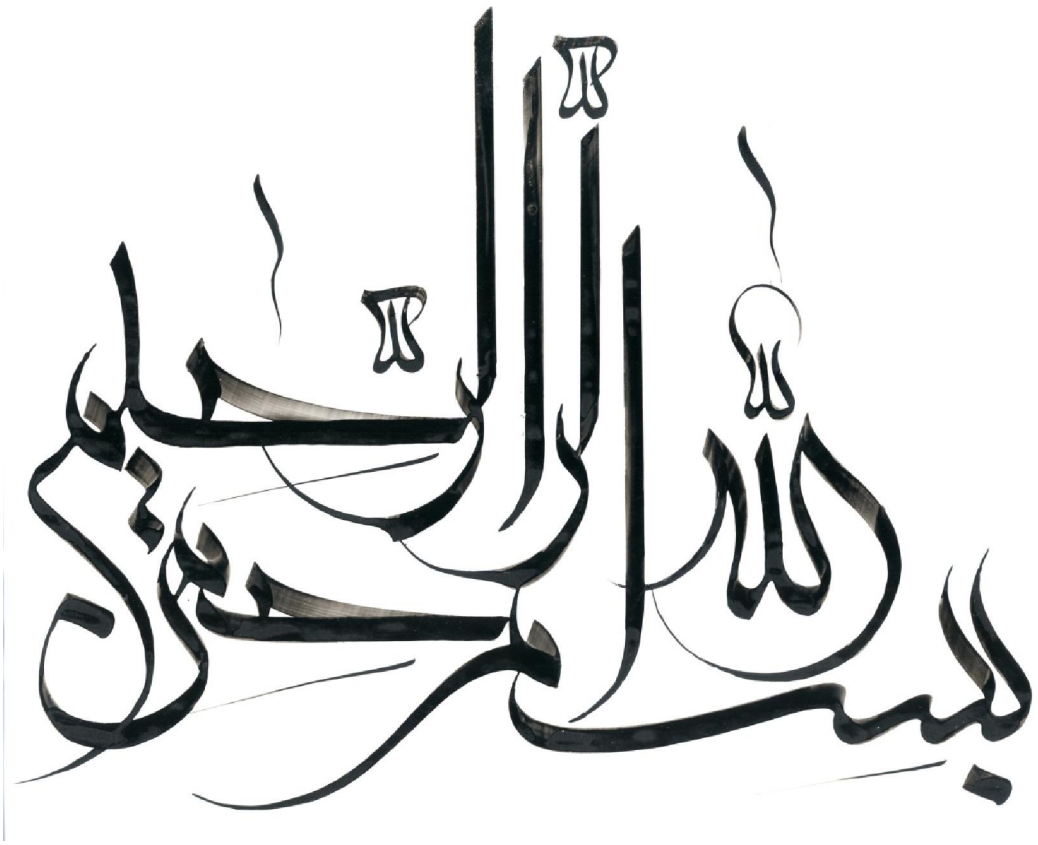

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش ژنتیک

بررسی پیوستگی نامتعادل مارکرهای تک نوکلئوتیدی پلی مورف در ناحیه ´۵ لوکوس بتا گلوبین نسبت به ژن بتا گلوبین

استاد راهنما:

دکتر صادق ولیان بروجنی

پژوهشگر:

صدیقه گیوی

شهریورماه ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش ژنتیک خانم صدیقه گیوی

تحت عنوان

بررسی پیوستگی نامتعادل مارکرهای تک نوکلئوتیدی پلی مورف در ناحیه ´۵ لوکوس بتا گلوبین نسبت به ژن بتا گلوبین

در تاریخ ۹۰/۶/۲۸ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر صادق ولیان بروجنی با مرتبه ی علمی دانشیار امضاء

۲- استاد داور داخل گروه دکتر سهیلا رهگذر با مرتبه ی علمی استادیار امضاء

۳- استاد داور خارج از گروه دکتر منصور صالحی با مرتبه ی علمی دانشیار امضاء

امضای مدیرگروه

تقدیر و تشکر:

خداوند را شاکرم که توفیق انجام این پروژه را به من اعطاکرد.

از پدر و مادرم که در لحظه لحظه های زندگی همراه، یاور و مشوقم بودند،

از همسر خوبم که همیشه در کنارم بود،

از استاد ارجمندم، دکتر ولیان که در طول این پروژه با راهنمایی های ارزشمندشان مرا یاری نمودند،

از اساتید ارجمند دکتر منصور صالحی و دکتر سهیلا رهگذر کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

چکیده:

بتا تالاسمی یک بیماری مغلوب اتوزمی است که با کاهش زنجیره‌ی بتا همراه است. بتا تالاسمی از جمله شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی در ایران است. به دلیل وجود جهش های متعدد در ژن بتا تالاسمی استفاده از مارکرهای پیوسته به ژن در دنبال کردن آلل بیماری زا مفید است. وجود یک نقطه‌ی‌داغ نوترکیبی فعال در ناحیه'5 ژن β می تواند کاربرد مارکرهای چندشکلی واقع در این ناحیه را در تشخیص ناقلین و موارد قبل از تولد بیماری دچار مخاطره نماید. به منظور بررسی میزان پیوستگی مارکرهای چندشکلی در ناحیه '5 ژن β در جمعیت ایرانی، سه مارکر *Ava*II (درموقعیت +۵۰۶β)، *Rsa*I (درموقعیت ۵۵۰β-) و *Hind*III (داخل ژن Gγ) انتخاب شدند. این سه مارکر با استفاده از RFLP-PCR در ۱۵۰ فرد غیرخویشاوند در جمعیت ایرانی تعیین ژنوتیپ شدند. فراوانی اللی و درجه هتروزیگوسیتی برای افراد غیرخویشاوند با برنامه GENEPOP تخمین زده شد. محاسبه عدم تعادل پیوستگی درافراد غیرخویشاوند توسط دو نرم‌افزار MIDAS و 2LD آنالیز شد.

