دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی- ژنتیک

بررسی مارکرهای ژنی پایانه ′۵ ناحیه ژنی فاکتور IX انعقادی

استاد راهنما:

دکتر صادق ولیان بروجنی

پژوهشگر:

پریسا درّی

مهر ماه ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر دست‌آوردهای مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از پژوهش موضوع این پایان نامه/رساله متعلق به دانشگاه اصفهان است. دانشجو موظف به رعایت آئین نامه و منشور اخلاق در پژوهش برای ارائه و یا چاپ مطالب مستخرج از پایان نامه/رساله خود می‌باشد.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش ژنتیک

خانم پریسا درّی تحت عنوان

بررسی مارکرهای ژنی پایانه ′۵ ناحیه ژنی فاکتور IX انعقادی

در تاریخ ۹۲/۷/۲۹ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر صادق ولیان بروجنی با مرتبه علمی استاد امضا

۲- استاد داور داخل گروه دکتر مجید متولی باشی با مرتبه علمی دانشیار امضا

۳- استاد داور خارج از گروه دکتر کامران قائدی با مرتبه علمی دانشیار امضا

امضای مدیر گروه

گروه زیست شناسی Department Of Biology 1965

تقدیر و تشکر:

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید،

از خانواده عزیزم که هر لحظه وجودم را از چشمه سار پر از عشق چشمانشان سیراب میکنند،

از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر ولیان که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ لگی در این عرصه بر من دریغ ننمودند،

کمال تشکر و قدردانی را دارم

تقدیم به

مقدستترین واژه ها در لغت نامه دلم، مادر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفتش می دانم.

پدر، مهربانی مشفق، بردبار و حامی.

همسرم که نشانه لطف الهی در زندگی من است و سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد.

برادرانم همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم.

چکیده

هموفیلی B یک بیماری ژنتیکی خونریزی دهنده مغلوب وابسته به جنس ناشی از جهش در ژن فاکتور IX انعقادی است. جهش‌ها در ژن فاکتور IX باعث ناکارآمدی یا عملکرد نادرست فاکتور IX انعقادی می‌شوند. روش ایده‌آل برای تشخیص مولکولی این بیماری آنالیز مستقیم جهش‌های ژنی است. اما با توجه به تعداد بالای جهش‌های شناسایی شده در ژن مزبور، مشخص نبودن طیف جهش‌های شایع آن، اندازه بزرگ ژن فاکتور IX و طبیعت ناهمگن جهش‌ها، آنالیز مستقیم جهش برای هر خانواده با هموفیلی B بسیار وقت‌گیر و پر هزینه است. بنابراین بررسی غیرمستقیم جهش‌ها با روش آنالیز پیوستگی با استفاده از مارکرهای چند شکلی در ناحیه ژنی فاکتور IX گزینه مناسبی در تشخیص پیش از تولد و تشخیص ناقلین بیماری هموفیلی B می‌باشد. در این خصوص شناسایی مارکرهایی با میزان هتروزیگوسیتی و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت ایرانی ضروری می‌باشد.

در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، مارکرهای واقع در ناحیه ژنی فاکتور IX بررسی شدند و از بین مارکرهای موجود، دو مارکر چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) rs438601 با توالی C/G واقع در اینترون شماره ۳ ژن فاکتور IX و rs378815 با توالی T/C واقع در 5′UTR این ژن به منظور مطالعه بیشتر این مارکرها در جمعیت ایرانی انتخاب گردیدند. این دو مارکر در ژن فاکتور IX با روش Tetra-primer ARMS-PCR با پرایمرهای اختصاصی جدیداً طراحی شده در ۱۴۲ زن کنترل غیرخویشاوند و ۲۲ خانواده ۲ نفری مادر- پسر و پدر- دختر در جمعیت ایرانی تعیین ژنوتیپ شدند. فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی برای افراد غیرخویشاوند با برنامه GENEPOP تخمین زده شد و از آزمون χ^2 برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ در این افراد استفاده شد. فراوانی هاپلوتیپی در افراد غیرخویشاوند توسط نرم افزار PowerMarker و در خانواده‌ها به صورت دستی محاسبه گردید. محاسبه عدم تعادل پیوستگی در افراد غیرخویشاوند نیز با برنامه PowerMarker انجام گردید.

