

# شناسایی ۵ جهش جدید در ژن گلیکوپروتئین Ibα پلاکت در بیماران برنارد- سولیر ایران

## چکیده

زمینه و هدف: سندروم برنارد سولیر بیماری خونریزی دهنده ارشی است که به دلیل نتایج مولکولی کمپلکس GP Ib-IX-V (GlycoProtein) پلاکتی که از چهار زنجیره این کمپلکس بوده و مسئول اتصال به لیگاند می باشد. بیشتر جهش های شناسایی شده در ارتباط با سندروم برنارد سولیر در GP Ibα بوده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی و شناسایی نتایج مولکولی ژن GP Ibα در بیماران برنارد سولیر ایرانی می باشد.

روش کار: این مطالعه به روش بررسی بیماران (Case series) انجام شد و با استفاده از بانک اطلاعاتی بیماری های خونریزی دهنده درمانگاه جامع هموفیلی ایران ۱۲ بیمار شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفتند. تشخیص بیماری بر پایه مطالعات فتوتیپی شامل شمارش پلاکت، بررسی لام خون میطی و عدم پاسخدهی به آگونیست ریستوتین صورت گرفته بود. DNA از ستونهای خونی بیماران و افراد وابسته جدا سازی شد. نواحی که کنده ژن GP Ibα به ۵ قطعه هم پوشان تقسیم بندی و تکثیر انجام شد. از روش (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) CSGE تعیین توالی شدند.

یافته ها: ۵ بجهش جدید شناسایی شد: حذف ACCGGCT و جایگزینی GGA بین نوکلوتید های ۴۱۹-۴۲۵، C<sub>T۱۷۰۹</sub>, T<sub>G۶۱۰</sub>, A<sub>C۱۸۱۹</sub> و حذف ۲۰ نوکلوتید در موقعیت ۱۸۱۹-۱۸۰۰. موتاسیون های شناسایی شده به بانک جهانی ژن فرستاده شد و ثبت گردید برای هر کدام از موتاسیون ها (RFLP) Fragment Length Polymorphism تعیین توالی شد.

نتیجه گیری: در این مطالعه نتایج مولکولی ژن زنجیره GP Ibα پلاکتها در بیماران BSS مورد مطالعه قرار گرفت و ۵ موتاسیون جدید که در سایر مطالعات شناسایی نشده بود، شناسایی گردید.

کلیدواژه ها: ۱- سندروم برنارد سولیر ۲- گلیکوپروتئین Ibα ۳- تعیین توالی ۴- جهش

سیدasadالله تقوی I

\* دکتر احمد کاظمی II

دکتر قاسم رستگار لاری III

دکتر فریدون علاء IV

مریم رسول زادگان V

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۳۰

## مقدمه

می کند.<sup>(۱)</sup> GP Ibα بزرگترین زنجیره این کمپلکس بوده و مسئول اتصال به لیگاند می باشد. نقش GP Ib-IX-V اتصال پلاکت ها به نواحی زیر اندوتلیوم آسیب دیده با واسطه فاکتور وان ویلبراند و تسهیل فعال سازی پلاکت ها در غلظت های پایین ترومیین می باشد. به علاوه به نظر می رسد در تولید و سوخت و ساز پلاکت ها دخیل باشد چون بیماران دارای نقص در این گلیکوپروتئین دچار کاهش تعداد پلاکت و افزایش اندازه پلاکت می باشند.<sup>(۲)</sup>

سندروم برنارد - سولیر بیماری خونریزی دهنده ارشی است که معمولاً با توارث اتوزوم مغلوب به ارث می رسد و شیوع آن در جمیعت های مختلف نزدیک به یک در میلیون می باشد.<sup>(۳)</sup>

این سندروم به دلیل نتایج مولکولی گلیکوپروتئین GP Ib-IX-V پلاکت ایجاد می شود که از چهار زنجیره پلی پپتیدی GPV, GP IX, GP Ibβ, GP Ibα تشکیل شده است و به عنوان گیرنده برای فاکتور وان ویلبراند عمل

- این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی کد ۲۰۶/پ در سال ۱۳۸۶ انجام گردیده است.
- (I) کارشناس ارشد هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران
  - (II) دانشیار گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (\* مؤلف مسئول)
  - (III) استادیار گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران
  - (IV) فوق تخصص هماتولوژی بالینی، درمانگاه جامع هموفیلی ایران، تهران، ایران
  - (V) کارشناس شیمی، درمانگاه جامع هموفیلی ایران، تهران، ایران

از گلبول‌های سفید استخراج گردید. با توجه به اینکه تمام توالی کد کننده زنجیره GP Ib $\alpha$  در درون یک اگزون قرار داشته و این یک اگزون اندازه بزرگی دارد به ۵ قطعه تقسیم شد و مورد مطالعه قرار گرفت. برای انجام PCR Touch down (Polymerase Chain Reaction) از روش (Polymerase Chain Reaction) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای این ۵ قطعه در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده

PRIMER SEQUENCE(5'-3')	PRIMER POSITION	PRIMER
A1	۲۷۶۱-۲۷۸۰	gagagaaggacgg agtgcag
A1R	۳۲۱۸-۳۱۹۹	ggttgtgtcttgc agg
A2	۳۱۲۵-۳۱۴۴	ctgtgagggtctcaa agtgg
A2R	۳۵۸۵-۳۵۶۶	tagccagactgaget tctce
A3	۳۵۱۱-۳۵۳۰	aaggcaatgagetg aagacc
A3R	۴۱۰۸-۴۰۸۷	cttgtgtggatgca aggag
A4	۴۰۵۶-۴۰۷۵	tccactgtttcttag acag
A4R	۴۴۹۲-۴۴۷۳	ggetgateaaggta gggat
A5	۴۳۹۴-۴۴۱۳	cacaagectgtac tccaa
A5R	۴۹۷۸-۴۹۵۹	ttctcteaaggcccc aaac

