

بررسی فراوانی پلی مورفیسم های C3435T و C1236T ژن MDR1 و اثر بر بیان این ژن در افراد ایرانی

سارا سامانیان^۱، فروزنده محجوبی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد و استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

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

(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

واژه‌های کلیدی

پاسخ دارویی،

چندشکلی،

ARMS

Real time RT-PCR

RFLP

ژن *MDR1* بر روی کروموزوم 7q21 دارای ۲۸ گزون بوده و کدکننده نوعی فسفوگلیکو پروتئین است. این ژن بسیار پلی مورفیک است و تاکنون بیش از ۵۰ چندشکلی در آن گزارش شده است. به نظر میرسد چندشکلیهای این ژن بر سطح بیان آن و پاسخ افراد به داروها تأثیر گذار است. در این مطالعه فراوانی دو چندشکلی C1236T و C3435T در ۱۲۰ فرد ایرانی توسط تکنیک PCR-RFLP و ARMS-PCR و بیان این ژن با تکنیک Real time RT-PCR و همچنین ارتباط این چندشکلیها با سطح بیان ژن مذکور بررسی شد. فراوانی آللی C3435T برای آلل طبیعی (C) برابر با ۴۳ درصد و برای آلل جهش یافته (T) برابر با ۵۷ درصد بود و فراوانی ژنوتیپ های 3435TT, 3435CT و 3435CC به ترتیب ۳۵، ۴۴ و ۲۱ درصد محاسبه شد. فراوانی آللی C1236T برای آلل طبیعی (C) برابر با ۴۴ درصد و برای آلل جهش یافته (T) برابر با ۵۶ درصد بود و فراوانی ژنوتیپ های 1236TT, 1236CT و 1236CC به ترتیب ۲۴، ۶۳ و ۱۳ درصد محاسبه شد. نتایج این تحقیق نشان داد که چندشکلیهای مطالعه شده بر روی بیان این ژن تأثیر معناداری ندارند. بنا بر این احتمالاً این چندشکلی ها تأثیری بر پاسخ به درمان از طریق تغییر میزان بیان این ژن در بیماریهای مختلف نظیر سرطانها را ندارند.

مقدمه

یکی از علل ایجاد فنوتیپ مقاومت دارویی عدم دست یابی مولکول های دارویی به سلول های هدف خود می باشد به طوری که بیماران نسبت به داروهای مختلف که مکانیسم های اثر متفاوتی دارند مقاوم می شوند. یکی از موانع داروها در دست یابی به سلول هدف، پروتئین های غشایی از جمله *MDR1* هستند. این پروتئین ها که جزء خانواده پروتئین های ناقل متصل شونده به ATP میباشد از ۱۲۸۰ اسید آمینه تشکیل شده و دارای دو دومین درون غشایی متشکل از ۶ آلفا هلیکس و دو دومین درون سلولی متصل شونده به ATP است (Tang et al. 2002; Sakaeda 2005). پروتئین *MDR1* سبب انتقال سوبستراهای مختلفی می شود که داروهای با ساختمان و عملکرد متفاوت نیز جزء آنها می باشند (Sauna et al. 2007).

است (Turgut et al. 2007) این آغازگرها یک توالی نوکلئوتیدی به طول ۲۴۸ bp را در اگزون ۲۶ تکثیر می کنند، مرحله بعدی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *Mbol* (Fermentas) و با غلظت ۲U بود که نمونه در دمای ۳۷°C به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. محصولات حاصل از هضم آنزیمی عبارتند از: یک قطعه ۲۳۸bp برای ژنوتیپ TT، قطعات ۱۷۲ bp و ۶۰ bp برای ژنوتیپ CC و قطعات ۲۳۸ bp، ۱۷۰ bp و ۶۰ bp برای ژنوتیپ CT.