فراوانی آللی برای آلل‌های C و G مارکر rs438601 به ترتیب ۷۱/۸۳٪ و ۲۸/۱۷٪ و برای آلل‌های T و C مارکر rs378815 به ترتیب ۵۸/۱۰٪ و ۴۱/۹۰٪ محاسبه شد. میزان هتروزیگوسیتی بدست آمده برای هر مارکر به ترتیب ۵۳/۵۲٪ و ۸۲/۳۹٪ می‌باشد. بررسی تعادل هاردی-وینبرگ (HWE) با استفاده از آزمون χ^2 نشان می‌دهد که جمعیت ایرانی برای این دو مارکر در تعادل است. ترکیب این دو مارکر منجر به شناسایی سه هاپلوتیپ گویای C-C، C-T وG-T (فراوانی بالای ۵٪) در ناحیه ژنی فاکتور IX در آنالیز غیرخویشاوندی و خویشاوندی شد. مقادیر D' و ارزش P بدست آمده برای جفت مارکر rs378815-rs438601 بیانگر وجود عدم تعادل پیوستگی ($P\ value<0.05,\ D'>0$) است. وجود عدم تعادل پیوستگی بین مارکر خارج ژنی rs378815 و مارکر داخل ژنی rs438601 نشان دهنده پیوستگی بین ژن فاکتور IX و جایگاه rs378815 می‌باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که هتروزیگوسیتی بالا در دو مارکر rs438601 و rs378815 در جمعیت ایرانی و همچنین پیوستگی مارکر rs378815 به ژن فاکتور IX، این دو مارکر را به مارکرهایی با کارایی بالا در تشخیص غیرمستقیم هموفیلی B تبدیل کرده است. همچنین سه هاپلوتیپ C-C، C-T وG-T به دلیل فراوانی بالا به عنوان هاپلوتیپ‌های گویا در جمعیت ایران معرفی شدند که می‌توانند به عنوان ابزارهای مناسب در شناسایی افراد ناقل و تشخیص پیش از تولد هموفیلی B در این جمعیت استفاده شوند.

واژگان کلیدی: هموفیلی B، ژن فاکتور IX، rs438601، rs378815، جمعیت ایرانی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱ هموفیلی B ۱

۱-۲ ساختار ژنومی فاکتور IX ۲

۱-۳ آبشار انعقاد خون ۳

۱-۳-۱ تنظیم کننده‌های مسیر انعقاد خون ۴

۱- ۴ پروتئین فاکتور IX ۵

۱-۵ نقش فاکتور IX ۶

۱-۶ انواع جهش‌ها و پلیمورفیسم‌های ژن فاکتور IX ۸

۱- ۷ روش‌های مولکولی تشخیص هموفیلی B ۱۰

۱-۸ ژنتیک جمعیت ۱۳

۱-۹ آنالیز هاپلوتیپ ۱۳

۱-۹-۱ کاربردهای آنالیز هاپلوتیپ ۱۵

۱-۹-۲ اصطلاحات مورد استفاده در تعیین هاپلوتیپ ۱۵

۱-۹-۳ روش‌های تعیین هاپلوتیپ ۱۵

۱-۱۰ عدم تعادل پیوستگی ۱۶

۱-۱۰-۱ کاربردهای عدم تعادل پیوستگی ۱۷

۱-۱۱ پیشینه مطالعات انجام شده بر روی هاپلوتیپ‌های ژن در جمعیت‌های مختلف دنیا ۱۷

۱-۱۲ مارکرهای مورد استفاده در این تحقیق و اهمیت استفاده از آن‌ها ۱۸

۱-۱۴ اهداف این مطالعه ۲۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مطالعات بیوانفورماتیک ۲۱

۲-۱-۱ بررسی مارکرهای SNP موجود در جایگاه ژنی فاکتور IX ۲۱

۲-۱-۲ طراحی پرایمرهای اختصاصی و بررسی اتصال اختصاصی پرایمرهای مارکرها به جایگاه مورد نظر ۲۲

عنوان **صفحه**

۲-۲ دستگاه‌های مورد استفاده ۲۴
۲-۳ روش نمونه‌گیری از افراد ۲۴
۲-۴ استخراج DNA ۲۴
۲-۴-۱ روش استخراج DNA از خون ۲۴
۲-۴-۲ مواد مورد نیاز برای استخراج DNA از خون ۲۶
۲-۴-۳ روش تهیه اتیلن دی آمینو تترا استیک اسید (EDTA) ۲۶
۲-۴-۴ روش ساخت محلول Tris-HCl ۲۷
۲-۴-۵ تریس اتیلن دی آمین تترا استیک (TE) ۲۷
۲-۵ بررسی خلوص و غلظت DNA ژنومی استخراج شده ۲۷
۲-۵-۱ ارزیابی کیفی DNA استخراج شده ۲۷
۲-۵-۲ ارزیابی کمی DNA استخراج شده ۲۸
۲-۶ جداسازی و تکثیر لوکوس‌های مورد نظر از DNA ژنومی استخراج شده ۲۸
۲-۷ اصول و روش انجام واکنش PCR ۳۲
۲-۷-۱ مواد و وسایل مورد نیاز واکنش PCR ۳۲
۲-۷-۲ روش انجام واکنش PCR ۳۳
۲-۸ ژل آگارز ۳۴
۲-۹ مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۳۴
۲-۹-۱ بافر TBE ۳۴
۲-۹-۲ اتیدیوم برماید (10mg/mL) ۳۵
۲-۹-۳ لودینگ بافر ۳۵
۲-۱۰ مارکرهای DNA و لزوم استفاده از آن‌ها ۳۵
۲-۱۱ آنالیز آماری ۳۶
۲-۱۱-۱ تهیه فایل ورودی برنامه GENEPOP با استفاده از برنامه Microsatellite tools ۳۶
۲-۱۲ محاسبه فراوانی آللی با استفاده از پایگاه GENEPOP ۳۷
۲-۱۳ بررسی تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از آزمون χ^2 ..... ۳۷