اساس CSGE بر مبنای تشکیل هترودوبلکس DNA ناشی از جفت شدن تصادفی زنجیره دارای موتاسیون با زنجیره سالم است. از این روش برای شناسایی اولیه موتاسیون‌ها استفاده شد که دو مرحله تقسیب و اتصال به ترتیب به مدت ۵ دقیقه ۹۸°C و ۳۰ دقیقه ۶۵°C می‌باشد. در ژل CSGE از فرمامید، اتیلن گلیکول و BAP (4-BisAcrolyl piperazine) به منظور CSGE حساسیت استفاده شد. قطعاتی که در ژل CSGE دارای هترودوبلکس بودند، تعیین توالی شدند که از متDNA استفاده شد به این منظور ۲ بار PCR انجام شد، PCR اول یک PCR معمولی بودکه محصول خالص سازی شده آن برای PCR دوم که مخصوص سکانس

تشخیص سندروم برنارد - سولیر بر اساس کاهش تعداد پلاکت‌ها همراه با افزایش اندازه آن‌ها، افزایش مدت زمان خونری و عدم پاسخدهی پلاکت‌ها در مقابل ریستوتستین و عدم تصحیح آن با افزودن پلاسمای نرمال صورت می‌گیرد، در تأیید تشخیص سندروم برنارد - سولیر مشاهدات اگریگومتری بایستی با انجام تست‌های بیوشیمیایی شامل اندازه گیری میزان GP Ib-IX-V و زنجیره‌های تشکیل دهنده آن در سطح پلاکت توسط فلوسیتومتری و یا ایمنوبلات و در نهایت با مطالعات ژنتیکی تأیید شودتا دقیقاً عامل اختلال عملکردی پلاکت تعیین شود.<sup>(۶)</sup>

در ایران تا کنون هیچ مطالعه ژنتیکی بروی بیماران برنارد - سولیر انجام نشده بود. مطالعه ژنتیکی این بیماران جهت تشخیص قطعی بیماری، تعیین ناقلين، تشخیص قبل از تولد، کمک به تکمیل بانک جهانی ژن و ارائه روشی برای مطالعه این نواقص در آینده ضروری به نظر می‌رسید. از آن جا که زنجیره GP Ib $\alpha$  نقش اتصال به لیگاند را عهد دار می‌باشد و بیشترین موتاسیون‌های گزارش شده در این زنجیره بوده است به عنوان اولین گام، بررسی نواقص مولکولی زنجیره GP Ib $\alpha$  در این بیماران را شروع کردیم.

## روش کار

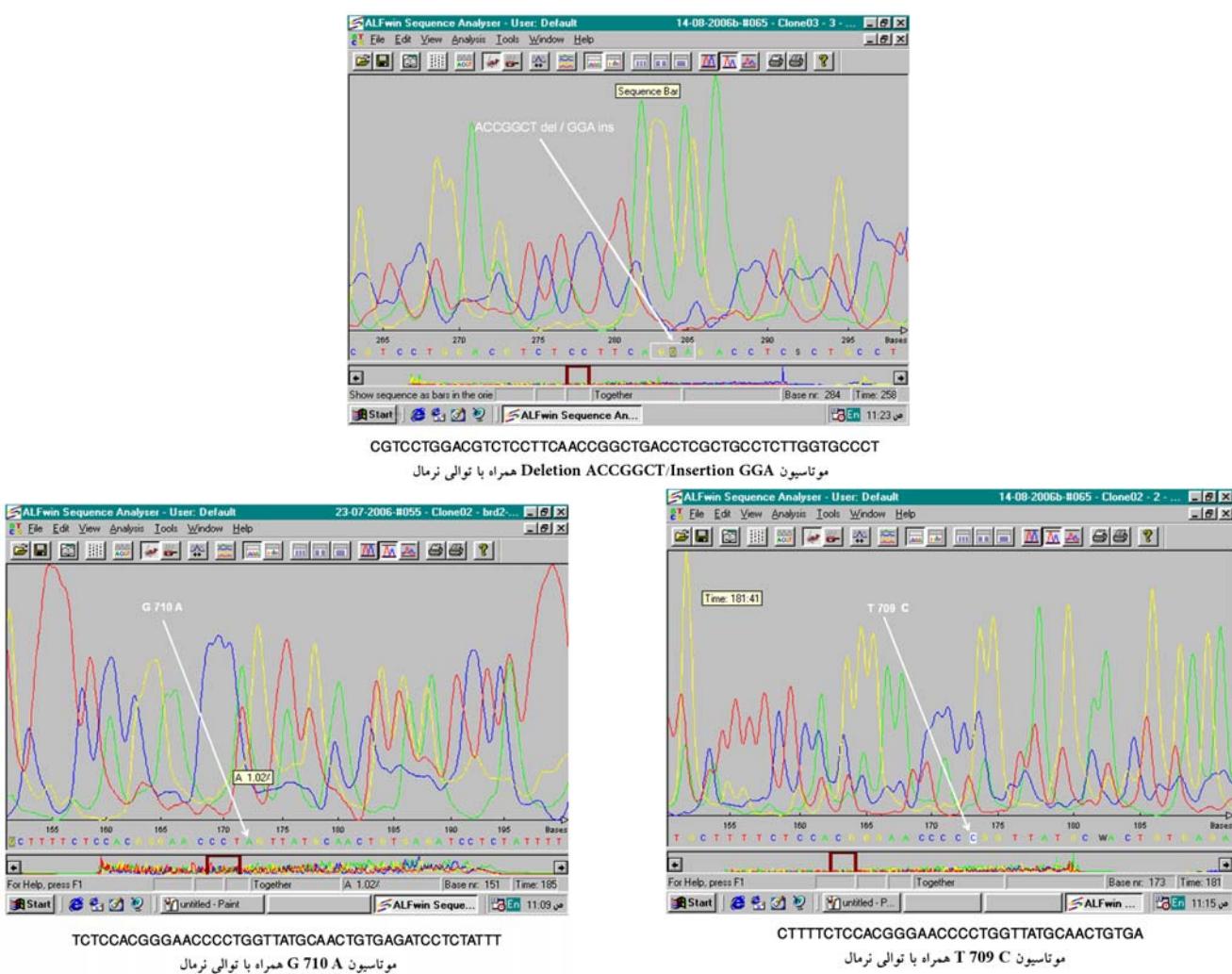
با کمک گرفتن ازبانک اطلاعاتی بیماری‌های خونریزی دهنده درمانگاه جامع هموفیلی، بیماران دارای سندروم برنارد - سولیر شناسایی و تعداد ۱۲ بیمار انتخاب گردید. تشخیص بیماری بر پایه مطالعات فنوتیپی شامل شمارش پلاکت، بررسی مورفولوژیک لام محیطی و عدم پاسخدهی پلاکت‌ها به ریستوتستین در حضور پلاسمای نرمال صورت گرفته بود. از بیماران و خانواده آنها، میزان ۱۵ میلی لیتر خون در ضد انعقاد (Ethylene Diamine Na<sub>2</sub>EDTA) جمع آوری شد و DNA ژنومی با Tetra Acetic Acid (TAA) استفاده از روش دستی پروتئیناز K، سدیم دودسیل سولفات، استات آمونیوم اشباع و بافر لیز گلبول‌های سفید