مقایسه نتایج حاصل از تخمین فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی مشاهده شده مارکرهای *Ava*II، *Hind*III و *Rsa*I نشان داد که هر سه مارکر پلی مورفیسم و درجه هتروزیگوسیتی بالا دارند. با مقایسه χ^2 دو مارکر *Ava*II و *Rsa*I در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشتند ولی *Hind*III در تعادل هاردی واینبرگ نیست و به سمت افزایش هتروزیگوتی در جمعیت بوده است. بوسیله نرم افزار MIDAS، مقدار 'D برای هاپلوتیپ *Ava*II-*Rsa*I ۰/۱۶، برای هاپلوتیپ *Ava*II-*Hind*III ۰/۰۹ و برای هاپلوتیپ *Rsa*I-*Hind*III، ۰/۰۰۲ بدست آمد.۰مقدار χ^2 به دست آمده برای این سه هاپلوتیپ *Ava*II- *Hind*III، *Ava*II-*Rsa*I و *Rsa*I-*Hind*III از مقدار χ^2 درجدول و در سطح احتمال $P<0.05$ کوچک‌تر بود. نتایج بدست آمده نشان داد که مارکرهای *Hind*III *Rsa*I و *Ava*II در پیوستگی متعادل قرار دارند. مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد دو جایگاه SNP برای جایگاه شناسایی آنزیم *Hind*III وجود دارد. محصولات PCR مربوط به *Hind*III برای بررسی وجود SNPهای مختلف در این ناحیه تعیین توالی شدند ولی این مارکر در افراد سالم با ژنوتیپ منفی تنها یک SNP داشت.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد به علت وجود ناحیه داغ نوترکیبی در '5 ژن β مارکرهای خوشه β را در دوگروه ساب-هاپلوتیپی '3 و '5 می‌توان تقسیم کردکه در هر گروه LD بالا وجود دارد ولی بین مارکرهای دو گروه هاپلوتیپی '3 و '5، LD وجود ندارد. مارکر *Rsa*I موجود در ناحیه نقطه‌داغ با هیچ کدام از دو گروه هاپلوتیپی '3 و '5، LD نداشت. مارکر های پلی‌مرف HinfI و RsaI در بین توالی های تکراری قرار دارند.

کراسینگ‌آور نابرابر در توالی‌های تکراری می‌تواند سبب تصادفی بودن مارکر های RsaI وHinfI نسبت به ساب-هاپلوتیپ '5 و'3 باشد. مارکرهای '5 ناحیه نقطه‌داغ را می‌توان در مطالعات همبستگی جهش و هاپلوتیپ استفاده کرد یعنی آلل‌های موتانت به طور قوی با هاپلوتیپ های خاص RFLP پیوستگی دارند

کلمات کلیدی: ژن بتاگلوبین- پیوستگی نامتعادل- مارکرهای چند شکلی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱ بتا تالاسمی ۱

۱-۲ ساختار و عملکرد هموگلوبین ۲

۱-۳ ژن β گلوبین ۲

۱-۴ پروموتر ژن β ۳

۱-۵ تنظیم بیان ژن ۴

۱-۶ اساس مولکولی β تالاسمی ۵

۱-۷ توالی‌های تکراری ۶

۱-۸ مارکرهای چندشکلی در طول قطعات محدودکننده (RFLP) در ژن‌های خوشه‌ی ۷

۱-۹ روش‌های مطالعه بیماری‌های ژنتیک ۷

۱-۹-۱ هاپلوتیپ ۸

۱-۹-۲ نمونه‌گیری برای تعیین هاپلوتیپ ۸

۱-۹-۳ کاربردهای هاپلوتیپ ۹

۱-۱۰ پیوستگی نامتعادل ۹

۱-۱۰-۱. پارامترهای اندازه‌گیری پیوستگی نامتعادل ۱۰

۱-۱۱ بلوک هاپلوتیپ ۱۱

۱-۱۲ پیوستگی نامتعادل مارکرهای پلی‌مرف در خوشه‌ی ژنی β ۱۱

۱-۱۲-۱ نوترکیبی در خوشه‌ی ژنی β ۱۲

۱-۱۲-۲ اندازه‌گیری پیوستگی نامتعادل ۱۳

۱-۱۳ بررسی کراسینگ آور در خانواده‌ها ۱۴

۱-۱۴ نقطه‌ی داغ خوشه‌ی ژنی بتا ۱۶

۱-۱۵ اهمیت نقطه‌ی داغ نوترکیبی در مطالعات پیوستگی ژنی ۱۷

۱-۱۶ آنالیز LD در ناحیه‌ی خوشه‌ی بتا ۱۷

۱-۱۷ آنالیز مولکول‌های نوترکیب در اسپرم ۲۰

۱-۱۸-۱ همبستگی موتاسیون‌های β تالاسمی و هاپلوتیپ RFLP در خوشه‌ی ژنی β در مردم مدیترانه ۲۱