عنوان **صفحه**

۲-۱۴ تهیه فایل ورودی نرم‌افزار PowerMarker ۳۸

۲-۱۴-۱ تخمین فراوانی هاپلوتیپ با استفاده از برنامه PowerMarker ۳۹

۲-۱۵ تخمین فراوانی هاپلوتیپ با فاز مشخص ۳۹

۲-۱۶ تخمین مقدار LD بین دو پلی‌مورفیسم ۴۰

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱ مطالعات بیوانفورماتیک اولیه ۴۲

۳-۱-۱ مشاهده ویژگی‌های مارکرهای موجود در ناحیه ژنی فاکتور IX ۴۲

۳-۱-۲ طراحی پرایمرهای اختصاصی با استفاده از پایگاه داده‌های NCBI و Primer1 و نرم‌افزار Oligo ۴۴

۳-۱-۳ تایید اتصال اختصاصی پرایمرهای مارکرهای مورد بررسی توسط نرم‌افزارهای BLAST و Reverse e-PCR ۴۸

۳-۲ نتایج کیفی و کمی مربوط به استخراج DNA ۵۱

۳-۳ شرایط مناسب برای تکثیر مارکر rs438601 ..... ۵۱

۳-۳-۱ یافتن نمونه هتروزیگوت برای تنظیم کردن شرایط PCR ۵۲

۳-۳-۲ تنظیم دمای اتصال پرایمرها جهت انجام واکنش PCR برای مارکر rs438601 ..... ۵۲

۳-۳-۳ تعیین غلظت مناسب کلرید منیزیم ($MgCl_2$) جهت انجام واکنش PCR برای مارکر rs438601 ..... ۵۳

۳-۴ شرایط مناسب برای تکثیر مارکر rs378815 ..... ۵۴

۳-۴-۱ یافتن نمونه هتروزیگوت برای تنظیم کردن شرایط PCR ۵۴

۳-۴-۲ تنظیم دمای اتصال پرایمرها جهت انجام واکنش PCR برای مارکر rs378815 ..... ۵۵

۳-۴-۳ تعیین غلظت مناسب کلرید منیزیم ($MgCl_2$) جهت انجام واکنش PCR برای مارکر rs378815 ..... ۵۵

۳-۵ مشاهده محصولات PCR دو مارکر rs438601 و rs378815 بر روی ژل آگارز ۲٪ و تعیین آلل های این دو مارکر ۵۶

۳-۶ آنالیز آماری ۵۹

۳-۶-۱ تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر rs438601 ..... ۵۹

عنوان **صفحه**

۳-۶-۲ تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر rs378815 ..... ۶۰

۳-۷ بررسی تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از آزمون χ^2 ..... ۶۱

۳-۸ تخمین فراوانی هاپلوتیپ در زنان غیرخویشاوند با استفاده از نرم‌افزار PowerMarker ۶۱

۳-۹ تخمین فراوانی هاپلوتیپ با فاز شناخته شده در ۴۴ کروموزوم X ۶۲

۳-۱۰ تخمین مقدار D' و χ^2 و ارزش P با استفاده از نرم‌افزار PowerMarker ۶۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ بررسی‌های بیوانفورماتیک ۶۵

۴-۲ بررسی فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی ۶۶

۴-۲-۱ بررسی فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی مارکر rs438601 ..... ۶۶

۴-۲-۲ بررسی فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی مارکر rs378815 در جمعیت ایران ۶۹

۴-۳ بررسی تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از آزمون χ^2 ..... ۷۱