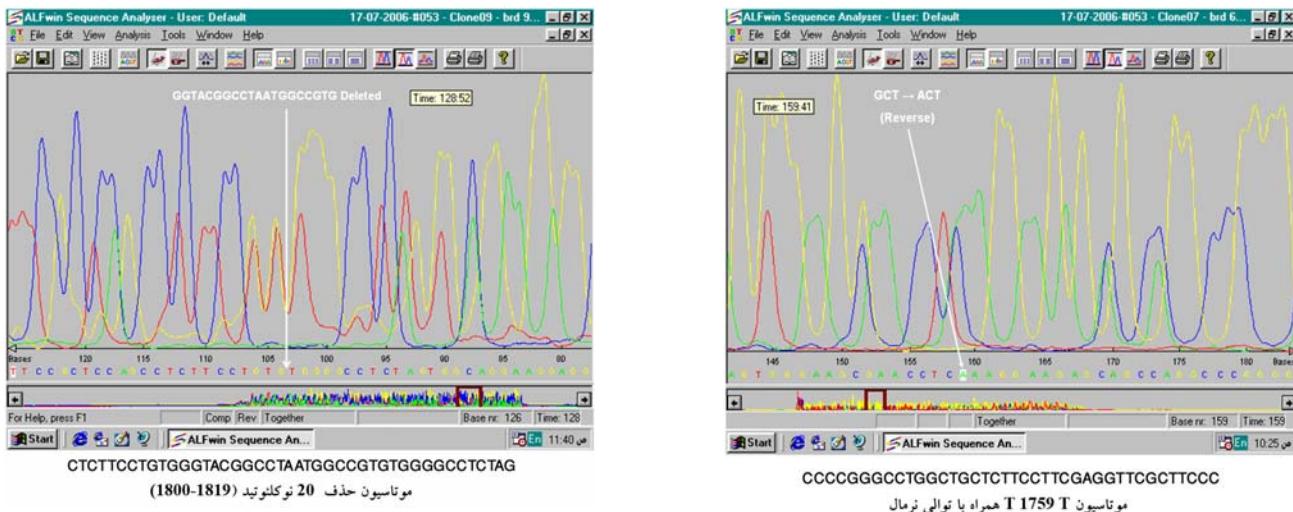
## یافته‌ها

یک بیمار در قطعه ۲، دو بیمار در قطعه ۳ و دو بیمار هم در قطعه ۵ دارای هترودوبلکس در ژل CSGE بودند که تعیین توالی شدند. بررسی این توالی‌ها با توالی نرمال، حضور ۵ جهش جدید در زن GP Iba $\alpha$  را نشان داد که این جهش‌ها (شکل شماره ۱) شامل موارد زیر می‌باشد: حذف ACCGGCT و جایگزینی GGA بین A<sub>T<sub>۷۹</sub></sub> و نوکلئوتیدهای ۴۲۵-۴۱۹، جهش‌های نقطه‌ای C<sub>T<sub>۷۶</sub></sub> و حذف C<sub>T<sub>۷۵</sub></sub> و نوکلئوتید در موقعیت ۱۸۱۹-۱۸۰۰. جهش‌های شناسایی شده بوسیله روش RFLP و به ترتیب با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده BsiYI، BsiYI، TaqI، ECORII، MspI بررسی و تایید شدند.

