مقاله تحقیقی

بررسی جهش ها در ژن *NF1* در بیماران ایرانی مبتلا به نوروفیبروماتوز نوع ۱

نیلوفر یاوری [۱]، فهیمه باغبانی آرانی [*۱]، سحر هنرمند جهرمی [۲]

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۷ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۶/۲۳

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۵- شماره ۴ - زمستان ۱۳۹۹

چکیده

نوروفیبروماتوز نوعی بیماری پوستی-عصبی است و با بروز تومورهایی در اطراف اعصاب مشخص می‌گردد. ژن *NF1* حدود ۳۵۰ کیلو جفت باز طول داشته و شامل ۶۰ اگزون است و پروتئینی به نام نوروفیبرومین را کد می‌کند. به دلیل اندازه بزرگ ژن *NF1* و نیز تنوع انواع جهش‌ها، شناسایی جهش‌های این ژن چالشی بزرگ است. بنابراین، در این تحقیق به بررسی جهش-های ژن *NF1* در ۱۰ بیمار ایرانی مبتلا به نوروفیبروماتوز نوع ۱ پرداخته شد. پس از خونگیری و استخراج DNA ژنومی ۱۵ اگزون از ژن *NF1* با استفاده از تکنیک PCR تکثیر و توالی‌یابی انجام شد. در نهایت قطعات توالی‌یابی شده با توالی اگزون‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مقایسه گردید و جهش‌های موجود شناسایی شد. نتایج نشان داد که در اگزون ۴۰ جهش c.5811-5811 delT، در اگزون ۳۵ جهش c.4537 C>T و در اگزون‌های ۴۱-۴۲ جهش c.6259-6260 insA وجود دارد. نتایج این مطالعه ضمن گزارش جهش‌های رخداده در بیماران ایرانی می‌تواند در مشاوره ژنتیکی و بررسی‌های بیشتر این بیماری در ایران کمک کننده باشد.

واژه های کلیدی: بیماری NF1، اگزون های غیرشایع، نوروفیبرومین، توالی یابی DNA

مقدمه

نوروفیبروماتوز شایع‌ترین بیماری در بین سندرم‌های پوستی-عصبی است و شامل حداقل ۲ اختلال اتوزومال غالب می‌باشد که با بروز تومورهایی در اطراف اعصاب مشخص می‌گردد (۱). ویژگی مشخص‌کننده نوروفیبروماتوز نوع ۱، نوروفیبروما است که نوعی تومور غلاف عصبی است و در اعصاب نخاعی، محیطی یا جمجمه ای ایجاد می‌شود (۲). میانگین شیوع جهانی نوروفیبروماتوز نوع ۱، یک مورد در هر ۳۰۰۰ نفر است، اگرچه برآوردهای شیوع به بیماری در کشورها متفاوت است (۳).

NF1 ژن مسئول نوروفیبروماتوزیس تیپ ۱ (NF1) است و نوروفیبرومین را رمزگذاری می‌کند (۲). این ژن طولی برابر با ۲۸۲ kb داشته و شامل ۶۰ اگزون (۵۷ ساختاری و ۳ اگزون متناوب متصل به هم) می‌باشد و یکی از بزرگترین ژن‌های انسانی است. بررسی توالی آمینواسیدی نوروفیبرومین نشان داده است که دمین کوچک ۳۰۰ اسید آمینه‌ای نوروفیبرومین ساختاری شبیه به پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی منفی پروتوآنکوژن RAS دارد. این پروتئین ها، فعال‌کننده‌ی GTPase هستند و RAS را از حالت فعال متصل به GTP به حالت غیرفعال متصل به GDP تبدیل می‌کنند. به این ترتیب، عدم بیان

نوروفیبرومین، همانطور که در نوروفیبروماتوز نوع ۱ دیده می‌شود، باعث افزایش رشد و زنده‌ماندن سلول‌ها از طریق افزایش فعالیت RAS می‌شود (۴،۵).