۴-۴ بررسی هاپلوتیپ‌های گویا در جمعیت ایران ۷۱

۴-۵ بررسی مقدار پیوستگی نامتعادل (LD) ۷۲

۴-۶ نتیجه‌گیری نهایی ۷۳

۴-۷ پیشنهاداتی برای مطالعات آینده ۷۳

پیوست‌ها ۷۴

پیوست ۱ ..... ۷۴

پیوست ۲ ..... ۷۸

پیوست ۳ ..... ۷۹

پیوست ۴ ..... ۸۱

پیوست ۵ ..... ۸۳

پیوست ۶ ..... ۸۷

منابع و ماخذ ۸۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ نقشه ژنتیکی بازوی بلند کروموزوم X و موقعیت ژن فاکتور IX ۲

شکل ۱-۲ شکل شماتیک الف) ژن فاکتور IX، ب) mRNA فاکتور IX، ج) پروتئین تازه سنتز شده فاکتور IX، د) فاکتور IX فعال ۷

شکل ۱-۳ تصویر شماتیک مسیرهای ذاتی و غیر ذاتی آبشار انعقادی ۷

شکل ۱-۴ دیاگرام سیستماتیک ژن فاکتور IX و RFLPs پیوسته به آن ۹

شکل ۱-۵ برخی پلیمورفیسم‌های شناخته شده در ژن فاکتور IX ۱۳

شکل ۱-۶ اهمیت آنالیز هاپلوتیپ در مطالعات آنالیز پیوستگی ۱۴

شکل ۱-۷ موقعیت مارکرهای rs378815 و rs438601 در مجاورت و داخل ژن ۱۹

شکل ۱-۸ نمای موقعیت کروموزومی مارکرهای rs438601 و rs378815 ..... ۱۹

شکل ۲-۱ تکنیک Tetra-primer ARMS PCR ۲۲

شکل ۲-۲ موقعیت ژنومی و توالی نوکلئوتیدی هر یک از پرایمرها بر روی توالی اطراف مارکر rs438601 ..... ۳۰

شکل ۲-۳ موقعیت ژنومی و توالی نوکلئوتیدی هر یک از پرایمرها بر روی توالی اطراف مارکر rs378815 ..... ۳۱

شکل ۲-۴ نحوه نوشتن داده‌ها در نرم‌افزار Excel برای محاسبه با نرم‌افزار GENEPOP ۳۷

شکل ۲-۵ نحوه نوشتن داده‌ها برای محاسبه با نرم‌افزار PowerMarker ۳۹

شکل ۳-۱ ویژگی‌های مارکر rs438601 در پایگاه اطلاعاتیdbSNP ۴۳

شکل ۳-۲ ویژگی‌های مارکر rs378815 در پایگاه اطلاعاتی dbSNP ۴۳

شکل ۳-۳ طراحی اولیه پرایمر برای مارکر rs438601 با استفاده از نرم‌افزار Primer 1 ..... ۴۵

شکل ۳-۴ طراحی اولیه پرایمر برای مارکر rs378815 با استفاده از نرم‌افزار Primer 1 ..... ۴۶

شکل ۳-۵ نرم‌افزار Oligo برای بررسی صحت پرایمرهای طراحی شده برای مارکر rs438601. .. ۴۷

شکل ۳-۶ نرم‌افزار Oligo برای بررسی صحت پرایمرهای طراحی شده برای مارکر rs378815.... ۴۷

شکل ۳-۷ نتیجه BLAST برای مارکر rs438601 ..... ۴۹

شکل ۳-۸ نتیجه BLAST برای مارکر rs378815..... ۵۰

شکل ۳-۹ نتایج استخراج DNA تام ژنومی از خون انسان بر روی ژل آگارز ۱٪ ۵۱

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۰ نمایش محصولات PCR به صورت جداگانه مربوط به پرایمرهای طراحی شده برای مارکر rs438601 ..... ۵۲

شکل ۳-۱۱ بررسی گرادیان دمایی مارکر rs438601 بر روی ژل آگارز ۱٪ ۵۳

شکل ۳-۱۲ بررسی غلظت مناسب $MgCl_2$ جهت انجام واکنش PCR برای مارکر rs438601 بر روی ژل آگارز ۱٪ ۵۴

شکل ۳-۱۳ نمایش محصولات PCR به صورت جداگانه مربوط به پرایمرهای طراحی شده برای مارکر rs438601 ..... ۵۵

شکل ۳-۱۴ بررسی غلظت مناسب $MgCl_2$ جهت انجام واکنش PCR برای مارکر rs378815 بر روی ژل آگارز ۱٪ ۵۶

شکل ۳-۱۵ تعیین آلل‌های مارکرrs438601 با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ ۵۸

شکل ۳-۱۶ تعیین آلل‌های مارکر rs378815 با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR بر روی ژل آگارز۲٪ ۵۸

شکل ۴-۱ مقایسه فراوانی آلل G برای مارکر rs438601 در جمعیت‌های مختلف جهان بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED و SNPPER ۶۸