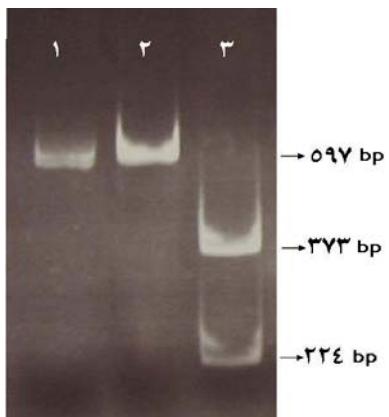
است مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام PCR و خالص سازی محصول آن از کیت شرکت سیگما و کیاژن استفاده شد. برای تعیین توالی از دستگاه Pharmasia Amersham ALF express sequence analysis استفاده گردید.

با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner، الگوی تغییرات برش توسط آنزیم‌های محدود کننده بررسی، آنزیم مناسب انتخاب و تکنیک RFLP برای موتاسیون‌های یافته شده طراحی و انجام شد. حضور موتاسیون می‌تواند با تغییر توالی زن، الگوی برش را تغییر دهد که از این روش برای ردیابی و تایید حضور موتاسیون استفاده شد.



شکل شماره ۱- حضور ۵ جهش جدید در زن GP Iba $\alpha$ 

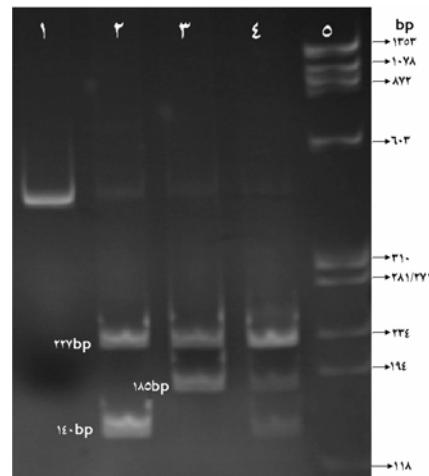
موتاسیون C<sub>7.9</sub> باعث ایجاد یک محل برش برای آنزیم MspI در موقعیت ۲۲۴ در قطعه ۳ می‌شود. در حالی که قطعه سالم محل برشی برای این آنزیم وجود ندارد. بنابراین با هضم آنزیمی قطعه سالم یک قطعه ۵۹۷ حاصل می‌شود. در حالی که با هضم آنزیمی قطعه موتانت دو قطعه ۲۲۴ و ۳۷۳ حاصل می‌شود (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون C<sub>7.9</sub> توسط MspI. شماره ۱ محصول هضم نشده، شماره ۲ نمونه فرد سالم، شماره ۳ نمونه فرد بیمار (هموزیگوت) را نشان می‌دهد. طول قطعه ۵۹۷ جفت باز است که از هضم آنزیمی آن در فرد دارای موتاسیون دو قطعه ۳۷۳ و ۲۲۴ حاصل می‌شود در حالی که در فرد سالم قطعه ۵۹۷ جفت بازی دست نخورده باقی می‌ماند.

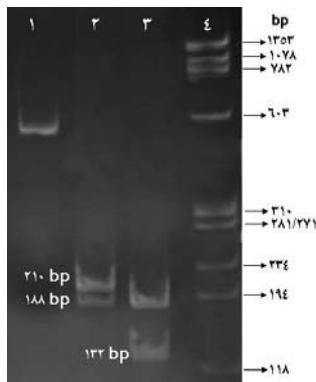
موتاسیون A<sub>7.1</sub> باعث حذف یک محل برش در قطعه ۳ (۲۲۲) می‌شود. از هضم آنزیمی قطعه سالم ۵ قطعه ۲۶، ۲۶، ۱۳۹، ۷۵، ۱۶۱ و ۱۹۶ جفت بازی

موتاسیون Del ACCGGCT/Ins GGA باعث حذف یک محل برش آنزیم BsiYI در موقعیت ۳۲۱ قطعه ۲ می‌شود. هضم آنزیمی قطعه سالم، ۴ قطعه به اندازه های ۴۸<sup>bp</sup>, ۴۵<sup>bp</sup>, ۲۲۷<sup>bp</sup>, ۱۴۰<sup>bp</sup> و نتیجه هضم آنزیمی قطعه موتانت ۳ قطعه ۴۸<sup>bp</sup>, ۴۵<sup>bp</sup>, ۲۲۷<sup>bp</sup>, ۱۸۵<sup>bp</sup> و ۱۸۵<sup>bp</sup> باشد (شکل شماره ۲). با توجه به اینکه در حرکت الکتروفورز قطعه ۴<sup>bp</sup> با هم حرکت می‌کند، انتظار می‌رود در ژل الکتروفورز قطعه سالم ۳ باند ۴۸<sup>bp</sup>, ۱۴۰<sup>bp</sup>, ۲۲۷<sup>bp</sup>, ۱۸۵<sup>bp</sup> و ۱۸۵<sup>bp</sup> مشاهده شود و در قطعه موتانت ۳ باند ۴۸<sup>bp</sup>, ۲۲۷<sup>bp</sup> مشاهده شود. طول قطعه هضم نشده ۴۶۱ جفت باز می‌باشد.