۱-۱۸-۲ همبستگی موتاسیون‌های β تالاسمی و هاپلوتیپ RFLP در خوشه‌ی ژنی β در مردم هند ۲۳

عنوان **صفحه**

۱-۱۸-۳ تصادفی بودن توالی اطراف *HinfI* در '5 ژن β ۲۵

۱-۱۹ مارکرهای مورد استفاده در این تحقیق و اهمیت استفاده از آنها ۲۶

۱-۲۰ اهداف این مطالعه ۲۶

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ دستگاه‌های مورد استفاده ۲۸

۲-۲ روش نمونه گیری از افراد ۲۸

۲-۳ روش استخراج DNA از خون ۲۸

۲-۳-۱ مواد مورد نیاز در استخراج DNA از خون ۲۹

۲-۳-۲ روش تهیه اتیلن دی‌آمینوتترااستیک اسید ۳۰

۲-۳-۳ روش ساخت محلول Tris-HCl ۳۰

۲-۳-۴ تریس اتیلن دی آمین تترااستیک ۳۰

۲-۴ بررسی خلوص و غلظت DNA ژنومی استخراج شده ۳۱

۲-۴-۱ارزیابی کیفی DNA استخراج شده ۳۱

۲-۴-۲ ارزیابی کمی DNA استخراج شده ۳۱

۲-۵ اصول انجام تکنیک PCR ۳۲

۲-۵-۱ غلظت یون منیزیم (Mg^{+2}) ۳۲

۲-۵-۲ داکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs) ۳۳

۲-۵-۳ غلظت پرایمرها ۳۳

۲-۵-۴ دمای ذوب (TM) ۳۳

۲-۵-۵ آنزیم DNA Polymerase ۳۴

۲-۵-۶ تعداد چرخه‌های تکثیر ۳۴

۲-۶ جداسازی و تکثیر قطعه مورد نظر از DNA ژنومی استخراج شده ۳۴

۲-۷ شرایط استاندارد برای یک واکنش PCR ۳۵

۲-۸ روش انجام تکنیک PCR ۳۶

۲-۹ مارکر اندازه DNA ۳۷

۲-۱۰ روش انجام الکتروفورز ۳۸

عنوان **صفحه**

۲-۱۱ مواد مورد نیاز برای الکتروفورز ۳۹
۲-۱۱-۱ بافر TBE ۳۹
۲-۱۱-۲ اتیدیوم برماید ۳۹
۲-۱۱-۳ لودینگ بافر ۳۹
۲-۱۱-۴ ژل آگارز ۴۰
۲-۱۲ تکنیک PCR-RFLP ۴۱
۲-۱۲-۱ مواد مورد نیاز برای هضم آنزیمی ۴۱
۲-۱۲-۱-۱ آنزیم های محدودالاثر ۴۱
۲-۱۲-۱-۲ آنزیم *AvaII* ۴۱
۲-۱۲-۱-۳ آنزیم *HindIII* ۴۲
۲-۱۲-۱-۴ آنزیم *RsaI* ۴۲
۲-۱۳ روش انجام تکنیک PCR-RFLP ۴۳
۲-۱۴ مطالعات بیوانفورماتیک ۴۳
۲-۱۴-۱ شناسایی مارکرهای مناسب در ناحیه ژن بتا ۴۳
۲-۱۴-۲ نرم‌افزار e-PCR ۴۴
۲-۱۵ آنالیز آماری ۴۵
۲-۱۵-۱- تخمی‌ن فراوانی آللی با استفاده از برنامه GENEPOP ۴۵
۲-۱۵-۲- تخمی‌ن آزمون χ^2 برای مارکرهای *Hind*III، *Rsa*I و *Ava*II ۴۵
۲-۱۵-۳ تخمین مقدار LD بین دو پلی مورفیسم ۴۶
۲-۱۵-۳-۱ تخمین مقدار LD با استفاده از برنامه 2LD ۴۷
۲-۱۵-۳-۲ تخمین مقدار LD با استفاده از برنامه MIDAS ۴۷

فصل سوم: مشاهدات

۳-۱ مطالعات بیوانفورماتیک ۴۹
۳-۱-۱ شناسایی و معرفی مارکرهای RFLP ناحیه ژنی بتا گلوبین تعیین دقیق جایگاه مارکر ۴۹
۳-۱-۲ نتایج reverse ePCR به منظور تائید اتصال اختصاصی پرایمر به جایگاه مورد نظر برای سه مارکر *Ava*II،*Rsa*I ،*Hind*III ۵۱
۳-۲ استخراج DNA ژنومی ۵۳

عنوان **صفحه**

۳-۳ تکثیر مارکرهای *Hind*III، *Rsa*I و *Ava*II از DNA ژنومی استخراج شده به کمک PCR ۵۴

۳-۳-۱ تنظیم کردن دمای اتصال پرایمرها جهت انجام واکنش PCR برای مارکر *HindIII*، *RsaI* و *AvaII* ۵۴

۳-۳-۲ تعیین غلظت مناسب کلرید منیزیم ($MgCl_2$) جهت انجام واکنش PCR برای مارکرهای *AvaII*، *RsaI* و *HindIII* ۵۵