تجزیه آماری

از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ برای ثبت داده ها و آنالیز آماری استفاده شد نرمال بودن داده ها با استفاده از تست Kolmogorov-Smirnov تعیین شد تفاوت بین گروهها با استفاده از تست Independent-Samples T Test محاسبه شد. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و $P < 0.05$ معنی دار بود.

روش ARMS

جهت تشخیص چندشکلی C1236T در اگزون ۱۲ از توالی آغازگرهای ذکر شده در جدول ۱ استفاده شده است. این آغازگرها ابتدا یک قطعه حاوی چندشکلی مورد نظر را به طول ۴۴۴ bp در اگزون ۱۲ تکثیر و سپس چنانچه ژنوتیپ CC باشد قطعات ۴۴۴ bp و ۲۰۰ bp، برای CT قطعات ۴۴۴ bp و ۲۰۰ bp و برای TT قطعات ۴۴۴ bp و ۲۹۷ bp تکثیر خواهند یافت.

بررسی میزان بیان ژن

RNA نمونه ها توسط کیت Tripure isolation reagent استخراج و ساخت cDNA توسط کیت Revert AID First Strand cDNA synthesis kit انجام شد. از کیت Light-Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I برای بررسی بیان ژنها توسط دستگاه light cycler استفاده شده است و ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع انتخاب شد. سری رقت برای رسم منحنی استاندارد با ضریب ۱/۲ تهیه شد. توالی آغازگرهای به کار رفته در جدول ۱ نشان داده شده است (Au et al. 2008)

طیف وسیعی از داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی در این دسته قرار می گیرند و لذا این پروتئین ناقل در ایجاد مقاومت دارویی در سلول های سرطانی دخیل می باشد (Kimchi-Sarfaty et al. 2007). این پروتئین به طور طبیعی در بسیاری از بافت های بدن انسان مثل مغز، کلیه، کبد، ماهیچه ها و روده بیان می شود و به نظر می رسد در محافظت این بافت ها در برابر مواد سمی دخیل است (Schwab et al. 2003). *MDR1* (P-gp) یک گلیکوپروتئین با وزن حدود ۱۷۰ kDa است که بوسیله ژن *MDR1* رمز می شود، این ژن با ۲۸ اگزون و طول ۱۲۰ kb بر روی کروموزوم ۷ (7q21.12) قرار دارد. تاکنون بیش از ۵۰ چندشکلی (SNP) در این ژن گزارش شده که در حدود ۲۰ مورد از آنها موتاسیون های خاموش هستند (van der Deen et al. 2005). چندشکلی C1236T در اگزون ۱۲ و C3435T در اگزون ۲۶ بیش از سایر چندشکلی ها مورد توجه قرار گرفته اند و در جمعیت های گوناگون مورد بررسی واقع شده اند (Kroetz et al. 2003; Jamrozziak et al. 2004; Xhemo et al. 2007). به نظر می رسد این چندشکلیها بر روی میزان بیان ژن *MDR1* و نیز پاسخ دارویی تاثیر گذار است. مطالعات گوناگون بر روی فراوانی این چندشکلیها در جمعیت های مختلف نتایج متفاوتی را در پی داشته است. هدف این مطالعه بررسی فراوانی این دو چندشکلی در جمعیت ایران و اثر این چندشکلیها بر بیان ژن مذکور است.

مواد و روشها

در این تحقیق از ۱۲۰ فرد داوطلب بعد از اخذ رضایت نامه کتبی آگاهانه برای شرکت در مطالعه، نمونه خون محیطی گرفته شد. جمعیت مورد مطالعه از ۶۴ زن و ۵۶ مرد با میانگین سنی 30 ± 10 تشکیل یافته است

استخراج DNA ژنومی

DNA نمونه های خون محیطی توسط کیت Diatom DNA Prep 200 (Isogene Lab ltd Russ) استخراج شد.