شکل شماره ۲- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون ACCGGCT del / GGA ins توسط BsiYI. شماره ۱ محصول هضم نشده، شماره ۲ سالم، شماره ۳ بیمار (هموزیگوت)، شماره ۴ والد بیمار (هتروزیگوت) و شماره ۵ مارکر می‌باشد. قطعه ۴<sup>bp</sup> از ژل بیرون رفته و همان طور که مشاهده می‌شود فرد بیمار دارای دو قطعه ۲۲۷ و ۱۸۵ و فرد نرمال دارای دو قطعه ۲۲۷ و ۱۴۰ جفت بازی می‌باشد.

با حذف ۲۰ نوکلئوتید در موقعیت ۱۸۰۰-۱۸۱۹ طول قطعه موتانت ۵۶۵ نوکلئوتید می‌شود که باعث تغییر الگوی آنزیم<sub>1</sub> Bsiy می‌شود. قطعه سالم دو محل برش در موقعیت‌های ۱۸۷ و ۳۷۵ دارد که از هضم آنزیمی آن ۳ قطعه ۱۸۷، ۱۸۸ و ۲۱۰ حاصل می‌شود. قطعه موتانت سه محل برش در موقعیت‌های ۴۲۳، ۳۷۵ و ۱۸۷ دارد که از هضم آنزیمی آن چهار قطعه ۵۸، ۱۸۷ و ۱۳۲ و ۱۸۸ حاصل می‌شود (شکل شماره ۶). قطعه ۱۸۷ و ۱۸۸ قابل تفکیک از هم نبوده و انتظار می‌رود قطعه سالم دو باند ۱۸۷ و ۲۱۰ داشته باشد و قطعه موتانت ۳ باند ۵۸، ۱۳۲ و ۱۸۷ داشته باشد. به هنگام الکتروفورز، قطعه ۵۸ جفت بازی از ژل بیرون رفته، در بیمار دو قطعه ۱۳۲ و ۱۸۷ جفت بازی و در نرمال دو قطعه ۱۸۷ و ۲۱۰ جفت بازی مشاهده می‌شود.

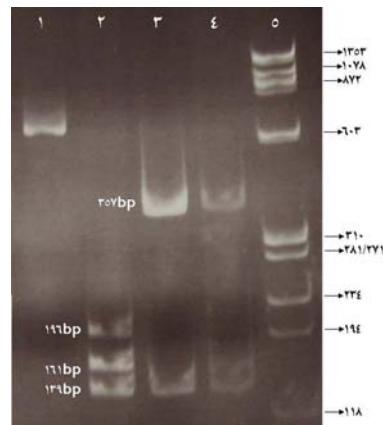


شکل شماره ۶- هضم آنزیمی قطعه دارای حذف ۲۰ نوکلئوتید را توسط Bsiy نشان می‌دهد. شماره ۱ نمونه هضم نشده، شماره ۲ نرمال، شماره ۳ بیمار و شماره ۴ مارکر می‌باشد. در نرمال دو قطعه ۱۸۸ و ۲۱۰ جفت بازی و در بیمار دو قطعه ۱۳۲ و ۱۸۸ جفت بازی مشاهده می‌شود.

## بحث و نتیجه‌گیری

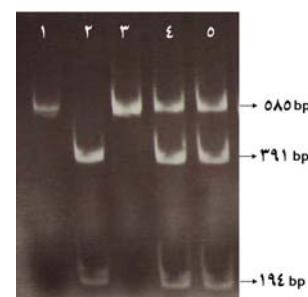
۵ موتاسیون شناسایی شده در این مطالعه جدید بوده و برای اولین بار گزارش می‌شود. حذف ACCGGCT و جایگزینی GGA بین نوکلئوتیدهای ۴۱۹-۴۲۵ در ناحیه کد کننده دومن خارج سلولی اتفاق افتاده است. با توجه به حذف ۷ نوکلئوتید

حاصل می‌شود و از هضم آنزیمی قطعه موتانت ۴ قطعه ۷۵، ۱۳۹ و ۳۵۷ (شکل شماره ۴). قطعه‌های ۲۶ و ۷۵ جفت بازی هنگام الکتروفورز از ژل بیرون رفته، در فرد سالم قطعات ۱۶۱، ۱۶۱ و ۱۳۹ مشاهده می‌شود در حالی که در فرد بیمار قطعات ۳۵۷ و ۱۳۹ جفت بازی مشاهده می‌شود.



شکل شماره ۴- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون G<sub>۱۱.A</sub> توسط EcorII. شماره ۱ نمونه هضم نشده، شماره ۲ نمونه فرد سالم، شماره ۳ و ۴ نمونه بیمار می‌باشند و شماره ۵ مارکر. باندهای ۲۶ و ۷۵ جفت بازی از ژل بیرون رفته و در نتیجه در قطعه سالم باندهای ۱۶۱، ۱۶۱ و ۱۳۹ جفت بازی و قطعه موتانت باند های ۳۵۷ و ۱۳۹ بازی مشاهده می‌شود.

موتاسیون C<sub>۱۷۵۹.T</sub> باعث حذف یک محل برش Taq<sub>1</sub> در قطعه سالم را در ۳۹۱ برش داده ولی قدر به برش در قطعه موتانت نمی‌باشد (شکل شماره ۵).



شکل شماره ۵- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون C<sub>۱۷۵۹.T</sub> توسط Taq<sub>1</sub>. را نشان می‌دهد. شماره ۱ نمونه هضم نشده، شماره ۲ نمونه فرد سالم، شماره ۳ نمونه فرد بیمار (هموزیگوت)، شماره‌های ۴ و ۵ نمونه والدین بیمار می‌باشند. فرد سالم دارای دو باند ۳۹۱ و ۱۹۴ جفت بازی بوده در حالی که بیمار تنها دارای باند ۵۸۵ می‌باشد. افراد هتروزیگوت (والدین) هر سه باند ۳۹۱، ۵۸۵ و ۱۹۴ جفت بازی را دارا هستند.