۳-۴ هضم آنزیمی محصولات PCR ۵۷

۳-۴-۱ هضم آنزیمی محصولات PCR با پرایمر اختصاصی تکثیر مارکر *RsaI* ۵۷

۳-۴-۲ هضم آنزیمی محصولات PCR با پرایمر اختصاصی تکثیر *مارکر AvaII* ۵۸

۳-۴-۳ هضم آنزیمی محصولات PCR با پرایمر اختصاصی تکثیر مارکر *HindIII* ۵۹

۳-۵ نتایج حاصل از تعیین توالی مارکر*Hind*III ۶۰

۳-۶ تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر *Ava*II در ژن بتا گلوبین ۶۰

۳-۷ تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر *Rsa*I در '5 ژن بتا گلوبین ۶۱

۳-۸ تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر *Hind*III در ژن Gγ ۶۲

۳-۹ تخمین مقدار D′ و χ^2 با استفاده از نرم‌افزار 2LD و MIDAS ۶۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱ مطالعات بیوانفورماتیک ۶۶

۴-۲ بررسی فراوانی آللی مارکرهای *Ava*II,*Rsa*I,*Hind*III در جمعیت ایران ۶۷

۴-۳ بررسی مقدار پیوستگی نامتعادل (LD) مارکرهای '5 نسبت به ژن β ۶۷

۴-۴ نتیجه‌گیری نهایی ۶۹

۴-۵ پیشنهاداتی برای مطالعات آینده ۷۰

پیوست ها

پیوست ۱ ..... ۷۱

پیوست ۲ ..... ۷۲

منابع و مآخذ ۷۳

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱ دستگاه‌های مورد استفاده ۲۷

جدول ۲-۲- ترکیبات بافر A ۲۹

جدول ۲-۳- ترکیبات بافر B ۲۹

جدول۲-۴ ترکیبات محلول TE ۳۰

جدول ۲-۵ توالی پرایمرهای Forward و Reverse برای تکثیر مارکرهای *AvaII*، *RsaI* و *HindIII* ۳۵

جدول ۲-۶ مواد و مقادیر مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۵۰ میکرولیتر ۳۵

جدول ۲-۷ مواد و مقدار مورد نیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (پس از بهینه‌سازی‌های متعدد) برای مارکر *RsaI* ۳۵

جدول ۲-۸ مواد و مقدار مورد نیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (پس از بهینه‌سازی‌های متعدد) برای مارکرهای *Ava*II و *Hind*III : ۳۶

جدول ۲-۹ برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای مارکر *RsaI* ۳۶

جدول ۲-۱۰ برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای مارکرهای *Ava*II و *Hind*III ۳۷

جدول ۳-۱ SNPهایی که در محدوده هضم آنزیمی قرار دارند. ۵۰

جدول ۳-۲ فراوانی آللی مارکر AvaII در لوکوس بتا ۶۰

جدول ۳-۳ درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مارکر AvaII ۶۱

جدول ۳-۴ مقدار χ^2 و P با درجه آزادی یک برای مارکر AvaII ۶۱

جدول ۳-۵ فراوانی آللی مارکر *Rsa*I در 5' لوکوس بتا ۶۱

جدول ۳-۶ درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مارکر *Rsa*I ۶۲

جدول ۳-۷ مقدار χ^2 و P با درجه آزادی یک برای مارکر *Rsa*I ۶۲

جدول ۳-۸ فراوانی آللی مارکر *Hind*III در لوکوس بتا ۶۲

جدول ۳-۹ درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مارکر *Hind*III ۶۳

جدول ۳-۱۰ مقدار χ^2 و P با درجه آزادی یک برای مارکر *Hind*III ۶۳

جدول ۳-۱۱ مقدار p، D' و χ^2 محاسبه شده برای جفت مارکرهای *Ava*II-*Hind*III، *Ava*II-*Rsa*I و *Hind*III-*Rsa*I با استفاده از 2LD ۶۴

جدول ۳-۱۲ مقدار p، D' و χ^2 محاسبه شده برای جفت *مارکرهای* *Ava*II-*Hind*III، *Ava*II-*Rsa*I و *Hind*III-*Rsa*I با استفاده از MIDAS ۶۴