با توجه به بزرگی ژن NF1 و عدم وجود نقاط داغ جهش در آن شناخت جهش در بیماران یک چالش در مشاوره ژنتیک می‌باشد. در این راستا مطالعات مختلفی در جمعیت‌های متفاوت انجام شده است. برای مثال Xu و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشاهده کردند که در جمعیت ۳۷۸ نفری مورد مطالعه در اگزون‌های ۴، ۹، ۳۹، ۴۱-۴۲، ۴۵-۴۶ و ۴۷ جهش‌های مختلفی وجود دارد (۶). Kang و همکاران در سال ۲۰۱۹، ابتدا ۵۷ اگزون ژن *NF1* را در ۳۸۹ بیمار مبتلا توالی‌یابی کردند و اگزون‌های ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۸-۲۰، ۲۹ و ۳۰ و انواع مختلفی از جهش‌ها را در این اگزون‌ها شناسایی کردند (۷). فوجی و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰ با مطالعه روی ۱۱ خانواده ایرانی توانست انواع جهش‌های حذف، جهش اضافه شدن یک نوکلئوتید و جهش ناحیه splice site را گزارش کنند (۸). اگرچه، چند مطالعه در ایران روی این بیماری صورت پذیرفته، اما لزوم مطالعات بیشتر در جمعیت ایرانی به منظور تقویت نتایج قبلی نیاز می باشد. لذا در این تحقیق با توجه به فراوانی جهش‌ها در مطالعات قبلی احتمال حضور جهش در اگزون‌های ۴، ۹، ۳۵، ۳۶، ۳۹، ۴۰-۴۷، ۴۹ و ۵۲ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی نمونه‌گیری از ۱۰ بیمار مبتلا به NF1 پس از تایید بیماری توسط پزشک متخصص و با تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه با شناسه IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.030 انجام شد. در مواردی که فرد مبتلا کودک بود از والدین کودک رضایت-نامه کتبی اخذ شد. سپس از هر یک از بیماران با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتر خون وریدی گرفته شد. سپس با استفاده از روش رسوب نمک (Salting out) DNA توتال از نمونه‌های خون استخراج گردید. با استفاده از دستگاه نانودراپ، غلظت و خلوص DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت و نسبت A_{260}/A_{280} برای DNA استخراج شده بررسی شد. کیفیت DNA استخراج شده نیز با استفاده از الکتروفورز روی ژل ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی 20µl برای اگزون‌های ۴، ۹، ۳۵، ۳۶، ۳۹، ۴۰-۴۷، ۴۹ و ۵۲ در نمونه‌ی DNA استخراج شده از بیماران انجام شد. بدین منظور 40ng/µl از DNA استخراج شده از نمونه خون بیمار، 10pmol/µl از پرایمرهای Forward و Reverseو 8µl مسترمیکس PCR (سیناژن، ایران) با غلظت 2X به لوله‌های واکنش اضافه شد. برای تکثیر DNA، دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس انجام شد. سپس برنامه دمایی ذکر شده در ۳۰ چرخه انجام شد: دناتوراسیون DNA در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و سنتز DNA در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه. در مرحله‌ی آخر، مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انکوبه شد تا سنتز رشته‌ها بطور کامل انجام شود. محصول واکنش PCR با استفاده از روش الکتروفورز آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر اگزون‌های مورد مطالعه در این تحقیق در جدول ۱ لیست شدند.

پس از حصول اطمینان از تکثیر صحیح DNA مورد نظر و کیفیت آن با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز، DNA تکثیر شده برای توالی‌یابی ارسال شدند. توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas نسخه ۸ مورد مطالعه قرار گرفت سپس با استفاده از نرم‌افزار آنلاین EMBOSS Water و روش pairwise alignment توالی مربوط به اگزون‌های هر یک از بیماران با توالی مرجع مقایسه شدند و جهش‌های موجود شناسایی شدند و موقعیت هر جهش در مولکول cDNA ثبت گردید.

نتایج

پس از استخراج موفق DNA و انجام PCR محصولات جهت بررسی کیفیت تکثیر الکتروفورز شدند و پس از تایید قطعات اگزونی تکثیر شده با استفاده از PCR توالی‌یابی انجام شد و توالی بدست آمده از هر اگزون با توالی اگزون مرجع مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج جدول ۲ نشان داد که بیمار شماره ۱ در اگزون ۳۵ جهش c.4537 C>T، بیمار شماره ۲ در اگزون ۴۰ جهش‌های c.5811-5811 delT ، بیمار شماره ۷ در اگزون ۴۱-۴۲

جهش c.6259-6260 insA وجود دارد. در بقیه بیماران در اگزون‌های مورد بررسی هیچ جهشی مشاهده نشد.

جدول ۱ - لیست پرایمرها و توالی های آنها که برای تکثیر اگزون‌های موردنظر در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