پروتئین‌های دارای توالی‌های غنی از لوسین نشان می‌دهد و مطرح می‌کند که تغییر هیدروفوبیسیتی به دلیل جایگزینی اسید آمینه‌های هیدروفیل در این منطقه باعث ناپایداری زنجیره و اختلال در عملکرد آن می‌شوند.<sup>(۷)</sup> این موتاسیون باعث ایجاد یک محل برش برای Msp<sub>1</sub> می‌شود که می‌توان پایه طراحی روش RFLP قرار داده شود و از آن برای تشخیص بیماری در افراد وابسته و تعیین ناقلين و تشخیص قبل از تولد در بستگان بیمار استفاده کرد.

موتاسیون G<sub>71</sub>.A که یک جهش پوج است، باعث تغییر TGG کدون تریپتوفان ۲۰۷ به کدون خاتمه گر GP می‌شود که در نتیجه این موتاسیون زنجیره TAG ناقصی سنتز می‌شود که ۲۰۶ اسید آمینه طول داشته و فاقد توالی‌های سیتوپلاسمی، توالی داخل غشایی و دومن ماکروگلیکوپپتید می‌باشد. این زنجیره ناقص قادر به ایجاد ارتباط با سایر زنجیره‌ها نبوده، قرار گیری آن در سطح غشا پلاکت مختل می‌شود. بنابر این انتظار می‌رود زنجیره پس از سنتز تجزیه شود. مطالعات بیوشیمیایی و بیان سلولی برای درک بهتر این موتاسیون لازم است. این موتاسیون باعث حذف یک محل برش برای آنزیم EcorII می‌شود که می‌تواند پایه طراحی روش RFLP برای پیگیری موتاسیون در سایر افراد وابسته و تعیین ناقلين قرار گیرد.

موتاسیون C<sub>۱۷۵</sub>T هم یک نوع موتاسیون پوج است که باعث تغییر CGA کدون آرژنین ۵۵۷ به TGA کدون GP خاتمه گر می‌شود و توالی سیتوپلاسمی زنجیره Ibα را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نتیجه این موتاسیون زنجیره پلی پپتیدی ناقصی سنتز می‌شود که ۵۵۶ اسید آمینه طول دارد این زنجیره ناقص واجد دومن‌های خارج سلولی و داخل غشایی بوده اما بخشی از توالی سیتوپلاسمی آن حذف شده است. قسمت حذف شده توالی لازم برای اتصال به فیلامان و پروتئین‌های ۳-۱۴-۳ می‌باشد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که

و جایگزینی ۳ نوکلئوتید دیگر قالب توالی‌های کد کننده برای زنجیره GP Ibα تغییر کرده و زنجیره پس از ۲۱ اسید آمینه به انتها می‌رسد. زنجیره موتانت ۱۳۰ اسید آمینه داشته و نسبت به زنجیره سالم ۴۸۰ اسید آمینه کمتر طول دارد. در نتیجه این زنجیره ناقص بوده، و به نظر می‌رسد پس از سنتز، قادر به برقراری ارتباط با سایر زنجیره‌ها نبوده و باعث عدم شکل گیری کمپلکس در سطح سلول می‌شود. این موتاسیون باعث حذف یک محل برش برای آنزیم Bs1 می‌گردد که می‌تواند پایه طراحی RFLP برای رد یابی این موتاسیون باشد.

موتاسیون C<sub>۷۹</sub>T باعث تغییر کدون ۲۰۷ به TGG می‌شود که در نتیجه آن اسید آمینه آرژنین جایگزین تریپتوفان می‌شود. موتاسیون از نوع جایگزین تریپتوفان می‌شود. موتاسیون آسید آمینه Missence mutation بوده و جایگزینی اسید آمینه آرژنین به جای تریپتوفان باعث اختلال در ساختمان فضایی زنجیره GP Ibα شده به نحوی که عملکرد ۲۰۷ و احتمالاً پایداری آن را مختل می‌کند. تریپتوفان ۲۰۷ در داخل ساختار لوپ دی سولفیدی و توالی‌های غنی از لوسین قرار داشته و در این منطقه با ۷ اسید آمینه احاطه کننده آن که ۴ تای آن‌ها در داخل آخرین توالی غنی از لوسین و ۳ تای آن‌ها در درون لوپ دی سولفیدی قرار گرفته اند در ارتباط بوده که این ارتباط از نوع هیدروفوبیک بوده و جایگزینی تریپتوفان ۲۰۷ با سایر اسید آمینه‌های غیر هیدروفوب باعث بهم خوردن این ارتباط شده و در نتیجه زنجیره تا خورده‌گی غیر طبیعی پیدا کرده و به تسريع تجزیه زنجیره و ناپایداری آن منجر می‌شود.<sup>(۷)</sup> تریپتوفان یک اسید آمینه حفظ شده (Conserved) بوده و در هر چهار زنجیره تشکیل دهنده کمپلکس دیده می‌شود. به علاوه در سایر پروتئین‌های خانواده دارای تکرارهای غنی از لوسین هم در این موقعیت تریپتوفان یا سایر اسید آمینه‌های هیدروفوب مثل لوسین یا فنیل آلانین قرار می‌گیرد که همین امر اهمیت این اسید آمینه را در حفظ ساختار و عملکرد