روش RFLP

توالی آغازگرهای به کار رفته جهت انجام PCR و تشخیص چندشکلی C3435T در اگزون ۲۶ در جدول ۱ نشان داده شده

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در مراحل مختلف کار

طول قطعات تکثیری	
C3435T آغازگرهای روش RFLP برای چندشکلی	
5'-GCTGGTCCTGAAGTTGATCTGTGAAC-3'	3435TT=238 bp
5'-ACATTAGGCAGTGACTCGATGAAGGCA-3'	3435CC=172,60 bp
	3435CT=238,170,60 bp
طول قطعات تکثیری	
C1236T آغازگرهای روش ARMS برای چندشکلی	
1236F: 5'. TTCGAAGAGTGGGCACAAACCAGATAA. 3'	1236CC= 444,200 bp
1236R: 5'. GATGTGCAATGTGACTGCTGATCACC. 3'	1236CT = 444.297 200 bp
1236C: 5'.CTCACTCGTCCTGGTAGATCTTGAAGTGC. 3'	1236TT=444,297 bp
1236T: 5'. CCACTCTGCACCTTCAGGTTCCGA. 3'	
طول قطعات تکثیری	
آغازگرهای استفاده شده جهت بررسی بیان ژن	
MDR1:	
5'-TAGACACTTTATGCAAACATTTCAA-3'	MDR1 = 308 bp
5'-TGACATTTATTCAAAGTTAAAAGC-3'	
GAPDH:	
5'-TGGGTGGCAGTGATGGCATGG-3'	
5'-GCAGGGGGGAGCCAAAAGGGT-3'	GAPDH: 219 bp

نتایج و بحث

نمونه خون ۱۲۰ فرد ایرانی جهت بررسی دو چندشکلی در ژن *MDR1* مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده در روش RFLP-PCR در ابتدا یک توالی نوکلئوتیدی به طول ۲۴۸ رادراگزون ۲۶ تکثیر می کنند و محصولات حاصل از هضم آنزیم *Mbo1* عبارتند از: یک قطعه ۲۳۸ bp برای ژنوتیپ TT، قطعات ۱۷۲ bp و ۶۰ bp برای ژنوتیپ CC و قطعات ۲۳۸ bp، ۱۷۰ bp و ۶۰ bp برای ژنوتیپ CT (شکل ۱). فراوانی آللی C3435T برای آلل طبیعی (C) برابر با ۴۳ درصد و برای آلل جهش یافته (T) برابر با ۵۷ درصد بود و فراوانی ژنوتیپ های 3435CC، 3435CT، 3435TT به ترتیب ۳۵، ۴۴ و ۲۱ درصد محاسبه شد.

فراوانی آللی C1236T برای آلل طبیعی (C) برابر با ۴۴ درصد و برای آلل جهش یافته (T) برابر با ۵۶ درصد بود و فراوانی ژنوتیپ های 1236CC، 1236CT، 1236TT به ترتیب ۲۴، ۶۳ و ۱۳ درصد محاسبه شد.

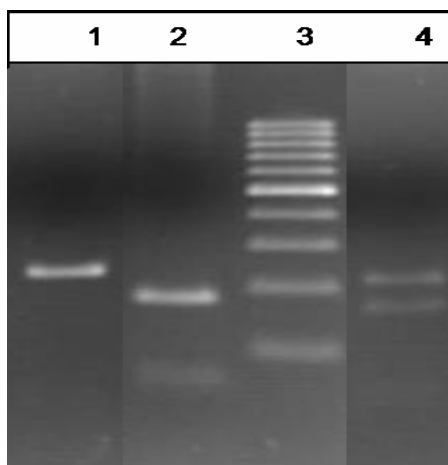
به منظور دست یابی به میزان راندمان PCR از رسم منحنی استاندارد استفاده شد هر چه شیب منحنی به عدد ۳/۳۲- نزدیک شود نشان دهنده راندمان نزدیک به ۱۰۰ درصد می باشد. شیب نمودار استاندارد برای ژن *MDR1* برابر با ۳/۲- و برای ژن *GAPDH* برابر با ۳/۳- است (شکل ۲ و ۳).

