دانشکده پزشکی

گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی

عنوان:

بررسی جهش‌های نقطه‌ای شایع اگزون های ۴ و ۸ و اینترون ۲ ژن CYP21A2 در بیماران مبتلا به هیپرپلازی مادرزادی آدرنال(CAH) در استان اصفهان

شماره طرح تحقیقاتی:

۳۹۲۲۶۴

نویسنده:

مهسا کلاهدوز

تحت راهنمایی:

دکتر حسین خان احمد، دکتر مهین هاشمی پور، دکتر بهاره ربانی

تحت مشاوره:

دکتر منصور صالحی

اسفند ماه ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: هیپرپلازی مادرزادی آدرنال (Congenital Adrenal Hyperplasia,CAH) یکی از بیماری‌های شایع با الگوی مغلوب اتوزومی است. این بیماری به علت جهش در ژن کد کننده آنزیم ۲۱-هیدروکسیلاز ایجاد می شود. ژن ۲۱-هیدروکسیلاز (CYP21A2) دارای ژن کاذب بوده و بسیاری از جهش های شایع این ژن بر روی ژن کاذب وجود دارد. در این مطالعه هدف ما بررسی شیوع چهار موتاسیون نقطه‌ای شایع در اگزون های ۴ و ۸ و اینترون ۲ ژن CYP21A2 در بیماران مبتلا به فرم غیر کلاسیک هیپرپلازی مادرزادی آدرنال(CAH) در استان اصفهان است.

روش: تعداد ۳۰ بیمار مبتلا به فرم غیر کلاسیک CAH با شواهد آزمایشگاهی و کلینیکی انتخاب شدند و رضایت نامه حاوی اطلاعات را تکمیل نمودند . PCR اولیه مختص به ژن با هدف تکثیر ژن بدون آلودگی به ژن کاذب انجام شد و محصول این مرحله از PCR برای انجام روش ARMS-PCR در جهت شناسایی چهار موتاسیون شایع به کار گرفته شد. سپس جهش‌های شناسایی شده تعیین توالی شدند.

نتایج: در این مطالعه دو بیمار هتروزیگوت برای جهش I2G و شش بیمار هتروزیگوت برای جهش Q318X گزارش شدند. این موتاسیون‌ها با فرم کلاسیک CAH همراهی دارد ولی افراد هتروزیگوت برای این جهش‌ها، در این مطالعه فرم غیر کلاسیک را با علائمی مانند بلوغ زودرس و پرمویی نشان می‌دهند. نتایج ARMS-PCR در دو مورد با نتایج تعیین توالی هماهنگی نداشت و در حالی که ARMS-PCR نشانگر هموزیگوت موتانت بود نتایج تعیین توالی بیانگر هتروزیگوت بودن این دو بیمار بود.

بحث: بین نوع موتاسیون و فرم کلینیکی بیماری شامل شکل کلاسیک و غیر کلاسیک همبستگی وجود دارد. در حالیکه جهش‌های I2G و Q318X در حالت هموزیگوت با فرم کلاسیک مرتبط هستند، در این گزارش اشکال هتروزیگوت این جهش‌ها با فرم غیر کلاسیک CAH همبستگی داشتند. تشخیص CAH با علائم غیر کلاسیک و اندازه‌گیری ۱۷-هیدروکسی پروژسترون روش قابل اعتمادی نیست و تشخیص صحیح نیازمند آنالیزهای مولکولی است. از طرفی نتایج حاصل از روش های غربالگری مانند ARMS-PCR حتما باید با تعیین توالی تایید گردد.

کلمات کلیدی: هیپرپلازی مادرزادی آدرنال، *CYP21A2*، نقص ۲۱-هیدروکسیلاز

فهرست

فصل اول- مقدمه----------۱

۱-۱ خلاصه پروژه----------۲

۱-۲ بیان مساله----------۴

۱-۳ اهداف و سوالات پژوهشی----------۷

فصل دوم- مواد و روش‌ها----------۱۰

۲-۱ انتخاب بیماران----------۱۱

۲-۲ نمونه‌گیری از بیماران----------۱۱

۲-۳ استخراج DNA----------۱۱

۲-۴ پروتکل استخراج DNA با استفاده از کیت Genet Bio----------۱۱

۲-۵ جداسازی ژن فعال از ژن کاذب----------۱۲

۲-۶ تهیه و آماده‌سازی پرایمرها برای مطالعه----------۱۳

۲-۷ بررسی جهش‌های نقطه‌ای با استفاده از روش ARMS-PCR----------۱۴

۲-۸ توالی‌یابی با روش سکانس مستقیم----------۱۷

۲-۹ تجزیه و تحلیل نتایج----------۱۷

فصل سوم- نتایج و یافته‌ها----------۱۸

۳-۱ نتیجه نمونه گیری----------۱۹

۳-۲ نتایج حاصل از جداسازی ژن از ژن کاذب----------۱۹

۳-۳ نتایج حاصل از ARMS-PCR----------۲۰

۳-۴ نتایج حاصل از توالی‌یابی----------۲۴

فصل چهارم- بحث و نتیجه‌گیری----------۲۶

۴-۱ بحث----------۲۷

۴-۲ نتیجه گیری----------۲۹

۴-۳ پیشنهادات----------۳۰

منابع----------۳۱

ضمائم----------۳۴

فهرست جداول و شکل‌ها

شکل۱-۱ مسیر بیوسنتز استروئیدها----------۲

شکل۲-۱ دو PCR همپوشان برای جدا کردن ژن از ژن کاذب با پرایمرهای مختص به ژن----------۱۳