سیتوپلاسمی زنجیره Iba $\alpha$  GP، ممکن است باعث تغییرهیدروفوبیسیتی زنجیره شود که نیاز به بررسی بیوشیمیایی و تعیین میزان هیدروفوبیسیتی با استفاده از نرم افزارهای موجود مثل Genepro software دارد. شبیه به سایر موتاسیون‌های شناسایی شده در این مطالعه، این موتاسیون جدید بوده و در مطالعات قبلی در نقاط مختلف دنیا گزارش نشده است. به علاوه این موتاسیون به همراه  $T_{75^{\circ}C}$  اولین موتاسیون‌های GP Iba $\alpha$  Deletion می‌باشد و همین طور این موتاسیون اولین mutation در دومن سیتوپلاسمی زنجیره Iba $\alpha$  GP می‌باشد. حضور این موتاسیون باعث تغییر الگوی برش آنزیم محدود کننده  $BsiY$  می‌شود که می‌تواند پایه طراحی روش RFLP برای رد یابی این موتاسیون در بستگان بیمار قرار گیرد.

بسیاری از اطلاعات ما در مورد نقش موتاسیون‌ها بر عملکرد کمپلکس، از مطالعه بیماران برنارد- سولیر حاصل شده است. از آن جا که تا کنون در دومن سیتوپلاسمی موتاسیونی گزارش نشده بود، اطلاعات خاصی راجع به نقش این موتاسیون‌ها از بیماران برنارد سولیر بدست نیامده است. برای درک بهتر نقش این موتاسیون‌ها در عرضه و بیان کمپلکس مطالعات بیوشیمیایی و بیان سلولی ضروری می‌باشد که از محدودیت‌های این پژوهش بوده و امید است پژوهش انجام شده بسترهای این کار فراهم آورد. همچنین در مورد بیمارانی که در ژن زنجیره GP Iba $\alpha$  دارای موتاسیون نبودند بررسی ژن سایر زنجیره‌ها ضروری بوده که در این مطالعه به آن پرداخته نشده است.

در این مطالعه نقایص مولکولی ژن زنجیره GP Iba $\alpha$  مورد مطالعه قرار گرفت و ۵ موتاسیون جدید که در سایر مطالعات شناسایی نشده بود، شناسایی گردید. برای هر کدام از موتاسیون‌ها (Restriction) RFLP

ارتباط توالی سیتوپلاسمی زنجیره‌های تشکیل دهنده کمپلکس با پروتئین‌های ۱۴-۳-۲ نقش تنظیم کننده عملکرد کمپلکس را بر عهده دارند. به علاوه ارتباط این توالی‌ها با فیلامان باعث حفظ سیتواسکلتون سلولی و تنظیم فعالیت کمپلکس می‌شود.<sup>(۸-۱۲)</sup> با توجه به این که در این بیمار توالی C ترمینال زنجیره GP Iba $\alpha$  حاوی محل‌های اتصال برای پروتئین ۱۴-۳-۲ و فیلامان A حذف شده است، ارتباط کمپلکس با سیتواسکلتون سلولی به هم می‌خورد و به علاوه روند انتقال پیام مختل شده و کمپلکس قادر به برقراری پیام‌های ناشی از اتصال دومن خارج سلولی به لیگاندها نمی‌باشد. این مطالب نشان می‌دهد که موتاسیون باعث اختلال در عملکرد کمپلکس شده و روند وقایع انتقال پیام و ارتباط آن با سیتواسکلتون سلولی را مختل می‌کند. این موتاسیون باعث حذف یک محل برش برای آنزیم محدود کننده  $TaqI$  می‌شود که می‌تواند پایه طراحی روش RFLP قرار گیرد و در تعیین ناقلین مورد استفاده قرار گیرد.

حذف ۲۰ نوکلئوتید در موقعیت ۱۸۱۹-۱۸۰۰ باعث سنتز زنجیره ناقصی می‌شود که ۵۹۷ اسید آمینه طول داشته و زنجیره پس از سنتز ۲۹ اسید آمینه جدید به پایان می‌رسد. این زنجیره ناقص ۱۳ اسید آمینه کوتاه‌تر از زنجیره اصلی بوده و توالی C ترمینال آن به طول ۲۹ اسید آمینه از توالی C ترمینال زنجیره سالم متفاوت است. مطالعات Invitro نشان داده شده است که حذف C ترمینال زنجیره GP Iba $\alpha$  که حاوی Ser ۶۰۹ است، محل اتصال با تمایل بالا برای پروتئین ۱۴-۳-۲ بوده و اتصال این پروتئین به توالی C ترمینال زنجیره GP Iba $\alpha$  تنظیم کننده عملکرد کمپلکس است.<sup>(۱۲-۱۳)</sup> بنابر این انتظار می‌رود این جهش ارتباط پروتئین‌های ۱۴-۳-۲ و فیلامان به دومن سیتوپلاسمی کمپلکس را مختل کرده و در نتیجه کمپلکس عملکرد خود را از دست بدهد. به علاوه افزوده شدن ۲۹ اسید آمینه جدید در توالی

## تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی کد ۳۰۶/پ انجام گردیده است که بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر نویسندها اعلام می‌گردد.

Fragment Length Polymorphism طراحی و انجام شد. معرفی روش مطالعه این ژن و شناسایی نواعص مولکولی آن می‌تواند آغاز تشخیص‌های مولکولی، تعیین ناقلين و کمک به تکمیل بانک اطلاعات بیماری‌های خونریزی دهنده نادر در کشور باشد.