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ ناحیه‌ی خوشه‌ی ژنی β و نواحی اطراف آن روی کروموزم ۱۱p ۳
شکل ۱-۲ حذف‌های ساختاری ژن β گلوبین ۶
شکل ۱-۳ مارکرهای RFLP خوشه ی ژنی β و جایگاه آن. ۷
شکل ۱-۴ خوشه‌ی ژنی β و مجموعه‌ایی از مارکرهای RFLP پلیمرف. ۱۳
شکل ۱-۵ شکل ۱-۵ خوشه ی ژنیβ وجایگاه نقطه ی داغ که در محدوده *Taq*I و *Hgi*AI تعریف می شود ۱۵
شکل ۱-۶ یک ناحیه‌ی ۱۴۵kb از کروموزم ۴ که حاوی ۱۴ SNP می‌باشد ۱۸
شکل ۱-۷ یک نمودار شماتیک که هر خانه حاوی اندازه‌گیری جفت جفت از مقدار پیوستگی نامتعادل بین دو SNP است ۲۰
شکل ۱-۸ توزیع نقاط کراسینگ‌آور درنقطه‌داغ ژن β دراسپرم ۲۱
شکل ۱-۹ هاپلوتیپ‌های RFLP در β تالاسمی ۲۲
شکل ۱-۱۰ همبستگی موتاسیون‌های β تالاسمی و هاپلوتیپ RFLP در خوشه‌ی ژنی β ۲۳
شکل ۱-۱۱ هاپلوتیپ‌های RFLP در β تالاسمی ۲۴
شکل ۱-۱۲ همبستگی موتاسیون‌های β تالاسمی و هاپلوتیپ RFLP در خوشه‌ی ژنی β ۲۵
شکل ۱-۱۳ ساختار نوکلئوتیدی '5 ژن بتا گلوبین که در افزایش نوترکیبی نقش دارد ۲۶
شکل ۲-۱ مارکر مورد استفاده در این تحقیق.GeneRuler 100bp DNA Plus Ladder ۳۸
شکل ۲-۲ فراوانی هاپلوتیپی و میزان LD در MIDAS. ۴۸
شکل ۳-۱. جایگاه مربوط به آنزیم‌های محدودکننده *Hind*III و SNP مربوطه در پایگاه UCSC ۵۰
شکل ۳-۲ SNP ناحیه‌ی اینترونی IVS-II-849. در پایگاه HbVar ۵۰
شکل ۳-۳ نتیجه reverse ePCR برای مارکر *Rsa*I. در پایگاه NCBI reverse ePCR ۵۱
شکل ۳-۴ نتیجه reverse ePCR برای مارکر HindIII ۵۲
شکل ۳-۵ نتیجه reverse ePCR برای مارکر AvaII ۵۲
شکل ۳-۶ نتایج استخراج DNA تام ژنومی از خون انسان بر روی ژل اگارز ۱٪ ۵۳
شکل ۳-۷ نتیجه گرادیان دمایی مارکرهای *HindIII,AvaII* بر روی ژل اگارز ۵۴
شکل ۳-۸ نتیجه گرادیان دمایی مارکر *RsaI* بر روی ژل آگارز ۱٪ ۵۵
شکل ۳-۹ تعیین غلظت مناسب $MgCl_2$ جهت انجام واکنش PCR برای مارکر AvaII بر روی ژل اگارز ۱٪ ۵۶
شکل ۳-۱۰ تعیین غلظت مناسب $MgCl_2$ جهت انجام واکنش PCR برای مارکر HindIII بر روی ژل اگارز ۱٪ ۵۶

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۱ تعیین غلظت مناسب $MgCl_2$ جهت انجام واکنش PCR برای مارکر RsaI بر روی ژل اگارز ۱٪ ۵۷
شکل۳-۱۲ هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم RsaI ۵۸
شکل۳-۱۳ هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیمAvaII ۵۹
شکل۳-۱۴ هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم *Hind*III ۵۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱ بتا تالاسمی

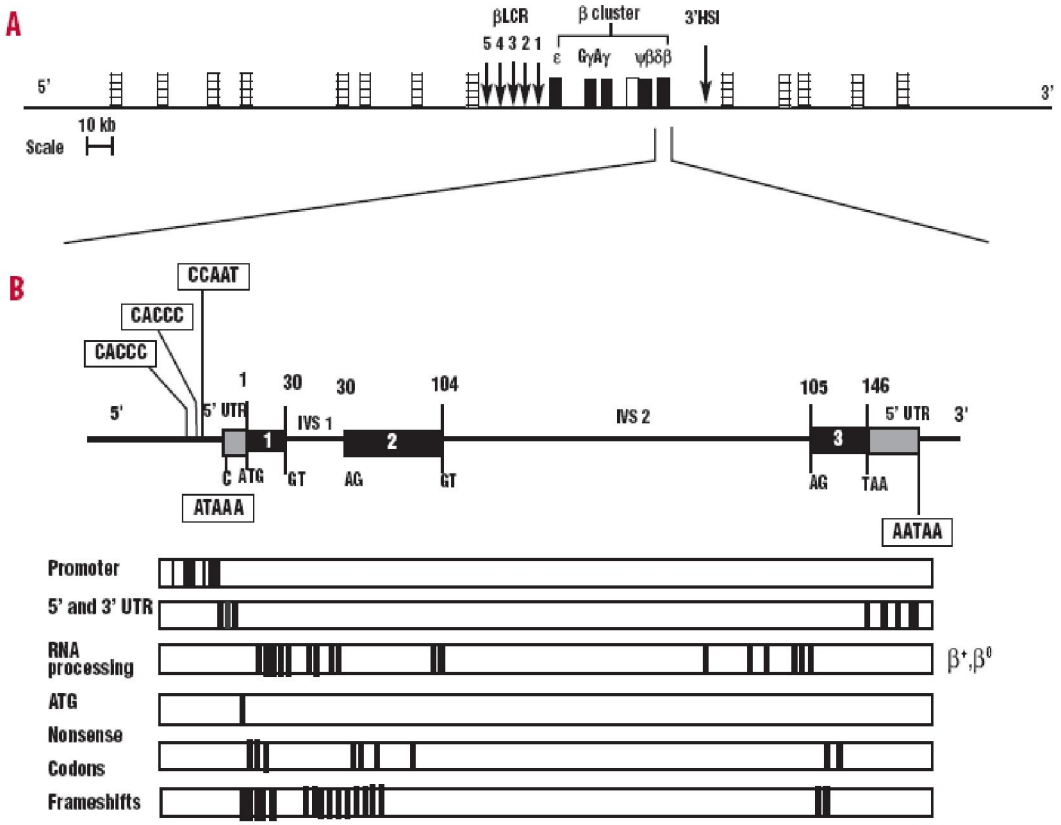
بتا تالاسمی یک بیماری مغلوب اتوزمی است که با کاهش (β^+) یا عدم سنتز (β^0) زنجیره‌ی بتا همراه است. این بیماری یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در جهان است که در میان افراد مدیترانه تبار، آفریقا، خاورمیانه، هند، چین و آسیای جنوب شرقی شیوع دارد (۱). تولید کاهش یافته‌ی بتا گلوبین باعث کم خونی میکروسیتر هیپوکرومیک می‌شود. عدم تعادل در سنتز گلوبین منجر به رسوب زنجیره‌های مازاد گلوبین آلفا در گلبول قرمز و آسیب زدن به غشاء آن‌ها می‌شود. شدت تالاسمی با شدت عدم توازن بین β و α متناسب می‌باشد (۲). فنوتیپ های β تالاسمی به سه گروه تقسیم می شوند که شامل تالاسمی ماژور، تالاسمی اینترمدیا و صفت بتا تالاسمی می باشد (۱). تالاسمی ماژور شدیدترین فرم بیماری است که نیاز به تزریق خون مداوم دارند و برای آلل β^0 هموزیگوت یا هتروزیگوت مرکب اند (۳). صفت بتا تالاسمی کمترین حالت فنوتیپی است که آنمی هیپوکرومیک میکروسیتیک خفیف دارند و یک آلل β تالاسمی (β^0 یا β^+) را به ارث می برند (۳). تالاسمی اینترمدیا، حدواسط دو تالاسمی قبلی است وطیف فنوتیپی وسیعی دارد که شدت بیماری آنها کمتر از افرادی است که نیازمد تزریق خون هستند تا افر اد که علامتی ندارند و بر اثر به ارث رسیدن یک یا دو الل β ایجاد می‌شود(۳).