جدول۲-۱ پرایمرهای مختص به ژن برای تکثیر ژن جداکردن ژن از ژن کاذب----------۱۳

جدول۲-۲ پرایمرهای مختص به جهش برای روش ARMS PCR ----------۱۴

شکل۳-۱ PCR قسمت اول ژن برای جداسازی ژن از ژن کاذب با ladder 1kb شرکت فرمنتاس برای ۵ بیمار به همراه کنترل منفی---۱۹

شکل۳-۲ PCR قسمت دوم ژن برای جداسازی ژن از ژن کاذب با ladder mix شرکت فرمنتاس برای دو بیمار به همراه کنترل منفی--۲۰

جدول۳-۱ اندازه قطعات حاصل از ARMS PCR برای چهار جهش بررسی شده----------۲۰

شکل۳-۳ نتایج بررسی جهش Q318X در نمونه‌های ۳ و ۲۳ به همراه کنترل مثبت و منفی با ladder mix شرکت فرمنتاس--------۲۱

شکل۳-۴ حالت هتروزیگوت جهش Q318X----------۲۲

شکل۳-۵ نتایج بررسی جهش I172N در نمونه‌ی ۲ به همراه کنترل مثبت و منفی با ladder mix شرکت فرمنتاس-----۲۲

شکل ۳-۶ حالت هموزیگوت سالم جهش I172N----------۲۲

شکل۳-۷ نتایج بررسی جهش I2G در نمونه‌های ۱۱و۲۰ و۲۱ به همراه کنترل مثبت و منفی با ladder mix شرکت فرمنتاس----۲۲

شکل۳-۸. حالت هتروزیگوت جهش I2G----------۲۲

شکل۳-۹ نتایج بررسی جهش R356W در نمونه‌ی ۲ به همراه کنترل مثبت و منفی با ladder mix شرکت فرمنتاس-۲۳

شکل۳-۱۰ حالت هوموزیگوت سالم جهش R356W---------- --۲۳

جدول۴-۱ فراوانی آللی چهار موتاسیون شایع بررسی شده در این مطالعه و سایر مطالعات قبلی----------۲۷

منابع

.1 Krone N, Braun A, Weinert S, Peter M, Roscher AA, Partsch C-J, et al. Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. Clinical chemistry. 2002;48(6):818-25.

.2 Kharrat M, Tardy V, M'RadR, Maazoul F, Jemaa LB, Refaï M, et al. Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism. 2004;89(1):368-74.

.3 Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986;83(9):2841-5.

.4 White PC, New MI, Dupont B. Adrenal 21-Hydroxylase Cytochrome P-450 Genes within the MHC Class III Region. Immunological reviews. 1985;87(1):123-50.

.5 White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocrine reviews. 2000;21(3):245-91.

.6 Pang S, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics. 1988;81(6):866-74.

.7 Krone N, Dhir V, Ivison HE, Arlt W. Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. Clinical endocrinology. 2007;66(2):162-72.

.8 Stenson PD, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Mort M, Cooper DN .The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalised genomics. Human genomics. 2009;4(2):69.

.9 Lee H-H, Chao H-T, Ng H-T, Choo K-B. Direct molecular diagnosis of CYP21 mutationsin congenital adrenal hyperplasia. Journal of medical genetics. 1996;33(5):371-5.

.10 Gonçalves J, Friães A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. Expert reviews in molecular medicine. 2007;9(1.23-1:(1

.11 Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, et al. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1999;84(3):960-6.

.12 Armengaud J-B, Charkaluk M-L, Trivin C, Tardy V, Bréart G, Brauner R, et al. Precocious pubarche: distinguishing late-onset congenital adrenal hyperplasia from premature adrenarche. Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism. 2009;94(8):2835-40.

.13 Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier M-B, Tardy V, Billaud L, Laborde K, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2009;94(5):1570-8.

.14 Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism. 2007;3(5):405-13.

