ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸
صفحه ٥٤-٤٧

آنالیز ملکولی جهش‌های شایع ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) در جمعیت ایرانی

شهره زارع‌کاریزی[۱]، سیدمهدی حسینی‌مزینانی*[۲]، جلال کوچمشگی[۳]، سیدمرتضی سیفتی[۴]، سیروس زینلی[۵]، غلامرضا جوادی[۶]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات- تهران
۲- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری- تهران
۳- دکتری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری- تهران
۴- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات- تهران
۵- دانشیار، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مکولی و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر- تهران
۶-استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات- تهران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : hosseini@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۱۴)

چکیده

ماهی بیماری فنیل کتونوریا (PKU) شایع‌ترین اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه و یکی از مهمترین علل شناخته شده عقب ماندگی ذهنی است. فراوانی بیماری PKU در جمعیت ایرانی، یک نفر در هر۳٦۲۷ تولد زنده گزارش شده است، که تقریبا مشابه فراوانی گزارش شده برای جمعیت ترکیه است. هدف از این مطالعه، تعیین فراوانی موتاسیون در ژن PAH عامل بیماری PKU در جمعیت ایرانی است. به این منظور، ۱۵۰ بیمار غیر خویشاوند مبتلا به PKU کلاسیک (۳۰۰ آلل) برای ۱۰ جهش IVS10-11g>a، R261Q، 364LdelG، L333F، R252W، R261X، IVS11nt1g>c، R408W، R408Q و S67P با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. جهش‌های شایع در نمونه‌های مورد مطالعه IVS10-11g>a، R261Q، IVS11nt1g>c و R252W به ترتیب با فراوانی ۲۱/۷٪، ۹٪، ٦/۷٪ و ٤/۷٪ می‌باشد. علاوه بر جهش‌های شایع فوق، ٦ جهش دیگر (R261X(4%)، 364LdelG(3.7%)، L333F(2%) و S67P(0.33%), R408Q, R408W) با فراوانی نسبتا پایین شناسایی شدند. نتایج حاصل از این مطالعات، ابزار مفیدی برای تشخیص ملکولی بیماری PKU و تعیین ناقلین در جمعیت ایرانی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

**فنیل آلانین هیدروکسیلاز،
الگوی موتاسیون،
آنالیز PCR-RFLP RAPD**

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]

مقدمه

هایپر فنیل آلانینمیا (HPA;OMIM 261600)، شایع‌ترین گروه بیماری‌های ارثی ناشی از نقص در متابولیسم اسیدهای آمینه می‌باشد(۱۹). فراوان‌ترین شکل این گروه از بیماری‌ها، فنیل کتونوری (PKU) می‌باشد. فنوتیپ‌های هایپرفنیل آلانینمیا به سه دسته تقسیم می‌شوند:

هایپرفنیل‌آلانینمیایی ملایم (HPAIII یا MHP)، فنیل‌کتونوری ملایم (HPAII یا MPK) و فنیل‌کتونوری کلاسیک (HPAI یا PKU). میزان فنیل آلانین در پلاسمای خون بیمارانی که تحت درمان قرار نگرفته‌اند در هایپر فنیل آلانینمیایی ملایم بین Mμ 600-120 در فنیل‌کتونوری ملایم 600- 1200 Mμ و در بیماران فنیل‌کتونوری کلاسیک بیش از 1200Mμ می‌باشد. بیماران HPA با میزان فنیل‌آلانین پلاسمایی بالای 360 Mμ باید تحت رژیم غذایی محدود به فنیل آلانین قرار گیرند تا از عوارض نوروتوکسیک فنیل آلانین و متابولیت‌های آن در امان بمانند(۵).

علت بیماری PKU با توارث اتوزوم مغلوب، جهش‌هایی است که در ژن کد کننده آنزیم کبدی فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) اتفاق می‌افتد. این آنزیم در حضور کوفاکتور تتراهیدروبیوپترین (BH4) باعث تبدیل L- فنیل‌آلانین به L- تیروزین می‌شود. فقدان یا کارکرد ناقص این آنزیم باعث افزایش میزان فنیل‌آلانین و متابولیت‌های آن از قبیل فنیل‌پیروات و فنیل‌استات در پلاسما و بافت‌ها شده و بدین ترتیب با متابولیسم تیروزین و تریپتوفان تداخل می‌کند (۱۷و۲۲).