شکل ۴-۲ مقایسه درجه هتروزیگوسیتی مارکر rs438601 در جمعیت‌های مختلف جهان بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED و SNPPER ۶۸

شکل ۴-۳ مقایسه فراوانی آلل T و C برای مارکر rs378815 در جمعیت‌های مختلف جهان بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED و SNPPER ۷۰

شکل ۴-۴ مقایسه درجه هتروزیگوسیتی مارکر rs378815 در جمعیت‌های مختلف جهان بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED و SNPPER ۷۰

شکل ۴-۵ بررسی فراوانی هاپلوتیپ‌های گویا در سطح جمعیت و در سطح خانواده. ۷۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ اندازه اگزون‌ها و اینترون‌های ژن فاکتور IX انسان ۳

جدول ۱-۲ تعداد و درصد موتاسیون‌ها در اگزون‌ها و اینترون‌های ژن فاکتور IX ۹

جدول ۱-۳ چندین RFLP شناسایی شده در داخل ژن فاکتور IX و فراوانی آللی آن‌ها در جمعیت های مختلف ۱۰

جدول ۱-۴ برخی مطالعات انجام شده بر روی هاپلوتیپ‌های ژن فاکتور IX در جمعیت‌های مختلف دنیا..... ۱۸

جدول ۲-۱ دستگاه‌های مورد استفاده ۲۴

جدول ۲-۲ ترکیبات بافر A (بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز خون) ۲۶

جدول ۲-۳ ترکیبات بافر B (بافر لیز کننده گلبول‌های سفید خون) ۲۶

جدول ۲-۴ ترکیبات محلول TE ۲۷

جدول ۲-۵ توالی پرایمرهای Forward و Reverse طراحی شده برای تکثیر مارکر rs438601.. ۲۹

جدول ۲-۶ توالی پرایمرهای Forward و Reverse طراحی شده برای تکثیر مارکر rs378815... ۲۹

جدول ۲-۷ مواد و مقادیر مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۵۰ میکرولیتر. ۳۲

جدول ۲-۸ مواد و مقدار مورد نیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (پس از بهینه سازی‌های متعدد) برای مارکر rs438601 و مارکر rs378815..... ۳۳

جدول ۲-۹ برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای مارکر rs438601 و rs378815 .... ۳۴

جدول ۳-۱ انواع ژنوتیپ‌ها برای مارکر rs438601 در لوکوس فاکتور IX ۵۹

جدول ۳-۲ فراوانی آللی مارکر rs438601 در لوکوس فاکتور IX با استفاده از پایگاه اینترنتی GENEPOP..... ۵۹

جدول ۳-۳ درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مارکر rs438601 در لوکوس فاکتور IX ۶۰

جدول ۳-۴ انواع ژنوتیپ‌ها برای مارکر rs378815 در لوکوس فاکتور IX ۶۰

جدول ۳-۵ فراوانی آللی مارکرrs378815 در لوکوس فاکتور IX..... ۶۰

جدول ۳-۶ درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مارکر rs378815 در لوکوس فاکتور IX ۶۱

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۷ فراوانی هاپلوتیپی دو مارکر rs438601 و rs378815..... ۶۲
جدول ۳-۸ فراوانی هاپلوتیپی دو مارکر rs438601 و rs378815 در ۲۲ خانواده دو نفری. ۶۲
جدول ۳-۹ مقدار D' و χ^2 و ارزش P محاسبه شده برای جفت مارکر rs378815 -rs438601 .... ۶۳

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱ هموفیلی B

هموفیلی B از نوع رایج‌تر هموفیلی A در سال ۱۹۵۲ تشخیص داده شد و بر اساس نام اولین کودکی که با این بیماری توصیف شد به عنوان بیماری کریسمس[1] نام‌گذاری شد (Franchini and Mannucci 2012). هموفیلی B (MIM#306900) یک بیماری خونریزی دهنده مغلوب وابسته به X است که توسط کمبود یا ناهنجاری فاکتور IX انعقادی ایجاد می‌شود و با موتاسیون هایی در ژن فاکتور IX رخ می‌دهد (Ghandil, Farhud et al. 2003, Mahajan, Chavali et al. 2004, Yan and Wu 2009). از آن‌جا که این بیماری وراثت وابسته به X مغلوب دارد، اغلب مردان را تحت تاثیر قرار می‌دهد، در مقابل بیشتر زنان ناقل، سالم می‌مانند (Salazar-Sánchez, Jiménez-Cruz et al. 2004). تعداد اندکی از زنان با بیماری هموفیلی شناخته شده‌اند که این‌ها ممکن است به علت وجود دو ژن فاکتور VIII یا فاکتور IX ناقص یا از طریق غیر فعال شدن غیر تصادفی کروموزوم X باشند. دلیل دوم اغلب به عنوان یک توضیح اولیه برای وجود علائم هموفیلی در ناقلین شناخته شده پیشنهاد می‌شود، هرچند داده‌ها نشان می‌دهد که بین غیر فعال شدن کروموزوم X و غلظت پلاسمایی فاکتور VIII در ناقلین هموفیلی A و B همبستگی وجود ندارد (Bowen 2002). هموفیلی B یک در ۲۵ تا ۳۰ هزار پسر متولد شده زنده را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Chan, Yam et al. 2000, Ghandil, Farhud et al. 2003, Yan and Wu 2009).

