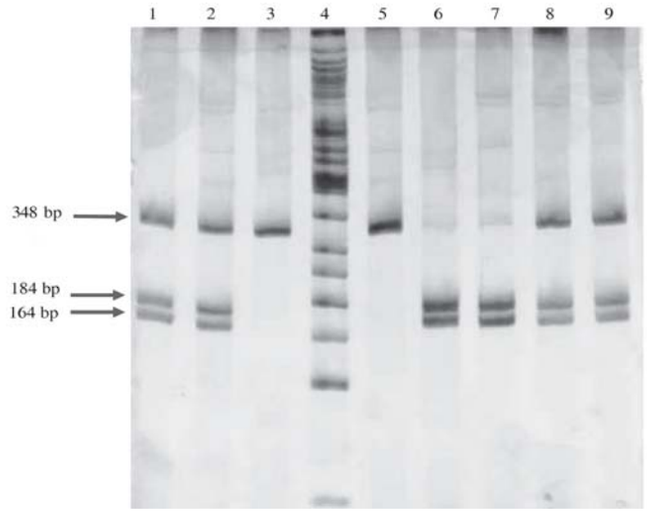
نتیجه‌گیری

راه‌اندازی تشخیص بیوشیمیائی بیماری گالاکتوزمیا در بیمارستانهای بزرگ اطفال بسیار ضروری و حیاتی است. هم‌چنین بیماری گالاکتوزمیا از نظر ملکولی یک بیماری هتروژن است و جهش‌های ژنتیکی مختلفی می‌تواند در ابتلا به این بیماری موثر باشد که از بین آنها جهش Q188R شایع‌ترین جهش می‌باشد.

تشکر و قدردانی

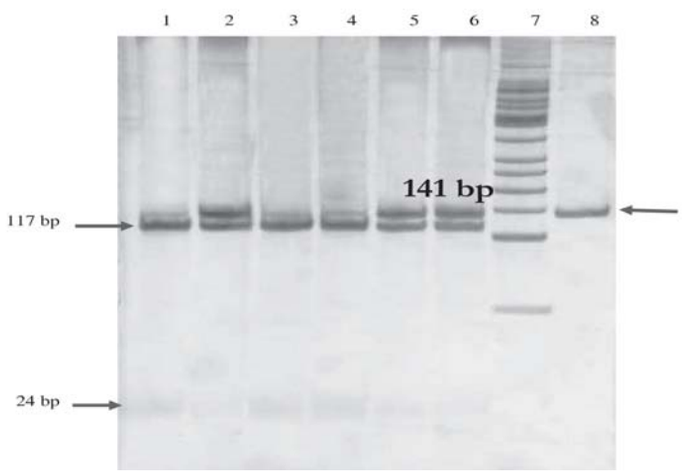
بدینوسیله از شبکه پزشکی مولکولی جهت حمایتهای مالی در تکمیل این طرح تحقیقاتی تقدیر و تشکر می‌گردد.

تصویر۱. الکتروفورز هضم آنزیمی Q188R بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪



Lane 1 & 2 : Carriers
Lane 3 : PCR product
Lane 4 : Size marker (50 bp)
Lane 5 : Negative control
Lane 6 : Positive control
Lane 7 : Homozygote patient
Lane 8 & 9: Patient's parents (carriers)

تصویر۲. الکتروفورز هضم آنزیمی K285N بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪



Lane 1 : Negative control
Lane 2 : Positive control
Lane 3 : Patient's sister
Lane 4 : Patient's mother
Lane 5 : Patient father (heterozygote)
Lane 6 : Compound heterozygote
Lane 7 : Size marker (50 bp)
Lane 8 : PCR products

منابع:

1- Fujimoto A, Okano Y, Miyagi T, Isshiki G, Oura T: Quantitative Beutler test for newborn mass screening of galactosemia using a fluorometric microplate reader. Clin Chem 2000, 46(6): 806-810.

2- Padskarbi T, Reichardt J, Shin YS: Studies of DNA in galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency and the Duart variant in Germany. J Inherited Metab Dis 1994, 17: 149-150.

3- Manga N, Jenkins T, Jackson H, Whittaker DA, Lane AB: The molecular basis of transferase galactosemia in South African Negroids. J Inherited Metab Dis 1999, 22: 37-42.

4- Reichardt JKV, Woo SLC: Molecular basis of galactosemia: Mutations and polymorphism in the gene encoding human galactose-1-phosphate uridyltransferase. Proc Nat Acad Sci USA 1991, 88: 2633-2637.

5-Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C, Brodehl J: Long-term outcome in 134 patients with galactosemia. Eur J Pediatr 1993, 152: 36-43.

6-Holton JB, Walter JH, Tyfield LA: Galactosemia.In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) : The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill Inc. New York; 2000. p. 1553-1587.

7- Petry KG, Reichardt JKV: The fundamental importance of human galactose metabolism: Lessons from genetics and biochemistry. Trends Genet 1998, 14(3): 98-102.

8- Suzuki M, West C, Beutler E: Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan-ethnic population. Hum Genet 2001, 109: 210-215.

9- Kozak L, Francova H, Fajikusova L, Pijackova A, Macku J, Stastna S, et al: Mutaqtion analysis of the GALT gene in Czek and Slovac galactosemia populations: Identification of six novel mutations, including a stop codon mutation (X380R). Hum Mutat 2000, 15(2): 206.