بارزترین تظاهرات بالینی این بیماری عقب ماندگی شدید و برگشت ناپذیر ذهنی است. تشخیص سریع بیماری و شروع رژیم درمانی به منظور کنترل سطح فنیل‌آلانین سرم، در پیشگیری از عوارض غیر قابل برگشت مغزی اهمیت ویژه‌ای دارد. برای تشخیص این بیماری در نوزادان تست‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند که تست گاتری یکی از آنها می‌باشد (۱۸،۵).

فراوانی این بیماری در سفید پوستان حدود یک در هر ده هزار نفر در هر تولد زنده است (۲۰،۱۶) ، ولی این میزان از جمعیتی به جمعیت دیگر متفاوت است . بیشترین فراوانی در ترکیه ۱/۲۶۰۰ و کمترین فراوانی در ژاپن ۱/۱۲۰۰۰۰ نفر گزارش شده است (۱۷و۲۱). فراوانی بیماری PKU در جمعیت ایرانی ۱/۳۶۲۷ نفر در هر تولد زنده تخمین زده شده است، که این فراوانی بالا بدلیل میزان بالای ازدواج فامیلی دراین جمعیت است (۱٤).

علاوه بر ازدواج فامیلی، چندین مکانیسم برای فراوانی نسبتا بالای PKU توضیح داده شده است که شامل اثر بنیانگذار/ رانش ژنتیکی، مزیت انتخابی هتروزیگوت‌ها، جبران زاد و ولد، میزان بالای جهش و درگیری چندین جایگاه ژنی که منجر به فنوتیپ‌های مشابه می‌شود. علاوه بر جهش‌های PAH، ژن‌های تغییر دهنده (modifier) و دیگر فاکتورها احتمالا مسئول تنوع در بروز بیماری هستند (۱۸).

ژن کد کننده آنزیم PAH دارای ۱۳ اگزون و به طول حدود 90 Kbp روی بازوی بلند کروموزوم۱۲ قرار دارد و ایجاد یک رونوشت به طول ۲/۵ کیلو باز می‌کند (۱۸،۱٦). مطالعاتی که روی ساختار سه بعدی آنزیم PAH انجام شده، نشان می‌دهد که این آنزیم شامل چهار پروتئین منومر است. هر منومر دارای سه قلمرو ساختاری است، یک قلمرو تنظیمی در انتهای آمین (اسید آمینه‌های شماره ۱٤۲-۱)، قلمرو کاتالیتیکی (اسید آمینه‌های شماره ٤۱۰-۱٤۳)و یک قلمرو تترامریزاسیون در انتهای کربوکسیل (اسید آمینه‌های شماره ٤٥۲-٤۱۱)(۱۷).

تا به حال بیش از ٥۲۰ جهش مختلف در ژن PAH گزارش شده است اکثر این جهش‌ها، جهش نقطه‌ای (٦۱/٤۷٪) و سپس حذف‌های کوچک (۱۳/۳٥٪) هستند که معمولا در نواحی کد کننده و یا نواحی مرزی اگزون- اینترون اتفاق می‌افتد (۱۷). بانک اطلاعاتی http://www.pahdb.mcgill.ca حاوی گزارشات جامع در مورد این بیماری است. بررسی موتاسیون‌ها و پلی‌مورفیسم‌های مرتبط با ژن PAH حاکی از پراکندگی نژادی و جغرافیایی غیر تصادفی این بیماری می‌باشد. به علت تنوع چشمگیر در طیف موتاسیون‌های ژن PAH و میزان شیوع آن در جوامع مختلف تعیین پروفایل موتاسیون‌های PKU در جوامع مختلف اهمیت بالایی دارد. در این مطالعه، ۱۰ جهش عمده در ژن PAH در بیماران ایرانی مورد بررسی قرار گرفته است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]

مواد و روش‌ها

بیماران – تعداد ۱۰۰ بیمار PKU از سراسر کشور و ۵۰ بیمار از یازده مرکز نگهداری افراد دچار ناتوانی ذهنی در استان تهران شناسایی شدند. با اخذ مجوز و معرفی نامه‌های لازم از مراجع ذی‌ربط، نمونه‌گیری از بیماران منتخب در مراکز بهزیستی استان تهران برای نگهداری افراد دچار ناتوانی ذهنی، تحت نظر پزشک انجام گرفت. در هر مرکز ابتدا فهرست کامل توانخواهان تهیه شد و به صورت فایل کامپیوتری در آمد. سپس پرونده‌های توانخواهان مورد مطالعه قرار گرفت. از بین عقب ماندگان ذهنی با کاریوتیپ نرمال که علت عقب ماندگی ذهنی در آنها نامشخص بود، پس از اندازه‌گیری میزان فنیل‌آلانین در سرم به روش گاتری،۵۰ بیمار PKU شناسایی شدند. کلاسیک بودن بیماران مبتلا به PKU پس از اندازه‌گیری میزان فنیل آلانین در سرم به روش HPLC محرز شد. به این ترتیب در مجموع تعداد ۱۵۰ خانواده غیر خویشاوند (۳۰۰ آلل مستقل) که دارای حداقل یک فرزند مبتلا به PKU کلاسیک بودند از سراسر ایران شناسایی و انتخاب شدند.