آزمایشات ایمونولژیک برای فاکتور IX می‌تواند بین دو نوع اصلی بیماران هموفیلی B به صورت B^- و B^+ تمایز قائل شود. بیماران B^- فاقد پروتئین فاکتور IX قابل تشخیص می‌باشند و بیماران B^+ دارای پروتئین فاکتور IX غیر طبیعی می‌باشند (Grunebaum, Cazenave et al. 1984). خونریزی‌های غیر پیش‌بینی شده، عود کننده و خود به خودی اساساً در بافت‌های نرم و یا مفاصل بزرگ ظاهر می‌شوند. خونریزی عود کننده در مفاصل بزرگ معمولا منجر به بیماری مفصل فلج کننده[2] در اکثر بیماران با بیماری شدید می‌شود.

---

[1] Christmas disease
[2] Crippling arthropathies

شدت کلینیکی هموفیلی B بستگی به سطح فاکتور IX انعقادی در گردش خون دارد. هموفیلی B شدید[1] در کمتر از ۱٪ از فعالیت فاکتور IX انعقادی رخ می‌دهد. در هموفیلی B متوسط[2]، ۵-۱٪ از فعالیت فاکتور IX انعقادی، خونریزی خود به خودی نادر وجود دارد. وجود حداقل ۵٪ از فاکتور IX انعقادی به نظر می‌رسد افراد با هموفیلی B خفیف[3] را در مقابل خونریزی خود به خودی محافظت می‌کند (Yan and Wu 2009). این گوناگونی در ظهور کلینیکی بر اساس ناهمگنی[4] نواقص مولکولی به وجود آمده با هر موتاسیون است که منجر به یک الگوی خاص از تغییرات فعالیت فاکتور IX می‌شود (Nawaz, Hussain et al. 2008). چگونگی درمان و اداره این بیماری در پیوست شماره ۱ آورده شده است.

۱-۲ ساختار ژنومی فاکتور IX

ژن فاکتور IX انعقادی انسان به طور کامل توسط Yoshitaki و همکارانش در سال ۱۹۸۵ توالی‌یابی شد (Graham, Kunkel et al. 1991). این ژن شامل ۸ اگزون و ۷ اینترون است که حدود ۳۴ کیلو جفت باز از DNA کروموزومی در بازوی بلند کروموزوم X (Xq27) را اشغال کرده است (شکل ۱-۱) و به یک mRNA ۲۸۰۳ جفت بازی رونویسی می‌شود (Ghandil, Farhud et al. 2003, Zahedmehr, Delmaghani et al. 2004). این mRNA شامل یک ناحیه ۵´ غیرترجمه‌شونده[5] (5′UTR) کوتاه (۲۹ باز)، یک قاب خواندن باز (ORF[6]) به علاوه کدون ختم[7] (۱۳۸۳باز)، و یک ناحیه ۳´ غیرترجمه شونده[8] (3′UTR) (۱۳۹۰ باز) می‌باشد. بزرگترین اگزون این ژن فقط ۱۹۳۵ جفت باز طول دارد (جدول ۱-۱) (Bowen 2002).

شکل ۱-۱ نقشه ژنتیکی بازوی بلند کروموزوم X و موقعیت ژن فاکتور IX، با فواصل ژنتیکی در واحد سانتی‌مورگان (Ghandil, Farhud et al. 2003).

اختصارات به ترتیب از سمت سانترومر به سمت انتهای بازوی بلند کروموزوم X:

Cen: centromere; HPRT: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase; DXS51: The name of polymorphic marker ; FIX: Factor IX ; Xqfra: Xq fragile X; FVIII: Factor VIII; DX13: The name of polymorphic marker; St14: The name of polymorphic marker; Xqter: Xq terminal; CM: Centimorgan

[1] Severe
[2] Moderate
[3] Mild
[4] Heterogeneity
[5] 5′untranslated region
[6] Open Reading Frame
[7] Stop codon
[8] 3′untranslated region

جدول ۱-۱ اندازه اگزون‌ها و اینترون‌های ژن فاکتور IX انسان (Bowen 2002).