سپس به منظور بررسی اثر دو چندشکلی فوق بر روی بیان ژن *MDR1*، بیان در نمونه خون افراد بررسی شد ولی بیان در بین افراد دارای ژنوتیپ های مختلف تفاوت معناداری نشان نداد. ($P>0.05$) (شکل ۴). ژن *MDR1* یکی از اعضای خانواده پروتئین های غشایی وابسته به ATP می باشد، افزایش بیان این ژن در ایجاد فنوتیپ مقاومت دارویی در سرطان های گوناگون، تا کنون به طور گسترده ای بررسی و مورد تایید قرار گرفته است. به همین دلیل مطالعه ی علت و یا مکانیزم موجد تغییرات بیانی این ژن مورد توجه بسیاری از محققین می باشد یکی از مکانیسم های عامل در تغییرات بیانی وجود پلی مورفیسم هایی در توالی DNA

نداشت. موتاسیون C1236T نیز یک موتاسیون خاموش است که سبب تبدیل یک کدون اسید آمینه گلیسین به کدون دیگر همین اسید آمینه می شود (Kimchi-Sarfaty et al. 2007). این چندشکلی نیز در پاسخ افراد مختلف به داروها تاثیرگذار می باشد (Xing et al. 2006). مطالعات بررسی اثر این چندشکلی بر روی بیان ژن *MDR1* نتایج مختلف و ضد و نقیضی را به همراه داشته است (Bosch et al. 2006; Aarnoudse et al. 2006; Wasilewska et al. 2007). بطور خلاصه ما در این مطالعه به بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپ های چندشکلیهای ژن *MDR1* و اثر آنها بر روی بیان این ژن پرداختیم. هر چند که فراوانی پلی مورفیسم های C3435T و C1236T در جمعیت ایرانی مورد مطالعه متفاوت بودند اما تاثیری بر میزان بیان این ژن نداشتند و بطور محتمل تاثیری در پاسخ به درمان بیماران ندارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به انجام رسیده است. از تمامی افرادی که همکاری صمیمانه ای در انجام این تحقیق داشتند تشکر و قدردانی می نمایم.



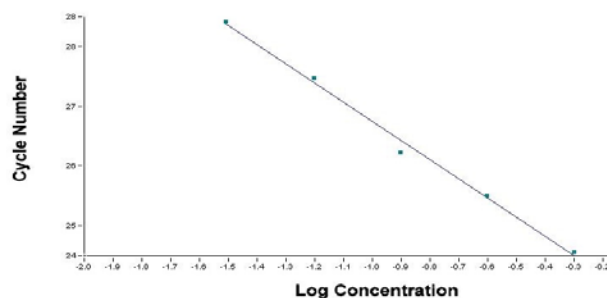
شکل ۱- روش RFLP، DNA استخراج شده از خون افراد تحت مطالعه پس از تکثیر با آغازگرهای مناسب توسط آنزیم *MboI* برش داده شدند که نتایج آن در این شکل قابل مشاهده است. چاهک ۱) ژنوتیپ TT (قطعه ۱۲۳۸ bp)، چاهک ۲) ژنوتیپ CC (قطعات ۱۷۲ و ۶۰)، چاهک ۳) مارکر اندازه گیری ۱۰۰ bp و چاهک ۴) ژنوتیپ CT (قطعات ۲۳۸ و ۱۷۰ و ۶۰).

