ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۲۶- ۲۲۱

Downloaded from mg.genetics.ir at 20:26 +0430 on Thursday August 5th 2021

بررسی فراوانی پلی مورفیسم های C3435T و C1236T ژن *MDR*1 و اثر بر بیان این ژن در افراد ایرانی

سارا سامانیان[1]، فروزنده محجوبی[2]*

۱و۲- 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

ژن *MDR*1 بر روی کروموزوم 7q21 دارای ۲۸ اگزون بوده و کدکننده نوعی فسفوگلیکو پروتئین است. این ژن بسیارپلی مرفیک است و تاکنون بیش از ۵۰ چندشکلی در آن گزارش شده است. به نظرمیرسد چندشکلیهای این ژن بر سطح بیان آن و پاسخ افراد به داروها تاثیر گذار است. در این مطالعه فراوانی دو چندشکلیC1236T و C3435T در۱۲۰ 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 ۴۳درصد 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 ۴۴درصد و برای آلل جهش یافته (T) برابر با ۵۶ درصد بود و فراوانی ژنوتیپ های1236TT، 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 تاثیر معناداری ندارند. بنا برا ین احتمالا این چندشکلی ها تاثیری بر پاسخ به درمان از طریق تغییر میزان بیان این ژن در بیماریهای مختلف نظیر سرطانها را ندارند.

واژه‌های کلیدی
پاسخ دارویی،
چندشکلی،
ARMS،
Real time RT-PCR،
RFLP.

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 اثرمتفاوتی دارند مقاوم می شوند. یکی از موانع داروها در دست یابی به سلول هدف، پروتئین های غشایی از جمله *MDR*1 هستند. این پروتئین‌ها 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 *MDR*1 سبب انتقال سوبستراهای مختلفی می شود که داروهای با ساختمان و عملکرد متفاوت نیز جزء آنها می باشند (Sauna et al. 2007).

Downloaded from mg.genetics.ir at 20:26 +0430 on Thursday August 5th 2021

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).*MDR*1 (P-gp) یک گلیکوپروتئین با وزن حدود ۱۷۰ kDa است که بوسیله ژن *MDR*1 رمز می شود, این ژن با ۲۸ اگزون و طول ۱۲۰ kb برروی کروموزوم۷ (7q21.12) قراردارد. تاکنون بیش از ۵۰ چندشکلی (SNP) دراین ژن گزارش شده که در حدود ۲۰ مورد از آنها موتاسیون های خاموش هستند (van der Deen et al. 2005). چندشکلیC1236T 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 ; Jamroziak et al. 2004; Xhemo et al. 2007). به نظر می رسد این چندشکلیها بر روی میزان بیان ژن *MDR*1 و نیز پاسخ دارویی تاثیرگذار 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 درمطالعه, نمونه خون محیطی گرفته شد. جمعیت مورد مطالعه از ۶۴ زن و ۵۶ مرد با میانگین سنی ۱۰±۳۰ 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 وتشخیص چندشکلی C3435T در اگزون ۲۶ درجدول ۱ نشان داده شده است (Turgut et al. 2007) این آغازگرها یک توالی نوکلئوتیدی به طول ۲۴۸ bp را دراگزون ۲۶ تکثیر می کنند، مرحله بعدی هضم آنزیمی با استفاده ازآنزیم *Mbo*I (Fermentas) و با غلظت ۲U بود که نمونه دردمای°C ۳۷ به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. محصولات حاصل ازهضم آنزیمی عبارتنداز: یک قطعه ۲۳۸bp برای ژنوتیپ TT ، قطعات ۱۷۲ bp و۶۰ bp برای ژنوتیپ CC و قطعات ۲۳۸ bp ، ۱۷۰ bp و۶۰ bp برای ژنوتیپ CT.

تجزیه آماری

از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ برای ثبت داده ها و آنالیزآماری استفاده شد نرمال بودن داده ها بااستفاده از تست Kolmogorov-Smirnov تعیین شد تفاوت بین گروهها با استفاده از تست Independent-Samples T Test محاسبه شد. حدود اطمینان درتمامی آزمایشات ۹۵ درصد درنظرگرفته شد و P<۰/۰۵ معنی دار بود.