آنالیز موتاسیون‌ها- بعد از تشخیص قطعی بیماری PKU کلاسیک و گرفتن رضایت‌نامه از والدین بیمار، ۵ سی‌سی خون از بیماران و والدین ایشان گرفته شد. در خانواده‌هایی که بیش از یک فرزند مبتلا به PKU داشتند تنها یک فرزند بیمار مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج DNA از خون محیطی بر اساس روش نمک اشباع انجام شد (۲۰). در مطالعه حاضر، از آنجا که طیف موتاسیون‌های PKU در جمعیت ایرانی مشخص نشده بود، بنابراین از نتایج کشورهای همسایه بخصوص ترکیه (به علت فراوانی بالای بیماری) و کشورهای حوزه دریای مدیترانه استفاده شد و ۱۰موتاسیون شایع در این نواحی جهت بررسی اولیه، مبنای کار قرار گرفت (۱۱، ۲۲). سپس بیماران برای ۱۰ موتاسیون IVS10-11g>a R261Q، L333F، 364LdelG، R252W، R261X ، IVS11nt1g>c، R408W، R408Q و S67P مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تعیین موتاسیون در بیماران از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. بدین منظور، اگزون‌های ۳، ۷، ۱۱ و ۱۲تکثیر یافته (۹) و سپس با آنزیم تحدید خاص، مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند (جدول۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک ،۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، ۰/۲۵ میلی مولار از هر dNTPs، ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ۷-۵ پیکو مول از هر آغازگر و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن، ایران) صورت گرفت. تکثیر در ۳۲ سیکل، دمای۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۲درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت۱ دقیقه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد و طویل سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت گرفت. محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آکریلامید ۱۲٪ برده شده، سپس قطعات حاصل بررسی شدند.

نتایج و بحث

در این مطالعه ۱۵۰ خانواده غیر خویشاوند مبتلا به بیماری PKU کلاسیک مورد مطالعه قرار گرفتند و جهش عامل بیماری ۸۱ خانواده (۵۳٪) با غربالگری برای ۱۰ جهش تعیین گردید (جدول۲). در این میان ۵۱ نفر نسبت به آلل جهش یافته هموزیگوت و ۳۰ نفر هتروزیگوت بودند. حدود ۶۱ درصد از بیماران مورد مطالعه حاصل ازدواج فامیلی بودند. شکل ۱ نمونه‌ای از ژل‌های آکریلامید جهت بررسی برخی از جهش‌های ژن PAH را از طریق تکنیک PCR-RFLP نشان می‌دهد.

متاسفانه در ایران به علت تاخیری که در اجرای برنامه غربالگری PKU در بدو تولد صورت گرفته است، تقریبا همه بیماران مورد بررسی در این مطالعه که در مراکز بهزیستی نگهداری می‌شوند، فنوتیپ عقب ماندگی ذهنی را نشان می‌دادند. در این میان ۷۸٪ آنها دارای عقب ماندگی ذهنی شدید بودند.

براساس این مطالعه فراوانترین جهش در جمعیت ایرانی IVS10-11g>a (21.7%) می‌باشد. این جهش به فاصله ۱۱ نوکلوتید در بالادست مرز اینترون ۱۰ و اگزون۱۱ قرار دارد و یک محل پیرایش مخفی را فعال می‌کند. در مطالعات قبلی که روی جمعیت بیماران ساکن استان تهران انجام شده بود این جهش با فراوانی ۳۲٪ به عنوان جهش اصلی معرفی شده بود (۱). در ترکیه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]

نیز این جهش به عنوان شایع‌ترین جهش گزارش شده است. با توجه به فراوانی بسیار بالای این جهش در دیگر جمعیت‌های حوزه مدیترانه و جنوب اروپا این فرضیه مطرح می‌شود که منشا این جهش از شرق حوزه مدیترانه بوده و از طریق مهاجرت‌های جمعیتی و رانش ژنتیکی به دیگر نقاط گسترش یافته است. این جهش بعد از R408W، شایع‌ترین جهش گزارش شده در ژن PAH در سراسر جهان است (۹،۸و۱۱).