کدکننده است (Tang et al. 2002). با توجه به این که ژن *MDR1* بسیار پلی مورفیک است وجود پلی مورفیسم هایی چون C3435T و C1236T بر روی بیان این ژن و در نتیجه بر روی سرانجام داروهایی که سوسترای *MDR1* می باشند نیز تاثیر گذار می باشد (Hoffmeyer et al. 2000; Komar et al. 2007). موتاسیون C3435T که در آگرون ۲۶ قرار دارد و اولین بار در سال ۲۰۰۰ گزارش شد یک موتاسیون خاموش است (Ameyaw et al. 2001) با این وجود تاثیر آن بر روی بیان ژن *MDR1* در مطالعات متعدد گزارش (gümüş-akay et al. 2008) و فراوانی این چندشکلی در جمعیت های کشورهای مختلف بررسی شده است. فراوانی ژنوتیپ های 3435TT در ۱۲۰ فرد داوطلب در جمعیت ایران به ترتیب ۳۵، ۴۴ و ۲۱ درصد محاسبه شد که مقادیری بسیار مشابه با گزارش Ameyaw et al. (2001) بر روی ۱۰۰ فرد پرتغالی می باشد (CC=22%, CT=42%, TT=36%) (Larsen et al. 2007). در مطالعه ای که بر روی ۱۰۰ فرد ترکیه با تکنیک RFLP-PCR انجام شد فراوانی ژنوتیپ های CC3435 و CT3435، TT3435 به ترتیب ۲۹، ۵۱ و ۲۰ درصد مشاهده شد (gümüş-akay et al. 2008). در مطالعه حاضر، بیان ژن *MDR1* با ژنوتیپ فرد در موقعیت C3435T وابستگی نداشت. در مطالعه ای بر روی تعدادی فرد سالم نتایجی مطابق با نتایج مشاهده شده در جمعیت ایرانی گزارش شده است به این صورت که بیان در افراد با ژنوتیپ های 3435CT، 3435CC و 3435TT با یکدیگر تفاوت چندانی ندارد. (Siegmond et al. 2002) در مطالعه ای بر روی جمعیت افراد ژاپن افزایش بیان ژن *MDR1* در افراد دارای ژنوتیپ TT نسبت به افراد CT و CC گزارش شده است (Tsutomu et al. 2002) در مطالعات دیگر افراد دارای ژنوتیپ CC در موقعیت ۳۴۳۵ بیان بالاتری از *MDR1* را در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر گزارش نموده اند (Hoffmeyer et al. 2000).

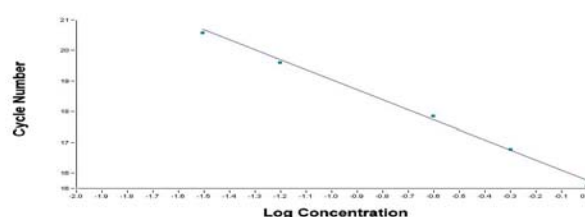
فراوانی ژنوتیپ های 1236TT، 1236CT و 1236CC در جمعیت متشکل از ۱۲۰ ایرانی به ترتیب ۲۴، ۶۳ و ۱۳ درصد محاسبه شد. که مشابه با فراوانی این چندشکلی در جمعیت ترکیه و یا چکسلواکی می باشد (Pechandova et al. 2006) بیان ژن *MDR1* در افراد ایرانی با ژنوتیپ های مختلف آنها تفاوت معناداری