## فهرست منابع

1-Afshar-Kharghan V, Lo'pez JA. Bernard-Soulier syndrome caused by a dinucleotide deletion and reading frame shift in the region encoding the glycoprotein Iba transmembrane domain. *Blood*. 1997; 90: 2634-643

2-Sachs UJH, Kroll H, Matzdorff AC, Berghofer H, Lopez JA, Santoso S. Bernard-Soulier syndrome due to the homozygous asn-45ser mutation in GPIX: an unexpected, frequent finding in Germany. *Brit J Haemat*. 2003; 123: 127-31

3-Rivera CE, Villagra J, Riordan M, Williams S, Lindstrom KJ, Rick ME. Identification of a new mutation in platelet glycoprotein IX in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haem*. 2001; 112: 105-8

4-Drouin J, Carson NL, Laneuville O. Compound heterozygosity for a novel nine-nucleotide deletion and the Asn45Ser missense mutation in the glycoprotein IX gene in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *AmJ Hematol*. 2005; 78(1):41-48

5-Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt M.C. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 1998; 91: 4397-418

6-Provan A, Gribben J. Molecular hematology. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Blackwell science; 2005. p. 210-17

7-Rosenberg N, Lalezari S, Landau M, Shenkman B, Seligsohn U, Izraeli S. Trp207Gly in platelet glycoprotein Iba is a novel mutation which disrupts the

connection between the leucine-rich repeat domain and the disulfide loop structure and causes Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 378-86

8-Mangin P, David T, Lavaud V, Cranmer SL, Pikovski I, Jackson SP, et al. Identification of a novel 14-3-3 $\zeta$  binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ib $\zeta$ . *Blood*. 2004; 104: 420-27

9-Feng S, Christodoulides N, Resendiz JC, Berndt MC, Kroll H. Cytoplasmic domains of GpIba and GpIbb regulate 14-3-3 $\zeta$  binding to GpIb/IX/V. *Blood*. 2000; 95: 551-57

10-Berndt MC, Cranmer SL, Andrews RK. Filamin a interaction with GpIb: the platelet shapes up. *Blood*. 2006; 107: 1745

11-Bodnar RJ, Xi X, Li Z, Berndt MC, Du X. Regulation of glycoprotein Ib-IX-von Willebrand factor interaction by cAMP-dependent protein kinase mediated phosphorylation at Ser 166 of glycoprotein Ib beta. *J Biol Chem*. 2002; 277: 47080-87

12-Bodnar RJ, Gu M, Li Z, Englund GD, Du X. The cytoplasmic domain of the platelet glycoprotein Ib $_a$  is phosphorylated at serine609. *J Biol Chem*. 1999; 274: 33474-479

13-Dai K, Bodnar RJ, Berndt MC, Du X. A critical role for 14-3-3 $\zeta$  protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications. *Blood*. 2005; 106: 1975-981

# *Identification of Five Novel Mutations in Platelet GPIb $\alpha$ Gene among Iranian Bernard-Soulier Patients*

**S.A. Taghavi, MSc<sup>I</sup>**    \* **A. Kazemi, PhD<sup>II</sup>**    .Rastegar Lari, PhD<sup>III</sup>  
**F. Ala, MD<sup>IV</sup>**    M. Rasoolzadegan, BSc<sup>V</sup>

## *Abstract*

**Background & Aim:** Bernard-Soulier syndrome (B.S.S) is a rare hereditary bleeding disorder due to molecular defects of platelet GPIb-IX-V. The GPIb-IX-V complex is composed of four chains of GPIba, GPIb $\beta$ , GPIX and GPV. The largest chain of this complex is GPIba and is responsible for binding to ligand and most of identified mutations belong to this glycoprotein. The aim of this study was to identify the molecular defects of GPIba gene in Iranian Bernard-Soulier patients.

**Patients and Method:** Twelve Bernard-Soulier patients were selected from data base of bleeding disorders in Comprehensive Clinic of Iranian Hemophilia Center. Diagnostic criteria for B.S.S were based on phenotypic analysis such as platelet counts, inspection of peripheral blood smear and lack of response to restocetin agonist. Genomic DNA was isolated from blood leukocytes of the patients and their parents. The entire amino acid coding region in exon 2 from GPIba was divided into five overlapping fragments and PCR amplification was done. Finally, sequence analysis of the coding regions that contain DNA heteroduplexes in CSGE gels was performed.

**Results:** Sequence analysis revealed five novel mutations in GPIba. The mutations include ACCGGCT deletion, GGA insertion in 419-425 position, missense mutations in T709C, G710A and C1759T, and the deletion of 20 nucleotides in 1800-1819 position. All five novel mutations were registered in International Gene Bank and for each mutation RFLP (restriction fragment length polymorphism) design was created.

**Conclusion:** In the present study, the molecular defects of GPIba gene was investigated and five novel mutations were identified among Iranian BSS patients.

**Key Words:** 1) **Bernard-Soulier Syndrome**    2) **Glycoprotein Iba**  
                   3) **Sequence Analysis**                  4) **Mutation**

This research was financed by Iran University of Medical Sciences and Health Services.

I) MSc in Hematology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

II) Associate Professor of Hematology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (\*Corresponding Author)

III) Assistant Professor of Hematology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

IV) Subspecialist in Clinical Hematology. Comprehensive Clinic of Iranian Hemophilia center. Tehran, Iran.

V) BSc in Chemistry. Comprehensive Clinic of Iranian Hemophilia center. Tehran, Iran.