روش ARMS

جهت تشخیص چندشکلیC1236T در اگزون ۱۲ از توالی آغازگرهای ذکرشده 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 چنان چه ژنوتیپ CC باشد قطعات ۴۴۴ bp و۲۰۰ bp، برای CT قطعات ۴۴۴bp، ۲۰۰ bp و ۲۹۷ 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)

Downloaded from mg.genetics.ir at 20:26 +0430 on Thursday August 5th 2021

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در مراحل مختلف کار

آغازگرهای روش RFLP برای چندشکلی C3435T	طول قطعات تکثیری
5′-GCTGGTCCTGAAGTTGATCTGTGAAC -3′	3435TT=238 bp
5′-ACATTAGGCAGTGACTCGATGAAGGCA -3′	3435CC=172,60 bp
	3435CT=238,170,60 bp
آغازگرهای روش ARMS برای چندشکلی C1236T	**طول قطعات تکثیری**
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′	
آغازگرهای استفاده شده جهت بررسی بیان ژن	**طول قطعات تکثیری**
*MDR*1:	
5′-TAGACACTTTATGCAAACATTTCAA-3′	*MDR*1 = 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 *MDR*1 مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده در روش RFLP-PCR در ابتدا یک توالی نوکلئوتیدی به طول bp ۲۴۸ رادراگزون ۲۶ تکثیر می کنند و محصولات حاصل ازهضم آنزیم *Mbo1* عبارتنداز: یک قطعه bp ۲۳۸ برای ژنوتیپ TT ،قطعات bp ۱۷۲ وbp ۶۰ برای ژنوتیپ CC وقطعات bp ۲۳۸ ، bp ۱۷۰ وbp ۶۰ برای ژنوتیپ CT (شکل۱). 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 ۴۴درصد و برای آلل جهش یافته (T) برابر با ۵۶ درصد بود و فراوانی ژنوتیپ های 1236CC، 1236CT وTT1236 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 شودنشان دهنده راندمان نزدیک به ۱۰۰درصد میباشد. شیب نمودار استاندارد برای ژن *MDR*1 برابر با ۳/۲- و برای ژن GAPDH برابر با ۳/۳- است (شکل۲و۳).

سپس به منظور بررسی اثر دو چندشکلی فوق بر روی بیان ژن *MDR*1، بیان در نمونه خون افراد بررسی شد ولی بیان در بین افراد دارای ژنوتیپ های مختلف تفاوت معناداری نشان نداد. (P>0.05) (شکل۴). ژن *MDR*1 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 میباشد یکی از مکانیسم های عامل در تغییرات بیانی وجود پلی مورفیسم هایی در توالی DNA

Downloaded from mg.genetics.ir at 20:26 +0430 on Thursday August 5th 2021

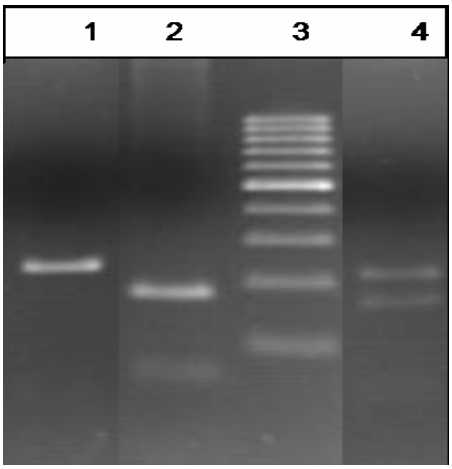
کدکننده است (Tang et al. 2002). با توجه به این که ژن *MDR1* بسیار پلی مرفیک است وجود پلی‌مورفیسم هایی چون C3435T و C1236T بر روی بیان این ژن و در نتیجه بر روی سرانجام داروهایی که سوبسترای *MDR1* می‌باشند نیز تاثیر گذار می باشند (Hoffmeyer et al. 2000; Komar et al. 2007).

موتاسیون C3435T که در اگزون ۲۶ قرار دارد و اولین باردر 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 پرتقالی می باشد (CC=22%, CT=42%, TT=36%) (Larsen et al. 2007). در مطالعه ای که بر روی ۱۰۰ فرد در ترکیه با تکنیک RFLP-PCR انجام شد فراوانی ژنوتیپ های CC3435 وCT3435، 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 3435CC،3435CT 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 های1236TT، 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 ey al. 2006) بیان ژن *MDR1* در افراد ایرانی با ژنوتیپ های مختلف آنها تفاوت معناداری 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 ونقیضی 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 اثرآنها بر روی بیان این ژن پرداختیم. هر چند که فراوانی پلی مرفیسم 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.