۱-۲ ساختار و عملکرد هموگلوبین

هموگلوبین ناقل اکسیژن در گلبول قرمز مهره‌داران است. دارای چهار زیرواحد است، دو زنجیره‌ی α و دو زنجیره‌ی β. هر زیرواحد از یک زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی و یک گروه پروستاتیک موسوم به هم، که با اکسیژن ترکیب می‌شود و به مولکول توانائی انتقال اکسیژن می‌دهد، تشکیل شده است. ساختار گلوبین در طول تکامل حفظ شده و از ۸ ناحیه‌ی مارپیچی تشکیل شده (A تا H). فقط دو اسیدآمینه وجود دارد (His 92,Phe 42) که در تمام گلوبین‌ها حفظ شده و جهش در هر کدام، با بیماری همراه است (۴).

۱-۳ ژن β گلوبین

ژن β گلوبین در خوشه ی ژنی بتا به وسعت ۷۰ kb روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۱ (۱۱ p ۱۵.۴) قرار دارد که خوشه‌ی ژنی بتا دارای ۵ ژن عملکردی (5'-ε -Gγ-Aγ-Ψβ-δ-β-3') است که با ترتب توالی یکسان و مرتبی در طی نمو بیان می شوند. ژن β گلوبین کدکننده ی ۱۴۶ اسیدآمینه وbp ۱۶۰۰ است. حاوی ۳ اگزون و۲ اینترون است (۱). اگزون۲ ناحیه‌ی اتصال هم را دارد و نیز ناحیه‌ای که دایمر αβ شکل می‌گیرد. اگزون ۳ دارای اسیدآمینه‌های مؤثر در واکنش بوهر و اتصال ۲،۳ دی فسفوگلیسرات می‌باشد. 5'-UTR دارای۵۰ نوکلئوتید بین انتهای '5 یا ناحیه‌ی کلاهک‌گذاری و کدون آغازین ATG است. دو ناحیه‌ی حفاظت‌شده‌ی آن شامل توالی‌های CACCATG و CTTCTG است که در توالی اول ATG کدون آغازین است و توالی دوم ۸ تا ۱۳ نوکلئوتید پائین‌دست cap قرار دارد. موتاسیون‌های مختلف در این توالی‌ها سبب بتاتالاسمی می‌شود. 3'- UTR به طول ۱۳۲ نوکلئوتید و با توالی حفاظتی AATAAA بین کدون پایانی و دم پلیA قرار دارد. موتاسیون‌های مختلف در-3' UTRسبب بتاتالاسمی می‌شود (۳،۱).



۱-۱ ناحیه‌ی خوشه‌ی ژنی **β** و نواحی اطراف آن روی کروموزم **p**۱۱.

A) ژن‌های خوشه β که شامل $5'-\varepsilon-G\gamma-A\gamma-\psi\beta-\delta-\beta-3'$ است با جعبه‌های سیاه نشان داده شده است. Ψβ با جعبه‌ی سفید نمایش داده شده است. جایگاه حساس '5 در LCR و جایگاه حساس '3 (3'HS1) توسط فلش مشخص شده است. جعبه‌های نردبانی ژن‌های گیرنده‌ی بویایی را نشان می دهد. B) ساختار ژنی β با سه اگزون و دو اینترون نشان داده شده است. نواحی حفاظت شده در جعبه‌های سفیدرنگ نمایش داده می‌شود. انواع مختلف جهش‌های نقطه‌ای که سبب بتاتالاسمی می‌شوند در زیر ژن β نشان داده شده است (۳).