Exon	Length(bp)	Intron	Length(bp)
1	117	1	6206
2	164	2	188
3	25	3	3689
4	114	4	7163
5	129	5	2565
6	203	6	9473
7	115	7	668
8	1935		

۱-۳ آبشار انعقاد خون

آبشار انعقادی[۱] به سه مسیر تقسیم می‌شود. مسیر فعال سازی تماسی[۲] (مسیر داخلی[۳]) و مسیر فاکتور بافتی[۴] (TF) (مسیر خارجی[۵]) مسیر مشترک نهایی فاکتور X، ترومبین و فیبرین را فعال می‌کنند (Hoffbrand and Moss 2011).

در مسیر خارجی در اثر آسیب به جدار عروق، فاکتور بافتی وارد سیستم عروقی می‌شود و در حضور یون کلسیم فاکتور VII را فعال می‌کند که در نهایت کمپلکس این دو فاکتور (TF:FVIIa) موجب فعال شدن دو زیموژن پلاسما یعنی فاکتور IX و X می‌شود. فعال شدن فاکتور X به شکل Xa توسط کمپلکس TF-FVIIa اغلب به سرعت توسط مهارکننده مسیر فاکتور بافتی[۶] (TFPI) مهار می‌شود. FXa و کوفاکتور آن FVa کمپلکس پروترومبیناز[۷] را تشکیل می‌دهند که پروترومبین[۸] را به ترومبین[۹] تبدیل می‌کند. ترومبین سپس ترکیبات دیگر آبشار انعقادی از جمله FV و FVII را فعال می‌کند (که FXI و متعاقبا FIX را فعال می‌کند) و FVIII را نیز آزاد و فعال می‌کند (Pallister and Watson 2010). فاکتور VIII فعال‌شده (FVIIIa) در مسیر انعقادی به عنوان کوفاکتور برای فاکتور IX فعال شده (FIXa) عمل می‌کند. کمپلکس تشکیل شده از این دو پروتئین (کمپلکس tenase)، فاکتور X را به فاکتور X فعال تبدیل می‌کند. بنابراین TF به دو روش می‌تواند FX را فعال کند: ۱- به طور مستقیم ۲- از طریق کمپلکس FVIIIa:FIXa (شکل ۱-۳) (Villoutreix and Sperandio 2010).

[1] Coagulation cascade
[2] Contact activation pathway
[3] Intrinstic pathway
[4] Tissue factor pathway
[5] Extrinsic pathway
[6] Tissue factor pathway inhibitor
[7] Prothrombinase
[8] Prothrombin
[9] Thrombin

در مسیر داخلی انعقاد در اثر صدمات بافتی و صدمه به سلول‌های اندوتلیال عروقی، بافت کلاژن زیر این عروق در معرض دسترسی پلاکت‌ها و فاکتورهای انعقادی قرار می‌گیرد که موجب فعالیت آنها می‌شود. در واقع این مسیر با شکل‌گیری کمپلکس اولیه روی کلاژن توسط کینینوژن با وزن مولکولی بالا[1] (HMWK) ، پری-کالیکرئین[2] و FXII شروع می‌شود. پری‌کالیکرئین به کالیکرئین[3] و FXII به FXIIa تبدیل می‌شود. FXIIa ، FXI را به FXIa تبدیل می‌کند. فاکتور XIa فاکتور IX را فعال می‌کند که با کوفاکتورش FVIIIa کمپلکس tenase را شکل می‌دهند که FX را به FXa تبدیل می‌کند. نقش کمتری که مسیر فعال‌سازی تماسی در شروع تشکیل لخته دارد توسط این حقیقت که بیماران با نقص‌های شدید FXII، HMWK و پری‌کالیکرئین، بیماری خونریزی دهنده‌ای ندارند مشخص می‌شود. در عوض سیستم فعال سازی تماسی به نظر می‌رسد بیشتر در التهاب[4] شرکت دارد (شکل ۱-۳).

در مسیر مشترک نهایی پس از تبدیل فاکتور X به فاکتور Xa هر دو مسیر در یک مسیر مشترک قرار می-گیرند. در ادامه فاکتور Xa باعث تبدیل پروترومبین به ترومبین می‌شود. اولین نقش ترومبین تبدیل فیبرینوژن به فیبرین می‌باشد. ترومبین، فاکتور VIII و V و مهارکننده آن‌ها (پروتئین C) را فعال می‌کند. به علاوه فاکتور XIII را نیز فعال می‌کند که باندهای کوولانسی را شکل می‌دهد که پلی‌مرهای فیبرین را که از مونومرهای فعال شده شکل گرفته‌اند، به هم متصل می‌کند (Pallister and Watson 2010).