جهش R261Q نیز با فراوانی ۹ درصد جزء شایع‌ترین جهش‌های بیماریزا در اگزون هفت ژن PAH در بیماران مورد بررسی در این مطالعه می‌باشد. در ترکیه نیز این جهش در رتبه دوم فراوانی قرار دارد. بالاترین فراوانی این جهش در سوئد (۳۲ درصد) گزارش شده است (احتمالا منشا این جهش از آنجا بوده است) در فرانسه ۱۷ درصد شیوع دارد که به سمت اسپانیا کم می‌شود (۱۹،۳،۸و۲۳).

جهش IVS11nt1g>c جهش پیرایشی دیگری است که در اولین نوکلوتید اینترون ۱۱ اتفاق می‌افتد و با فراوانی۷ درصد سومین جهش شایع در بیماران مورد مطالعه بود. این جهش بیشتر در بیمارانی مشاهده شد که از نظر جغرافیایی متعلق به منطقه سیستان و بلوچستان و شهرهای مرزی ایران با افغانستان هستند. این جهش در جمعیت هندی نیز گزارش شده است. فراوانی بالای جهش مذکور (۱۷/٤ درصد) در جمعیت برزیل گزارش شده است که علت این امر به این صورت توجیه شده است که جمعیت برزیل مخلوطی از سه جمعیت پرتغال، آلمان و ایتالیا و ۱۰ درصد دیگر جمعیت‌هاست و این جهش جزء جهش‌های شایع در این جمعیت‌ها است (۱۸،۲).

جهش R252W فراوانی ٤/۷ درصد را در جمعیت مورد مطالعه به خود اختصاص داده است. در گزارش دیگری که از مطالعه فراوانی PKU در جمعیت اصفهانی گزارش شده است، فراوانی ١٤/۳ درصد برای این جهش ارائه شده که این اختلاف در نتایج را می‌توان احتمالا به علت تعداد کم نمونه‌های مورد بررسی (۳٤ خانواده) و محدودیت جغرافیایی نمونه‌گیری در اصفهان توجیه کرد (۲٤). این جهش در ترکیه، ایتالیا و اسپانیا نیز گزارش شده است (۱۹،۱۰،۸،۵و۲۲).

جهش R261X با فراوانی٤ درصد در رده بعدی جهش‌های بیماریزا در جمعیت مورد مطالعه قرار دارد. جهش مذکور در جمعیت ترکیه و پاکستان و همچنین ایتالیا، آلمان، نروژ و ژاپن نیز مشاهده شده است (۳،۲و۱۰).

جهش delL364G با فراوانی ۳/۷ درصد در نمونه‌های مورد مطالعه گزارش گردید. گزارشاتی از وجود این جهش در کشورهای رومانی، آلمان و ایتالیا نیز وجود دارد (۳،۲).

جهش L333F و سه جهش R408W، R408Q، S67P به ترتیب با فراوانی ۲ درصد و ۰/۳۳ درصد مشاهده شدند. جهش R408W در بین جهش‌های گزارش شده در ژن PAH در سراسر جهان بالاترین شیوع را دارد و در جمعیت‌های اروپای شرقی بیش از ۵۰ درصد کل آلل‌های جهش یافته را در برمی‌گیرد. این جهش در جمعیت‌های اروپای غربی نیز با فراوانی بالا، اما با الگوی هاپلوتیپی متفاوت از جمعیت اروپای شرقی گزارش شده است (۱۳،٦،۲).

جدول۳ نتایج فراوانی ۱۰جهش شناسایی شده در جریان این تحقیق را با نتایج دیگر جوامع مقایسه می‌کند.

بررسی هاپلوتیپ و همچنین مطالعات تطبیقی بین جمعیت‌ها نشان داده است که بسیاری از شایع‌ترین جهش‌ها عمدتا به صورت تاثیر بنیانگذار (founder effect) در محل ظاهر شده و همراه با مهاجرت جمعیت‌ها گسترش یافته‌اند (۱۱). از طرفی پنج جهش R252W، R261X، R408W، R408Q و R261Q در محل‌های CpG که نقاط داغی برای وقوع جهش می‌باشند، اتفاق می‌افتند.