ردیف	شماره اگزون	توالی پرایمرها ´۳→´۵	طول قطعه تکثیر شده
۱	۴	P F: TGGTGTGTATGTAAGGTGTTC P R: CAGCCTCCAGAGAAATGAGTTT	506bp
۲	۹	P F: AAGAAGTTCAGAAAACAGCTTG P R: GCTAACATTAAAGTTCTGACTC	550bp
۳	۳۵	P F: AAGTAGACATGGTCCTGAGGTC P R: GAAGACTATGAGGAAAGATGT	398bp
۴	۳۶	P F: TACCCTTTAGAATGCCTGTTGC P R: GGGAGCATATAGCAGGGTAAAT	386bp
۵	۳۹	P F: TGTCATAGGAGCCTCACAGTGC P R: CTGAAGGAACTCTGAAGGAACT	620bp
۶	۴۰	P F: AAGTGTCTTTTCTCCAGGCCTG P R: CTTCAGAAAGCATGTAGACACT	474bp
۷	۴۱-۴۲	P F: TTCATATTGATTAGGCTGTTCC P R: TTGACCATGTTCAGTTACCAGC	945bp
۸	۴۳	P F: TTGACCATGTTCAGTTACCAGC P R: CATGGACTGTGTTATTGGTAAC	567bp
۹	۴۴-۴۵	P F: CATGGACTGTGTTATTGGTAAC P R: CTCTTTTGCTAAGCAGGTACACT	706bp
۱۰	۴۶	P F: ATGTTCCTGAATTCATTCCGAG P R: GTTCTCAAGCGCTTGTAAGTTTT	405bp
۱۱	۴۷	P F: GGTAATTTAGGAAGATAAGCTGC P R: GTGAGTATATTTCCTTACCAGC	397bp
۱۲	۴۹	P F: TGGCTATTCTTGGAAAGTAGGAG P R: CACAGTCTAGTCCTTTAGTGGT	401bp
۱۳	۵۲	P F: AGCTTTCTTTGAGTCCTCAGTG P R: CCAGCCATTTCTTAGAATCTTTAG	341bp

جدول ۲- جهش های شناسایی شده در بیماران مبتلا به NF1 در بیماران ایرانی.

جهش	EXON	کد بیمار
c.4537 C>T	EXON 35	بیمار ۱
c.5811-5811 delT	EXON 40	بیمار ۲
c.6259-6260 insA	EXON 41-42	بیمار ۷

بحث

ژن *NF1* ۲۸۲ هزار جفت باز طول داشته و شامل ۵۷ اگزون پشت سرهم و سه اگزون با پیرایش متناوب است (۹). با توجه به اندازه بزرگ ژن *NF1*، عدم وجود نقاط داغ جهش، طیف گسترده‌ای از جهش‌های احتمالی و حضور ژن‌های کاذب، شناسایی جهش در این ژن کار مشکل و پیچیده ای است (۱۰). از طرف دیگر تحقیقات نشان داده است که اکثر جهش‌های موجود در ژن *NF1* از نوع جهش‌های با مقیاس کوچک هستند و معمولاً یک یا چند نوکلئوتید را درگیر می‌کنند (۱۰)، اما جهش در مقیاس وسیع‌تر نیز در ژن *NF1* رخ می‌دهد که با فنوتیپ‌های شدیدتر بیماری همراه است (۸).

در این مطالعه به منظور بررسی جهش‌های موجود در ۱۰ بیمار غیرمرتبط نوروفیبروماتوز تیپ ۱، ۱۵ اگزون از ژن *NF1*، با استفاده از روش توالی‌یابی بررسی گردید و

جهش‌های یافت شده در اگزون ۳۵ از نوع جابجایی یک نوکلئوتید در اگزون ۴۰ از نوع جهش حذف یک نوکلئوتید و در اگزون ۹ جهش از نوع اضافه شدن نوکلئوتید می‌باشد. در تحقیقات مختلف روش‌های متفاوتی برای شناسایی جهش در ژن *NF1* مورد استفاده قرار گرفته است که هر روش حساسیت متفاوتی نسبت به روش دیگر در شناسایی جهش دارد، اما مشخصاً روش توالی‌یابی به دلیل بررسی تک‌تک نوکلئوتیدها و مقایسه‌ی آنها با نوکلئوتیدهای مرجع روش بسیار حساس و دقیق برای شناسایی جهش می‌باشد (۱۱).