۱-۳-۱ تنظیم‌کننده‌های مسیر انعقاد خون

چند مکانیسم فعال شدن پلاکت‌ها و آبشار انعقادی را تنظیم می‌کنند که ناهنجاری در این مکانیسم‌ها می‌تواند منجر به تمایل افزایش یافته به تشکیل لخته خون در عروق[5] شود.

برخی مهارکننده‌های طبیعی انعقاد عبارتند از:

۱- پروتئین C که مهم‌ترین ضد انعقاد فیزیولوژیک است. این پروتئین یک آنزیم سرین پروتئاز وابسته به ویتامین K است که توسط ترومبین به پروتئین C فعال[6] (APC) تبدیل می‌شود.
۲- آنتی ترومبین[7] یک مهارکننده سرین پروتئاز[8] (serpin) است که سرین پروتئازها یعنی ترومبین، FIXa، FXa، FXIa و FXIIa را تجزیه می‌کند.
۳- مهارکننده مسیر فاکتور بافتی (TFPI)، فعالیت فاکتور بافتی را محدود می‌کند و همچنین فعال‌سازی بیش از حد وابسته به فاکتور بافتی FVII و FX را مهار می‌کند.

[1] High-molecular-weight kininogen
[2] Prekallikrein
[3] Kallikrein
[4] Inflammation
[5] Thrombosis
[6] Activated protein C
[7] Antithrombin
[8] Serine protease inhibitor

۴- پلاسمین توسط شکست پروتئولیتیکی[1] پلاسمینوژن (پروتئین پلاسما که در کبد تولید می‌شود) ایجاد می‌شود. این شکست توسط فعال کننده بافتی پلاسمینوژن[2](t-PA) رخ می‌دهد که توسط اندوتلیوم سنتز و ترشح می‌شود. پلاسمین با فعالیت پروتئازی[3] فیبرین را به محصولات حاصل از تجزیه فیبرین می‌شکند که از شکل‌گیری بیش از حد فیبرین جلوگیری می‌کند (Hoffbrand and Moss 2011).

۱- ۴ پروتئین فاکتور IX

فاکتور IX یک سرین پروتئاز شبیه تریپسین است که در مسیر داخلی انعقاد خون عمل می‌کند. فاکتور IX برای شش دامنه[4] عملکردی به نام‌های پری‌پروپپتید[5]،گلادومین[6]، دامنه‌های فاکتور رشد اپیدرمی1-(EGF[7]) و EGF-2، دامنه فعال‌سازی[8] و دامنه کاتالیتیک[9] رمز می‌کند. فاکتور IX به عنوان یک زیموژن تک زنجیره ۴۱۵ آمینواسیدی با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتن در گردش است و در پلاسمای نرمال در غلظت تقریبا ۵µg/ml وجود دارد (Mahajan, Chavali et al. 2004).

فاکتور IX در هپاتوسیت‌ها به عنوان پیش‌ساز، شامل یک توالی سیگنال آمینوترمینال و یک پروپپتید سنتز می‌شود. در واقع قاب خواندن باز (ORF) یک پری-پرو-پروتئین[10] رمز می‌کند که توالی pre (یا توالی سیگنال) پروتئین فاکتور IX را به شبکه آندوپلاسمی هدایت می‌کند و آن را برای ترشح آماده می‌کند. توالی pro یک دامنه اتصالی برای یک کربوکسیلاز وابسته به ویتامین k فراهم می‌کند که کربوکسیلاز ریشه گلوتامیک اسید را در مجاور گلادومین قرار می‌دهد. پروپپتید شامل عناصری است که برای شناسایی فاکتور IX توسط γ-گلوتامیل کربوکسیلاز[11] وابسته به ویتامین K که با سطح داخلی شبکه آندوپلاسمی مرتبط است، مهم‌اند. باقی-مانده پری-پرو-پروتئین، زیموژن فاکتور IX می‌باشد که بعد از حذف توالی‌های پری و پرو وارد گردش خون می‌شود (Bowen 2002, Mahajan, Chavali et al. 2004).

توالی سیگنال و پروپپتید در واکنش‌های مجزا قبل از ترشح جدا می‌شوند و شکست در جدا شدن این توالی‌ها منجر به تولید یک پروتئین غیر عملکردی[12] می‌شود. دامنه‌های داخل زیموژن بر اساس ساختار یا عملکرد

---

[1] Proteolytic cleavage
[2] Tissue plasminogen activator
[3] Proteolytically
[4] Domain
[5] Prepropeptide
[6] Gla domain
[7] Epidermal growth factor
[8] Activation domain
[9] Catalytic domain
[10] Pre-pro-protein
[11] γ- glutamyl carboxylase
[12] Nonfunctional