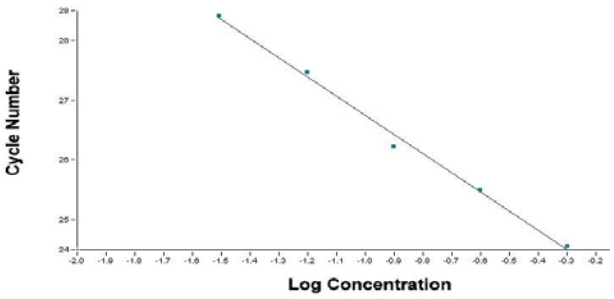
تشکر و قدردانی

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 نماییم.

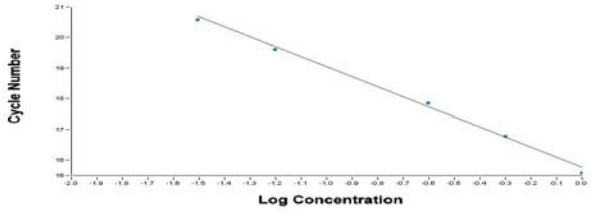


شکل۱- روش RFLP، DNA استخراج شده از خون افراد تحت مطالعه پس از تکثیر با آغازگرهای مناسب توسط آنزیم *Mbo*I برش داده شدند که نتایج آن در این شکل قابل مشاهده است, چاهک ۱) ژنوتیپ TT (قطعه bp ۲۳۸)، چاهک ۲) ژنوتیپ CC (قطعات bp ۱۷۲ و ۶۰)، چاهک ۳) مارکر اندازه گیریbp ۱۰۰ و چاهک۴) ژنوتیپ CT (قطعات bp ۲۳۸ و۱۷۰ و۶۰)

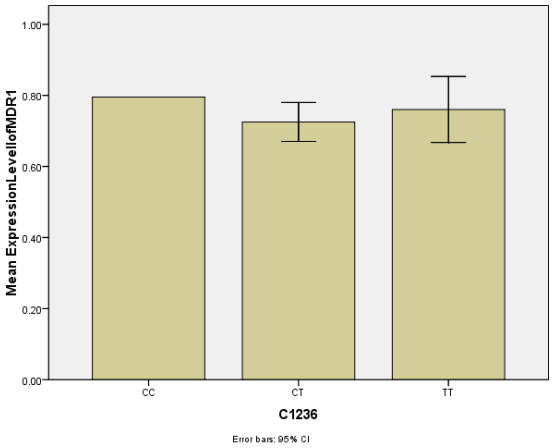
Downloaded from mg.genetics.ir at 20:26 +0430 on Thursday August 5th 2021



شکل۲- نموار استاندارد ژن *MDR*1، 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.



شکل۳- منحنی استاندارد ژن *GAPDH*. نمونه ها به ترتیب با ضریب ۱/۲ رقیق شده اند شیب منحنی slope=۳/۳ و r=1 است که نشان دهنده بازده نزدیک به ۱۰۰ درصد برای واکنش Real Time RT-PCR است.



شکل۴- متوسط بیان ژن *MDR*1 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.

منابع

Aarnoudse AL, Van Schaik RH, Dieleman J, Molokhia M, *MDR*1 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: *MDR*1 Pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced be 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 *MDR*1 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.

Jamroziak K, Mlynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, et al. Functional C3435T polymorphism of *MDR*1 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 *MDR*1 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 (*MDR*1, multidrug resistance transporter) gene. Pharmacogenetics 2003; 13: 481-494.

Larsen UL, Hyldahl Olesen L, Guldborg 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 *MDR*1 gene in the Czech population. Folia Biol 2006; 52: 184-189.

Sakaeda T. *MDR*1 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.

Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003) Genetic polymorphisms of the human *MDR*1 drug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol 43: 285-307

Siegmond W, Masuda S, Satio H, et al. (2002) The effect of the human *MDR*1 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 *MDR*1 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 *MDR*1(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

Downloaded from mg.genetics.ir at 20:26 +0430 on Thursday August 5th 2021