در تحقیقات انجام شده تا بحال تنوع جهش در اگزون‌های ژن *NF1* مشاهده شده است. Xu و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی جامع روی ۳۷۸ بیمار در آمریکا پرداختند و طیف وسیعی از جهش‌ها (۱۸۱ نوع جهش مختلف) را با توزیع متفاوت در اگزون‌های متفاوت مشاهده کردند. از جمله جهش c.4537 C>T که در مطالعه حاضر نیز دیده شد. این میزان تنوع جهش خود بیانگر نبود نقاط داغ جهش در این ژن و تنوع گسترده جهش‌های این بیماری می‌باشد (۶). مطالعه دیگری نیز به بررسی ۵۵ بیمار NF1 در سال ۲۰۱۹ در کشور چین پرداخت و نتایج نشان داد که ۵۳ درصد واریانت‌ها جهش جدید بودند (۱۲). در ایران نیز روی ۱۱ خانواده ایرانی مطالعه شد که انواع جهش‌های مختلف گزارش گردید که هیچکدام از آنها با مطالعه حاضر مشابه نبود (۸) که خود دلیلی به نبود نقاط داغ بویژه در جمعیت ایرانی است. در مجموع مطالعات نشان می‌دهد که توزیع جهش‌ها بصورت تصادفی در تمام نقاط ژن NF1 وجود دارد و مسئله وقوع جهش‌های جدید و بروز بیماری NF1 را بیش از پیش آشکار نمود. از طرفی با توجه به بزرگی ژن *NF1* به نظر می‌رسد تعیین اگزون‌های شایع جهش‌پذیر در ژن *NF1* کار بسیار مشکلی باشد، زیرا اولاً در جوامع مختلف ممکن است جهش در اگزونی شایع باشد و در جامعه‌ای دیگر جهش‌های آن اگزون بسیار نادر باشد. کما اینکه در تحقیقات انجام شده در بالا به برخی از این تنوع اگزونی در جوامع مختلف اشاره شد و همچنین حداقل ۵۰ درصد از جهش‌های جدید از گروه جهش‌های تک‌گیر هستند و این جهش‌ها می‌توانند در هر اگزونی رخ دهند و نیز تحقیقات نشان داده است که نقاط داغ جهش در ژن *NF1* وجود ندارد.

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که برای شناسایی جهش‌ها در ژن *NF1* یکی از بهترین روش‌ها توالی‌یابی اگزون‌ها و مقایسه توالی آنها با توالی مرجع می‌باشد، زیرا روشی بسیار دقیق و سریع برای شناسایی جهش می‌باشد. به دلیل تک‌گیر بودن و جدید بودن درصد زیادی از جهش‌ها در ژن *NF1* می‌توان گفت که توزیع جهش در این ژن در جمعیت این مطالعه هم پراکنده است. هر چند با توجه به فراوانی بالاتر جهش در اگزون‌های ۴۲-۴۱ می‌تواند همچنان این اگزون‌ها را جزء اگزون‌های نسبتا شایع دانست. بنابراین نتایج این تحقیق می‌تواند به محققان بالینی برای مطالعه محدودتر و هدفمند اگزون‌ها در شناسایی جهش در بیماران کمک کند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا برای حمایت از این مطالعه تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع مورد استفاده

1. Habif, T., 2015. Clinical Dermatology, 6th Edition: Elsevier Health Sciences.
2. Gutmann, D.H., Wood, D.L., Collins, F.S., 1991. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(21): 9658-9662.
3. Uusitalo, E., Leppävirta, J., Koffert, A., Suominen, S., Vahtera, J., Vahlberg, T., 2015. Incidence and mortality of neurofibromatosis: a total population study in Finland. J Invest Dermatol 135(3): 904-906.
4. Ranalli, M., Boni, A., Caroleo, A.M., Del Baldo, G., Rinelli, M., Agolini, E., Rossi, S., Miele, E., Colafati, G.S., Boccuto. L., Alessi, I., De Ioris, M.A., Cacchione, A., Capolino, R., Carai, A., Vennarini, S., Mastronuzzi, A., 2021. Molecular characterization of medulloblastoma in a patient with neurofibromatosis type 1: Case report and literature review. Diagnostics 11(4): 647.
5. Xu, W., Yang, X., Hu, X., Li, S., 2014. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and

integrated analyses of the mutations that modulate splicing. Int J Mol Med 34(1): 53-60.
6. Kang, E., Kim, Y.M., Seo, G.H., 2020. Phenotype categorization of neurofibromatosis type I and correlation to NF1 mutation types. J Hum Genet 65(2): 79-89.
7. Foji, S., Dorgaleleh, S., Oladnabi, M., Jouybari, L., 2020. NF1 mutations analysis using whole exome sequencing technique in 11 unrelated Iranian families with neurofibromatosis type 1. Int J Pediatr 8(5): 11311-319.
8. Marchuk, D.A., Saulino, A.M., Tavakkol, R., 1991. cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. Genomics 11(4): 931-940.
9. Valero, M.C., Martín, Y., Hernández-Imaz, E., 2011. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. J Mol Diagn 13(2): 113-122.
10. Mattocks, C., Baralle, D., Tarpey, P., Ffrench-Constant, C., Bobrow, M., Whittaker, J., 2004. Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11-17 distinct from the GAP related domain. J Med Genet 41(4): e48.
11. Zhu, G., Zheng, Y., Liu, Y., Yan, A., Hu, Z., Yang, Y., Xiang, S., Li, L., Chen, W., Peng, Y., Zhong, N., Mei, H., 2019. Identification and characterization of NF1 and non-NF1 congenital pseudarthrosis of the tibia based on germline NF1 variants: genetic and clinical analysis of 75 patients. Orphanet J Rare Dis 14(1): 221.