View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۳، شماره‌ی ۱۰۰، آذر و دی ۱۳۹٤، صفحات ۱۳ تا ۲۱

بررسی جهش‌های اگزون‌های ۱ و ۲ ناحیه 3´UTR ژن VSX1 در بیماران مبتلا به ورم بهاره ملتحمه‌ی چشم در شهرکرد با استفاده از روش‌های PCR-SSCP/HA و Sequencing

الهه فلاحی[۱]، شهربانو پرچمی برجوئی[۲]، سمیه رئیسی[۳]، دکترعلی صالحی[٤]، بهشته امیری[٥]، فاطمه هیبتی[٦]، دکتر حسین تیموری[۷]

نویسنده‌ی مسول: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی hteimori@skums.ac.ir

دریافت: ۹۳/۹/۱۱ پذیرش: ۹٤/٤/٤

چکیده

زمینه و هدف: *ورم ملتحمه بهاره (Vernal Kerato Conjunctivitis) یک واکنش ایمنی در ارتباط با آنتی ژن‌های محیطی می‌باشد که منجر به التهاب بافت ملتحمه چشم می‌شود. یکی از عوامل ژنتیکی موثر محتمل در این بیماری ژن VSX1 می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر جهش‌های واقع در اگزون ۱، ۲ و 3'UTR ژن VSX1 در بیماران مبتلا به VKC در شهرکرد با استفاده از روش‌های PCR-SSCP و PCR-HA بررسی شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه مقطعی، نمونه خون محیطی ۱۰۰ فرد مبتلا به بیماری ورم ملتحمه و همچنین ۱۰۰ فرد که هیچ نوع بیماری چشمی در آنها ثابت نشده بود به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی به روش فنول-کلروفرم استخراج شد و توسط PCR تکثیر گردید، سپس با استفاده از محصول PCR، SSCP و HA انجام گرفت و نمونه‌هایی که دارای باندهای متفاوت بودند به منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی یابی شدند. در ادامه، به منظور بررسی نوع تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شده از روش RFLP استفاده شد.*

یافته‌ها: *با بررسی نتایج SSCP، ٦ نمونه در اگزون‌های ۱ و۲ و ۱۳ نمونه در ناحیه 3'UTR دارای باند شیفت بودند که به‌منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی یابی شدند، نتایج توالی یابی یک تغییر چهارچوب (g. ۲۵۰۵۷٥٦۱ delG) در ناحیه 3'UTR نشان داد. در توالی‌های دیگر تغییری مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به نتایج این مطالعه به احتمال زیاد ژن VSX1 نقش موثری در بیماری‌زایی VKC در جمعیت مورد مطالعه ندارد. بنابراین در مورد نقش پاتوژنز ژن VSX1 در ورم ملتحمه بهاره نیاز به مطالعه بیشتری می‌باشد.*

واژگان کلیدی: ***VSX1 ، جهش، ورم ملتحمه بهاره، PCR-HA، PCR-SSCP***

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، کارشناس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۳- دانشجوی دکترای ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران
٤- فوق تخصص چشم پزشکی، استادیار دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
٥- کارشناسی پرستاری، کارشناس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
٦- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، کارشناس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۷- دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، استادیار دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

مقدمه

ورم بهاره‌ی چشم VKC (Vernal Kerato Conjunctivitis) واکنش ایمنی است که در ارتباط با آنتی ژن‌های محیطی رخ داده و منجر به التهاب بافت ملتحمه‌ی چشم می‌شود. مکانیسم‌های دقیق بیماری‌زایی VKC به‌طور کامل مشخص نشده است ولی به‌صورت کلاسیک افزایش حساسیت با واسطه IgE و واکنش‌های با واسطه Th2، نقش اصلی را در بیماری‌زایی ورم ملتحمه‌ی بهاره ایفا می‌کند (۳-۱). بررسی‌های صورت گرفته به‌منظور شناسایی ژن‌های مستعد کننده‌ی بیماری آلرژی چشمی با تجزیه و تحلیل پیوستگی، نقش مهم فاکتورهای ژنتیکی در این بیماری را تایید می‌کنند (۶-۴). یکی از ژن‌های مرتبط با با بیماری‌های شایع چشمی VSX1 (Visual System Homeobox) می‌باشد. ژن VSX1 متعلق به خانواده هومیو باکس‌ها بوده و حاوی پنج اگزون می‌باشد. این ژن پروتئینی را رمزدهی می‌کند که حاوی یک Paired Like Homeodomain بوده و به مرکز لوکوس‌های ناحیه‌ی کنترل خوشه ژنی رنگدانه‌ی سبز و قرمز بینایی متصل می‌شود. طبق مطالعات انجام گرفته این ژن یک نوع عملکرد مهارکننده‌ی رپرسور دارد که می‌تواند به‌عنوان یک سرکوبگر رونویسی عمل کند، پروتئین کد شده ممکن است در تنظیم بیان ژن‌های آپسین مخروطی اولیه در حال توسعه نقش داشته باشد. همچنین ارتباط جهش در VSX1 با بیماری‌های دیستروفی چند ریخت خلفی قرنیه [MIM:122000]، کراتوکونوس تیپ ۱ [MIM:148300] و ناهنجاری‌های سر و صورت و قرنیه [MIM: 614195] CAASDS تأیید شده است (۱۱-۷). در مطالعات گذشته بر اساس بررسی ارتباط بیماری کراتوکونوس با ژن vsx1، ناحیه 3'UTR نقش تنظیم کننده در میزان بیان این داشته و همچنین تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در اگزون‌های ۱، ۲ و۳ دارای فراوانی بالاتری بوده است (۱۳و ۱۲)، با وجود مطالعات مختلف بر روی بیماری‌های آلرژی چشمی در ایران، تاکنون ارتباط بین ژن VSX1 و بیماری ورم بهاره مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به شباهت علایم تشخیصی کراتوکونوس با بیماری ورم ملتحمه‌ی بهاره این فرضیه مطرح شد که ممکن است بین ژن VSX1 و بیماری ورم ملتحمه بهاره از نظر منشا ژنتیکی بیماری‌زایی آن‌ها ارتباط وجود داشته باشد. با توجه به شایع بودن بیماری VKC در استان چهارمحال و بختیاری و همچنین ارتباط بیماری‌های چشمی با ژن VSX1، در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار ارتباط جهش ژن VSX1 با بیماری ورم بهاره چشمی در بیماران مبتلا به VKC در این استان مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش بر اساس بررسی ارتباط جهش اگزون‌های ۱ و ۲ و همچنین ناحیه 3'UTR این ژن با بیماری VKC انجام گرفته است.