آنالیز جهش‌های مربوط به بیماری‌های مغلوب، شناسایی ارتباطات ژنتیکی اختصاصی بین جمعیت‌های متفاوت و نقش انسان‌های اولیه را در خزانه ژنی جمعیت‌های جدید امکانپذیر می‌کند. جمع‌آوری اطلاعات مربوط به چند بیماری شایع از قبیل PKU، CF و تالاسمی، با استفاده از تعداد زیاد جهش‌ها، امکان ترسیم جزئیات نقشه مهاجرت و پراکندگی اقوام متفاوت در گذشته را میسر می‌کند. این نتایج نه تنها از لحاظ تاریخی و باستان شناسی جالب است، بلکه این اطلاعات می‌تواند برای غربالگری جهش‌ها

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]

از طریق پیش‌بینی جهش‌های شایع در جمعیت‌ها و حتی برای دیگر بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۱٤).

برای شناسایی جهش‌های عامل PKU دو کاربرد را می‌توان ذکر کرد، شناسایی ناقلین و استفاده از آن به عنوان مارکر در مطالعات ژنتیک جمعیت از لحاظ خویشاوندی جمعیت‌ها، پراکندگی و مهاجرت‌هایی که در طول تاریخ در بین جمعیت‌های مختلف اتفاق افتاده است (۸).

PKU یک بیماری بسیار هتروژن است. در بسیاری از جمعیت‌های مطالعه شده بیش از ۲۰ موتاسیون مرتبط با بیماری PKU شناسایی شده است که فراوانی و پراکنش این جهش‌ها در هر جمعیتی مشخص و متمایز از جمعیت دیگر است. علاوه بر این، در هر جمعیتی چند جهش با فراوانی بسیار بالا دیده می‌شود و بیشتر بیماران دارای موتاسیون‌های شایع هستند (۳). به عنوان مثال جهشهای IVS10-11g>a، R158Q، R261Q، R261X، P281L و L48S حدود ٤۲٪ جهش‌های بیماران PKU در ایتالیا را شامل می‌شوند (۱۱) و در پرتغال ٤٤ درصد بیماران دارای جهش‌های IVS10-11g>a، R261Q، R252W، P281L و I65T هستند (۲). V388M

در تحقیق حاضر چهار جهش IVS10-11 g>a، R261Q، R252W و IVS11nt1g>c با فراوانی حدود ٤۲٪ به عنوان جهش‌های عمده در جمعیت ایرانی شناخته شدند. این تنوع در موتاسیون و پراکنش آن در کل قاره اروپا نیز مشاهده می‌شود. در اروپای شمالی دو موتاسیون شایع IVS12+1G>A و R408W هستند (۱۲،۳)، در حالی که در اروپای جنوبی و حوزه مدیترانه نوع موتاسیون‌ها، پراکنش و حتی الگوی هاپلوتیپ آنها با شمال اروپا کاملا متفاوت است. موتاسیون‌های شایع در این نواحی شامل IVS10-11g>a، E280K، R261Q، L249F , P281L و R252W می‌باشند. در مورد این تنوع و اختلاف در شمال و جنوب اروپا این فرضیه مطرح است که رشته کوه‌های آلپ به عنوان مانع طبیعی از تداخل جمعیت‌ها در دو طرف رشته کوه جلوگیری کرده است (۱۳و۲٦). از طرفی، برخی جهش‌های شایع در یک جمعیت، در جمعیت‌های دیگر نادر بوده یا اصلا دیده نمی‌شود. به عنوان مثال، جهش R243Q با فراوانی بیش از ۳۰٪ شایع‌ترین جهش در شرق آسیا می‌باشد که با فراوانی کمتر از ۰/۰۰۲ در اسپانیا گزارش شده است. موتاسیون‌ها در کشورهای شرق آسیا (ژاپن، کره و چین) بسیار شبیه به هم هستند که بعد از واگرایی نژادی بین سفیدپوستان و نژاد زرد اتفاق افتاده است (۲۱و۲٤).

از آنجاییکه مطالعات جامعی در مورد بیماری PKU در کشورهای همسایه وجود ندارد، تحقیق حاضر که مشخص کننده اساس ملکولی بیماری PKU در جمعیت ایرانی است، می‌تواند برای کنترل بیماری مذکور در کشورهای همسایه نیز بسیارمفید باشد. در عراق تنها جهش S110L، در کویت IVS4+5G>T و IVS2+5G>C و در پاکستان T186-W187>TFS گزارش شده است (http://www.pahdb.mcgill.ca).

برنامه جامع پیشگیری و رژیم درمانی بیماران PKU هم اکنون با همکاری سازمان بهزیستی، انجمن PKU و وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی کشور در حال اجراست. اطلاعات حاصل از این مطالعات منجر به تسهیل انتخاب اولویت‌ها به منظور غربالگری جهش‌ها در این طرح کشوری شده و بدین ترتیب باعث صرفه جویی در هزینه‌ها و زمان می‌گردد. علاوه بر این شناسایی موتاسیون‌ها منجر به تسهیل ارزیابی فنوتیپ‌های متابولیکی، تشخیص دقیق و اتخاذ روش رژیم درمانی بهینه می‌شود.