۱-۴ پروموتر ژن β

پروموتر ژن بتا از سه عنصر تشکیل شده که به صورت سیس عمل می کنند که عبارت‌اند از:

۱- جعبه‌ی TATA که در موقعیت ۲۸- تا ۳۱- قرار دارد.

۲-جعبه‌ی CCAAT که در موقعیت ۷۲- تا ۷۶- قرار دارد.

۳-توالی دوبل شده‌ی CACCC در موقعیت ۸۶- تا ۹۰- در ناحیه‌ی نزدیک و ۱۰۱- تا ۱۰۵- در ناحیه‌ی دور قرار دارد (۳،۱) (شکل B-۱).

این سه ناحیه توسط فاکتور رونویسی یوبیکویته شناسایی می‌شوند. دو توالی اول در پروموتر بسیاری از ژن‌های یوکاریوتی یافت می شوند، در حالی که توالی CACCC مخصوص سلول های اریتروئیدی است. ژن δ انسانی دارای سه توالی مشابه CCAAT است ولی هیچ کدام تشابه توالی کاملی ندارد و توالی CACCC را نیز ندارد. به همین جهت بیان ژن دلتا پائین است (۵).

۱–۵ تنظیم بیان ژن

بالادست خوشه‌ی ژنی بتا، ناحیه‌ی کنترل لکوس بتا (LCR) قرار دارد که کنترل‌کننده‌ی بیان ژن‌های خوشه است. LCR هم مسئول بیان بسیار زیاد ژن‌ها در هر دسته و هم زمان‌بندی درست بیان آن در طول تکامل است. کنترل بیان ژن در خوشه‌ی بتا توسط LCR با دو مکانیسم انجام می‌شود. اول، LCR یک قلمرو کروماتین باز را ارائه می‌کند که عوامل نسخه‌برداری به عناصر تنظیمی درون خوشه دسترسی پیدا کنند. دوم، به عنوان یک تقویت‌کننده‌ی نسخه‌برداری از ژن‌ها، در دسته‌جات ژنی عمل می‌کند (۶). LCR دارای ۵ جایگاه حساس به DNase1 است (HS1تا5) که Kb ۲ تا ۶۰Kb در'5 ژن ε قرار دارد. هر HS دارای توالی برای چندین فاکتور رونویسی است. از جمله‌ی این فاکتورهای رونویسی می‌توان به GATA-1 و NF-E2 که خاص سلول‌های اریتروئیدی است، اشاره کرد. یک جایگاه حساس دیگر در فاصله‌ی kb ۲۰ از'3 ژن β وجود دارد. این دو ناحیه محدوده‌ی ژنی خوشه‌ی β را تعیین می‌کنند (شکل۱–۱). خوشه‌ی ژنی بتا توسط مجموعه‌ای از ژنهای گیرنده‌ی بویایی احاطه شده است (۱،۳).

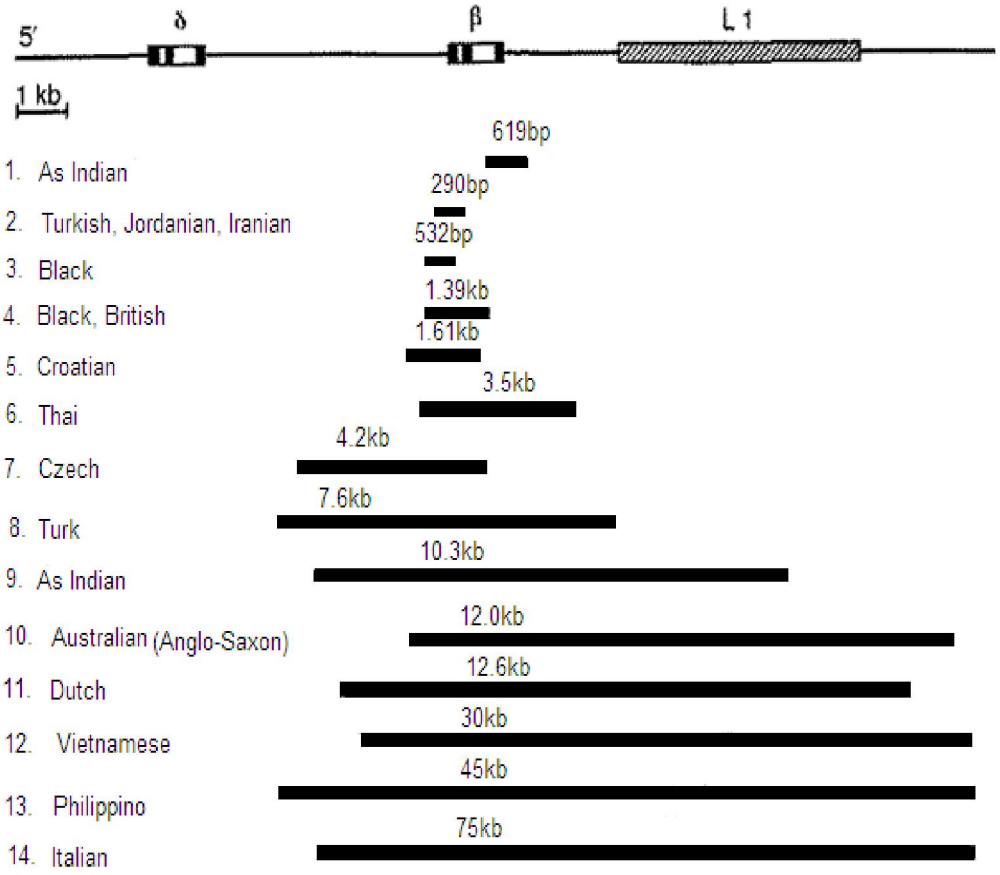
اتصال فاکتور اریتروئیدی Krüppel (EKLF) به توالی CACCC برای بیان طبیعی ژن β ضروری است (۷،۸). ناحیه‌ی '5 بسیاری از ژن های گلوبین دارای یک یا دو توالی (A/T)GATA(A/G) می باشند که فاکتور رونویسی GATA-1 به آن متصل می شود. همچنین توالی‌های افزایش‌دهنده و LCR دارای این توالی هستند (۹). بالادست پروماتور ژن β دو ناحیه‌ی اتصالی برای GATA-1 وجود دارد (۱۰). وجود این توالی‌ها برای بیان طبیعی ژن ضروری است و جهش‌های نقطه‌ای در داخل و اطراف جعبه‌ی TATA و جعبه‌ی CACCC سبب بتا تالاسمی می‌شود. یک افزایش‌دهنده در اینترون ۲ و ۶۰۰bp تا ۹۰۰bp پائین‌دست ژن β وجود دارد (۳).