.15 Wedell A. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. Acta Paediatrica. 1998;87(2):159-64.
.16 Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. Hormone Research in Paediatrics. 2007;67(2):53-60.
.17 White PC, New MI, Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1984;81(23):7505-9.
.18 Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implicationsfor genetic diagnosis and association with disease manifestation. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1994;78(5):1145-52.
.19 Therrell BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. Pediatrics. 1998;101(4):583-90.
.20 Pang S, MURPHEY W, LEVINE LS, SPENCE DA, LEON A, LAFRANCHI S, et al. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska .Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1982;55(3):413-20.
.21 Pang S, Shook MK. Current status of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. Current opinion in pediatrics. 1997;9(4):419.
.22 Mikami A, Fukushi M, Oda H, Fujita K, Fujieda K. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Sapporo City: sixteen years experience. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 1999;30:100.
.23 Lee H-H, Kuo J-M, Chao H-T, Lee Y-J, Chang J-G, Tsai C-H, et al. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in Chinese. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000;85(2):597-600.
.24 White P. Disorders of the adrenal glands. Nelson Textbook of Pediatrics Philadelphia: Saunsers Elsevier. 2007:2349-74.
.25 Grumbach MM. Disorders of sex differentiation. Williams textbook of endocrinology. 1992:853-951.
.26 Urban MD, Lee PA, Migeon CJ. Adult height and fertility in men with congenital virilizing adrenal hyperplasia. New England Journal of Medicine. 1978;299(25):1392-6.
.27 Premawardhana L, Hughes I, Read G, Scanlon M. Longer term outcome in females with congenital adrenal hyperplasia (CAH): the Cardiff experience. Clinical endocrinology. 1997;46(3):32-7
.32
.28 CLARK RV, ALBERTSON BD, MUNABI A, CASSORLA F, AGUILERA G, WARREN DW, et al. Steroidogenic enzyme activities, morphology, and receptor studies of a testicular adrenal rest in a patient with congenital adrenal hyperplasia. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1990;70(5):1408-13.
.29 Tusié-Luna M-T, White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995;92.800-10796:(23)
.30 Lee H. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. Clinical genetics. 2001;59(5):293-301.
.31 Stenson P, Ball E, Howells K, Phillips A, Mort M, Cooper D. The human gene mutation database: Providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics. human genomics. 2009;4:69-72.
.32 Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Human Reproduction Update. 2.85-469:(6)10;004
.33 Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism. 2000;85(3):1059-65.

.34 Wilson R, Mercado A, Cheng K, New M. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1995;80(8):2322-9.
.35 Stratakis CA, Rennert OM. Congenital adrenal hyperplasia: molecular genetics and alternative approaches to treatment. Critical reviews in clinical laboratory sciences. 1999;36(4):329-63.
.36 Gotoh H, Kusakabe M, Shiroishi T, Moriwaki K. Survival of steroid 21-hydroxylase-deficient mice withoutendogenous corticosteroids after neonatal treatment and genetic rescue by transgenesis as a model system for treatment of congenital adrenal hyperplasia in humans. Endocrinology. 1994;135(4):1470-6.
.37 Vakili R, Baradaran-Heravi A, Barid-Fatehi B, Gholamin M, Ghaemi N, Abbaszadegan MR. Molecular analysis of the CYP21 gene and prenatal diagnosis in families with 21-hydroxylase deficiency in northeastern Iran. Hormone Research in Paediatrics. 2005;63(3):119-24.
.38 Rabbani B, Mahdieh N, Ashtiani MTH, Larijani B, Akbari MT, New M, et al. Mutation analysis of the CYP21A2 gene in the Iranian population. Genetic testing and molecular biomarkers. 2012;16(2):82-90.
.39 Campos VC, Pereira R, Torres N, Castro Md, Aguiar-Oliveira MH. High frequency of Q318X mutation in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in northeast Brazil. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2009;53(1):40-6.
.40 Menabò S, Balsamo A, Baldazzi L, Barbaro M, Nicoletti A, Conti V, et al. Asequence variation in 3'UTR of CYP21A2 gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia. Journal of endocrinological investigation. 2012;35(3):298-305.

41. Rabbani B, Mahdieh N, Haghi Ashtiani MT, Akbari MT, Rabbani A. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia regarding CYP21A2 gene in Iran. Iran J Pediatr 2011;21 (2):139-149

42.Ramazani A, Kahrizi K, Razaghiazar M, Mahdieh N, Koppens P. The frequency of eight common point mutations in CYP21 gene in Iranian patients with congenital adrenal hyperplasia. Iran Biomed J 2008;12:49-53.

43. Parajes S, Quinteiro C, Dominguez F, Loidi L. High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: Implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. PLoS One 2008;3:e2138.

44.oayeri H, Rabbani A. Report of 285 patients with congenital adrenal hyperplasia and evaluation of approximate prevalence of the disease in Iran. Acta Medica Iranica 1999;37:102-105.

45.Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:1635-1640.

46.Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2766-2770.

47.Abrams ES, Murdaugh SE, Lerman LS. Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC clamp. Genomics 1990;7:463-475.

48. Keen-Kim D, Redman JB, Alanes RU, Eachus MM, Wilson RC, New MI, Nakamoto JM, Fenwick RG. Validation and clinical application of a locus-specific polymerase chain reaction- and minisequencing-based assay for congenital adrenal

hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). J Mol Diagn 2005;7:236-246.

49. Wedell A, Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: Two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. Hum Mol Genet 1993;2:499-504.

50.Day DJ, Speiser PW, White PC, Barany F. Detection of steroid 21-hydroxylase alleles using gene-specific pcr and a multiplexed ligation detection reaction. Genomics 1995;2(9):152-162.

51. Moayeri H, Rabbani A. Report of 285 patients with congenital adrenal hyperplasia and evaluation of approximate prevalence of the disease in Iran. Acta Medica Iranica 1999;37:102-105.