این اطلاعات همچنین جهت تشخیص ناقلین و مشاوره‌های پیش از بارداری برای خواهر و برادران بیمار مبتلا به PKU و تشخیص قبل از تولد در مراحل اولیه جنینی کاربرد دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]

جدول۱- تشخیص ۱۰ موتاسیون ژن PAH با استفاده از تکنیک PCR-RFLP

جهش	جایگاه	آنزیم برشی	وجه تمایز آ لل ها		
			طول محصول PCR (جفت باز)	نرمال (جفت باز)	جهش یافته (جفت باز)
IVS10-11g>a	اینترون ۱۱	Dde I	۳۵۷	۳۵۷	۲۶۱+۹۶
IVS11nt1g>c	اینترون ۱۱	Dde I	۳۵۷	۳۵۷	۲۴۴+۱۱۳
R261Q	اگزون ۷	Hinf I	۷۷۷	۱۲۳+۲۶۳+۳۹۱	۲۶۳+۵۱۴
R261X	اگزون ۷	Dde I	۷۷۷	۶+۲۷+۳۷+۴۵ ۱۱۰+۱۵۰+۴۰۲	۱۳۷+۱۱۹+۲۹
R252W	اگزون ۷	Ava I	۷۷۷	۴۲۱+۳۵۶	۷۷۷
R408W	اگزون ۱۲	Sty I	۶۱۸	۱۷۷+۴۴۲	۱۷۷+۲۱۳+۲۲۹
R408Q	اگزون ۱۲	Hae III	۶۱۸	۱۱۵+۲۱۸+۲۸۶	۲۸۶+۳۳۳
L333F	اگزون ۱۰	Ban II	۲۹۰	۴۲+۱۰۷+۱۴۱	۱۴۱+۱۴۹
364Ldel G	اگزون ۱۱	Hind III	۳۵۷	۱۳۱+۲۲۶	۳۵۷
S67P	اگزون ۳	Xba I	۴۶۳	۱۱۵+۳۴۸	۴۶۳

جدول۲- فراوانی ۱۰ موتاسیون ژن PAH در ۱۵۰ بیمار ایرانی مبتلا به PKU

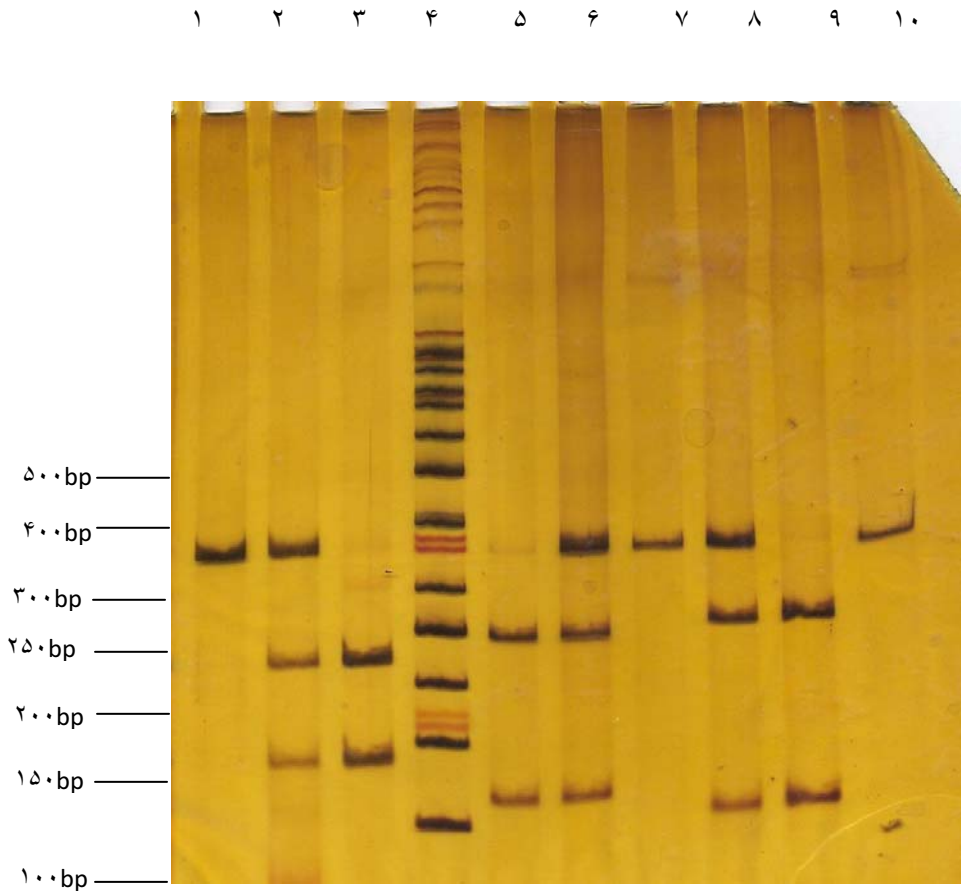
جهش	تعداد الل‌ها	فراوانی نسبی(٪)	تعداد هموزیگوت	تعداد هتروزیگوت
IVS10-11g>a	۶۵	۲۱/۷	۲۶	۱۳
R261Q	۲۷	۹	۹	۹
IVS11nt1g>c	۲۰	۶/۷	۸	۴
R252W	۱۴	۴/۷	۵	۴
R261X	۱۲	۴	۴	۴
364del G	۱۱	۳/۷	۵	۱
L333F	۶	۲	۱	۴
R408W	۱	۰/۳۳	–	۱
R408Q	۱	۰/۳۳	–	۱
S67P	۱	۰.۳۳	–	۱
سایر جهش ها	۱۴۲	۴۷	–	–