۱-۶ اساس مولکولی β تالاسمی

حدود ۲۰۰ آلل β تالاسمی شناسائی شده[1] که بیشتر آنها جهش‌های نقطه‌ای در ژن یا نواحی اطراف ژنی است (۱۱). بعضی از جهش‌ها نتیجه‌ی نقص در مسیرهای مربوط به برهمکنش بین LCR و پروموتر هر ژن در خوشه‌ی β است.

بر خلاف α تالاسمی، β تالاسمی به ندرت بر اثر حذف ژنی بزرگ ایجاد می شود. دو گروه از حذف‌های β تالاسمی شامل: ۱-حذف ناحیه بالادست (LCR) و ۲- حذف‌های ساختاری در ژن β. ۱۴ نوع حذف‌های ساختاری در ژن β دیده شده که در شکل ۱-۲ نشان داده شده است. طول ناحیه حذفی می تواند از ۲۹۰bp تا بیش از ۶۰Kb می باشد. از بین این حذف‌ها تنها حذف ۶۱۸bp در '3 ژن β در مردم هند و پاکستان شایع است (۱۲، ۱۳). بقیه حذف‌های ساختاری اگر چه نادرند ولی سبب افزایش در میزان HbA2 می‌شوند، اینها معمولاً سبب حذف ناحیه‌ی ۱۲۵-تا۷۸+ می‌شوند که در اصل ناحیه‌ی پروموتری ژن β را حذف می کند. این نشاندهنده ی نقش ناحیه ی '5 ژن β در عدم بیان HbA2 است. حذف این ناحیه سبب عدم رقابت برای LCR شده، در نتیجه برهمکنش LCR با ژن‌های δ, γ افزایش یافته، بیان این ژن ها زیاد شده، HbA2 و HbF در افراد هتروزیگوت بالا می رود. اغلب آلل‌های بتاتالاسمی بر اثر جهش‌های نقطه‌ای در اگزون یا اینترون ایجاد می‌شوند که می‌توانند روی رونویسی، پیرایش و پردازش RNA، ترجمه و تنظیم بیان ژن تأثیرگذار باشند. جهش‌های تأثیرگذار روی رونویسی شامل ناحیه پروموتری و 5'-UTR می‌باشد. جهش‌های اتصال‌دهنده‌ی نقاط پیرایش، جهش‌های اینترون و جهش‌های اگزونی موثر بر پیرایش، جهش پلی‌آدنیلاسون و 5'-UTR جزء نقایص پیرایش هستند. تقریباً نیمی از آلل‌های β تالاسمی روی مراحل مختلف ترجمه RNA تأثیر می‌گذارند و سبب β^0 تالاسمی می‌شوند. جهش‌های بی‌معنی و تغییرقالب جزء این دسته هستند (۱،۳).

1 http://globin.cse.psu.edu/globin/hbva قابل دسترس است در



شکل ۱-۲ حذف‌های ساختاری ژن β گلوبین.

در قسمت بالای شکل دو ژن σ،β و توالی تکراری *Kpn* در L1، '3 ژن β نشان داده شده است. حذف‌های متفاوت شایع در جمعیت‌های گوناگون در زیر شکل نشان داده شده است (۲).

۱-۷ توالی های تکراری

توالی تکراری در ناحیه خوشه‌ی ژنی β شامل: ۱- توالی تکراری کوتاه $(CA)_n$ و (ATTTT)n بین ژن δ و β می‌باشد. ۲- توالی تکراری پراکنده *AluI*، *KpnI*، توالی *AluI* در'5 ژن ε دو طرف ژن γ ، بالادست δ و پائین دست β واقع شده و توالی *KpnI* بین ژن εوGγ ودر پائین دست ژن β قراردارد. نقش دقیق این توالی ها نامشخص است ولی به نظر می رسد توالی *AluI* در ایجاد حذف های گوناگون خوشه ی ژنی β مؤثر است و توالی‌های تکراری $(ATTTT)_n$, CA به عنوان نقاط داغ برای نوترکیبی معرفی می‌شوند (۱۴).