منابع

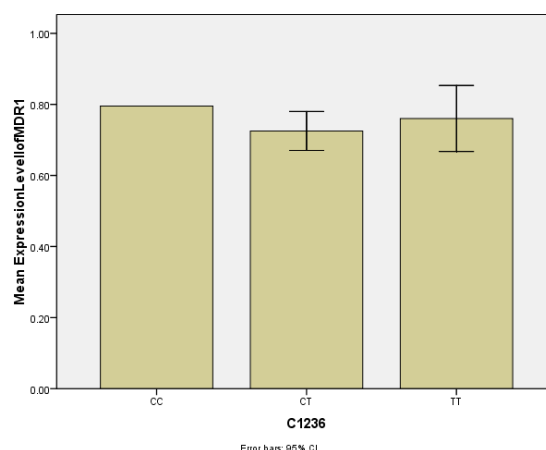
- Aarnoudse AL, Van Schaik RH, Dieleman J, Molokhia M, *MDR1* gene polymorphisms are associated with neuropsychiatric adverse effects of mefloquine. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 367-374.
- Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan G, O. et al: *MDR1* Pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 217-221
- Au TL, Butler and JR Egan et al. Changes in skeletal muscle expression of AQP1 and AQP4 in dystrophinopathy and dysferlinopathy patients, *Acta Neuropathol* 116 2008 pp. 235-246
- Bosch TM, Huitema AD, Doodeman VD, Jansen R, et al. Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5786-5793.
- gümüş-akay, et al: Genotype and allele frequencies of *MDR1* gene C1236T polymorphism in a Turkish population, *Genet Mol Res* 2008; 7: 1193-1199.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473-3478.
- Jamrozik K, Mlynarski W, Balcerzak E, Mistygacz M, et al. Functional C3435T polymorphism of *MDR1* gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2004; 72: 314-321.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, et al. A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525-528
- Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, et al. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 29-39.
- Komar AA. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1075-1080.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (*MDR1*, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 481-494.
- Larsen UL, Hyldahl Olesen L, Guldberg Nyvold C, Eriksen J, et al. Human intestinal P-glycoprotein activity estimated by the model substrate digoxin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 2007; 67: 123-134.
- Pechandova K, Buzkova H, Slanar O, Perlik F. Polymorphisms of the *MDR1* gene in the Czech population. *Folia Biol* 2006; 52: 184-189.
- Sakaeda T. *MDR1* genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab. Pharmacokinet* 2005; 20: 391-414.
- Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 9609-9612.



شکل ۲- نمودار استاندارد ژن *MDR1* نمونه ها به ترتیب با ضریب ۱/۲ رقیق شده اند و شیب منحنی استاندارد ۳,۲- است در حالیکه میزان $r=1$ است که نشان دهنده بازده نزدیک به ۱۰۰ درصد برای واکنش Real Time RT-PCR است.



شکل ۳- منحنی استاندارد ژن *GAPDH* نمونه ها به ترتیب با ضریب ۱/۲ رقیق شده اند شیب منحنی $slope=3/3$ و $r=1$ است که نشان دهنده بازده نزدیک به ۱۰۰ درصد برای واکنش Real Time RT-PCR است.



شکل ۴- متوسط بیان ژن *MDR1* در ژنوتیپ های مختلف چندشکلی C1236T که با وجود این که بیان ژن مذکور در افراد با ژنوتیپ CC از افراد CT و TT بالاتر است اما از لحاظ آماری این افزایش بیان با ژنوتیپ افراد تحت مطالعه وابستگی معنا داری ندارد.

Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003) Genetic polymorphisms of the human *MDR1* drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 285-307

Siegmund W, Masuda S, Satio H, et al. (2002) The effect of the human *MDR1* genotype on the expression duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinol, *Clin Phar Mol Ther* 72:572-583

Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, et al. (2002) Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the *MDR1* multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*; 12: 437-450.

Van der Deen M, et al. (2005) ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res*. 6: p. 59

Wasilewska A, Zalewski G, Chyczewski L, Zoch-Zwierz W (2007). *MDR-1* gene polymorphisms and clinical course of steroid-responsive nephrotic syndrome in children. *Pediatr. Nephrol*; 22: 44-51.

Xhemo E, Fajac A, Boire JY and Levy P (2007) MDRView: a visualization of the polymorphisms of *MDR1*(*ABCB1*) gene in breast cancer. *Conf. Proc. IEEE Eng Med Biol Soc.*: 4592-4594

Xing Q, Gao R, Li H, Feng G, et al. (2006) Polymorphisms of the *ABCB1* gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics*; 7: 987-993