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]

جدول۳- مقایسه فراوانی ۱۰ موتاسیون ژن PAH در جمعیت بیماران ایرانی با دیگر جوامع دنیا

	Iran	Turkey (2)	Italy (10)	Spain (5,18)	Portugal (8)	Germany (11,1)	Czech (14)	Slovakia (14)	Brazil (17)
IVS10-11	۲۱/۷	۲۵	۱۵/۱	۱۴/۷	۱۰/۸		۲/۶		۱۷
R261Q	۹	۶/۸	۸/۵	۴	۱۰/۴			۷/۱	۱۲/۲
IVS11nt1	۶/۷					۳/۳			۱۷/۴
R252W	۴/۷	۱/۱	۲/۸	۰/۸	۴	۵	۲/۶	۲	۶/۵
R261X	۴		۳/۸	۲/۸	۰/۴				۹/۸
Del364G	۳/۷								
L333F	۲								
R408W	۰/۳۳			۲/۸	۰/۹	۲۶/۷	۵۵/۳	۴۵/۹	۲/۴
R408Q	۰/۳۳		۰/۹	۰/۸					
S67P	۰/۳۳								



شکل۱. نمونه‌ای از ژل آکریل‌آمید ۱۲ درصد جهت بررسی برخی از جهش‌های شایع ژن PAH به روش PCR-RFLP . چاهک ۱ تا ۳ مربوط به بررسی جهش LdelG۳۶۴ (چاهک۱: فرد هموزیگوت بیمار، چاهک۲: هتروزیگوت و چاهک۳ فرد نرمال برای این جهش)، چاهک ۵ تا ۷ مربوط به جهش G>A IVS10-11 (چاهک ۵: هموزیگوت بیمار، چاهک۶: هتروزیگوت و چاهک۷ فرد نرمال برای این جهش)، چاهک ۸ تا ۱۰ مربوط به بررسی جهش IVS11+1G>C (چاهک ۸: هتروزیگوت، چاهک۹: هموزیگوت بیمار و چاهک۱۰ فرد نرمال برای این جهش)، چاهک۴: سایز مارکر 50 bp (Fermentas).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]

منابع

۱- سید مهدی حسینی مزینانی. بررسی موتاسیون های ژن **PAH** عامل بیماری **PKU** در جمعیت ایرانی(طرح مصوب، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) .شماره ثبت پروژه: ۳۶۸۶.

2-Acosta A, Silva W Jr, Carvalho T, Gomes M, Zago M (2001) Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria.
Hum Mutat, 17(2):122-30.

3-Aulehla-Scholz C, Heilbronner H (2003) Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. Hum Mutat, 21(4):399-400

4-Bercovich D, Elimelech A, Yardeni T, Korem S, Zlotogora J, Gal N, Goldstein N, Vilensky B, Segev R, Avraham S, Loewenthal R, Schwartz G, Anikster Y (2008) A mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in the Israeli population.Ann Hum Genet,72(Pt 3):305-9.

5-Daniele A and et al. Five human phenylalanine hydroxylase proteins identified in mild hyperphenylalaninemia patients are disease-causing variants (2008) Biochimica et Biophysica Acta, 1782:378-384.

6- Desviat LR, Pérez B, Ugarte M (1993) Phenylketonuria in Spain: RFLP haplotypes and linked mutations.Hum Genet, 1; 92(3):254-8.

7- Dianzani I, Camaschella C, Saglio G, Ferrero GB, Ramus S, Ponzone A, Cotton RG (1993) Molecular analysis of contiguous exons of the phenylalanine hydroxylase gene: identification of a new PKU mutation. J Med Genet. 30(3):228-31.

8- Effat LK, Essawi ML, Abd El Hamid MS, Hawari N, Gad YZ (2008) Screening for six Mediterranean mutations in 90 Egyptian patients with phenylketonuria. Bratisl Lek Listy,109(1):17-9.

9-Effat L, Kuzmin A, Kasem N, Meguid NA, Kotb S, Eisensmith RC, Temtamy SA, Rushdi S, Woo S, el-Awady M (1999) Haplotypes and mutations of the PAH locus in Egyptian families with PKU.Eur J Hum Genet,7(2):259-62

10-Guldberg P and et al. (1993) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: Implications for diagnosis of hyperphenlalaninemia in Southern Europe. Human Molecular Genetics, 2:10, 1703-1707.

11-GuzzettaVand and et al. (1997) Phenylketonuria in Italy: Distinct distribution pattern of three mutations of the phenylalanine hydroxylase gene. J. Inher. Metab. Dis, 20:619– 6 2 4

12-Hennermann J.B, Vetter B, Wolf C, Windt E (2000) Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia in Eastern Germany: A characteristic molecular profile and 15 novel mutations. Hum Mutat, 15:255-260

13- Kádasi L, Poláková H, Feráková E, Hudecová S, Bohusová T, Szomolayová I, Strnová J, Hruskovic I, Moschonas NK, Ferák V (1995) PKU in Slovakia: mutation screening and haplotype analysis.Hum Genet,95(1):112-4.

14-Koochmeshgi J, Bagheri A, Hosseini-Mazinani SM (2002) Incidence of phenylketonuria in Iran estimated from consanguineous marriages. Inherit Metab Dis. 25(1):80-1.

15- Kozák L, Kuhrová V, Blazková M, Romano V, Fajkusová L, Dvoráková D, Pijácková A (1995) Phenylketonuria mutations and their relation to RFLP haplotypes at the PAH locus in Czech PKU families.Hum Genet,96(4):472-6.

16-Lee DH, Koo SK, Lee KS, Yeon YJ, Oh HJ, Kim SW, Lee SJ, Kim SS, Lee JE, Jo I, Jung SC (2004) The molecular basis of phenylketonuria in Koreans. J Hum Genet, 49(11):617-21. Epub 2004 Oct 16.

17- Lee YW, Lee DH, Kim ND, Lee ST, Ahn JY, Choi TY, Lee YK, Kim SH, Kim JW, Ki CS (2008) Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. Exp Mol Med; 40(5):533-40.

18-Luiz Carlos Santana da Silva,a,b Tiago Santos Carvalho,a,b Fernanda Britto da Silva,b Liana Morari,b ^AAngela Aguirres Fachel,b Ricardo Pires,b L_ılia Farret Refosco,b Robert J. Desnick,c Roberto Giugliani,a,b,d, and Maria Luiza Saraiva Pereiraa,b (2003) Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil.
Molecular Genetics and Metabolism, 79:17–24

19-Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Estivill X, Milà M (1999) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation.
Hum Genet, 105(5):468-73.

20- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.Nucleic Acids Res. 11;16 (3):1215.

21-Okano Y, Asada M, Kang Y, Nishi Y, Hase Y, Oura T, Isshiki G (1998) Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients.Hum Genet,103(5):613-8.

22- Ozalp I, Coşkun T, Tokatli A, Kalkanoğlu HS, Dursun A, Tokol S, Köksal G, Ozgüc M, Köse R (2001) Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future.Turk J Pediatr;43(2):97-101.

23- Pérez B, Desviat LR, Ugarte M (1997) Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers.Am J Hum Genet,60(1):95-102.

24- Song F, Qu YJ, Zhang T, Jin YW, Wang H, Zheng XY (2005) Phenylketonuria mutations in Northern China.Mol Genet Metab,86 Suppl 1:S107-18.

25-Vallian S, Barahimi E, Moeini H (2003) Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in Isfahan. Mutat Res, 15; 526(1-2):45-52.

26-Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin NC (1997) Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland.Hum Genet,100(2):189-94.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.5.9]