روش بررسی

بیماران: در این مطالعه‌ی توصیفی -آزمایشگاهی که در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی شهرکرد صورت گرفت. ۱۰۰ بیمار مبتلا به VKC و ۱۰۰ فرد غیر بیمار که هیچ نوع بیماری چشمی در آن‌ها تشخیص داده نشده بود به‌عنوان گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند. تشخیص بیماری بر اساس یافته‌های بالینی و Corneal Topography بود (۱٤). بیماران در ابتدا به‌دلیل علایم بیماری مانند خارش شدید چشمی همراه اشک ریزش، ترشحات موکوسی، ترس شدید از نور، اسپاسم پلک‌ها و احساس جسم خارجی به چشم پزشک مراجعه کرده بودند و در افراد دارای علایم تشخیصی بیماری ورم ملتحمه مانند هیپرپلازی پاپیلاری در ناحیه ملتحمه تارس و یا وجود ارتشاح بافت‌های زیر ملتحمه در ناحیه‌ی لیمبوس، بیماری ورم ملتحمه تایید شد (افراد مورد مطالعه از بین بیماران مبتلا به ورم ملتحمه بهاره که در فاصله‌ی زمانی آبان تا تیرماه ۹۲ به

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

کلینیک هاجر شهرکرد مراجعه کرده بودند انتخاب شدند). افرادی که علاوه بر علایم بیماری VKC دارای علایم تشخیصی دیگر بیماری‌های چشمی بودند و همچنین افراد بیمار خویشاوند که عضو یک خانواده بودند از مطالعه خارج شدند و از خانواده‌هایی که دارای چند فرد بیمار بود یک فرد وارد مطالعه شد.

نمونه‌گیری: پس از تشخیص بیماری ابتدا رضایت نامه‌ی کتبی از بیماران کسب شد و پس از تکمیل پرسشنامه مربوط به اطلاعات بالینی افراد مبتلا به ورم بهاره، نمونه‌گیری از افراد بیمار به روش آسان انجام شد. از هر فرد ۵ میلی‌لیتر خون محیطی تهیه و برای استفاده در مراحل بعدی در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

انجام آزمایشات مولکولی: استخراج DNA با استفاده از روش فنول- کلروفرم صورت گرفت (۱۵). کیفیت و کمیت DNA با استفاده از روش اسپکتروسکوپی (اسپکتروفتومتر Unico 2100 USA) مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور انجام مرحله PCR، در ابتدا با استفاده از اطلاعاتی مبتنی بر وجود توالی‌هایی موجود در پایگاه داده‌های ژنتیکی (NCBI ,UCSC ,EMBL) پرایمرهای مورد استفاده برای نواحی اگزون‌های ۱، ۲ و ناحیه 3'UTR با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی گردید (جدول ۱). به‌منظور ایجاد نمونه کنترل مثبت که دارای تغیر نوکلئوتیدی باشد از روش جهش‌زایی با PCR استفاده شد به این ترتیب که از پرایمرهای دارای یک نوکلئوتید تغییر یافته در ناحیه نزدیک '3 پرایمر برای تکثیر توالی هدف استفاده شد (جدول ۱). تکثیر توالی نواحی مورد نظر با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Astec,PC818 Japan) صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل: بافر PCR با غلظت 1X، $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، dNTPs با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار، هر کدام از پرایمرها با غلظت ۰/۲ پیکو مول و نهایتا ۰/۵ واحد از آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد بر میکرولیتر) تهیه گردید و با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم DNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر توالی هدف صورت گرفت. (تمامی مواد مصرف شده از شرکت سیناژن تهیه شدند). تکثیر توالی DNA اگزون‌های ژن مورد مطالعه با استفاده از شرایط دمایی پایه ۱ سیکل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ٤٥ ثانیه، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد ۵۰ ثانیه و در نهایت ۵ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک سیکل به‌منظور تکثیر نهایی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور مشاهده‌ی کیفیت و کمیت توالی‌های تکثیر یافته، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شرکت مرک آلمان). پس از الکتروفورز، به‌منظور مشاهده‌ی باندهای DNA حاصل، از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (۱٦). واکنش‌های PCR-SSCP(PCR-single strand conformation polymorphism) و PCR-HA (PCR-heteroduplex) با استفاده از محصول PCR بر اساس روش نترجی و همکاران صورت گرفت (۱۸و ۱۷). هرکدام از توالی‌های مورد بررسی با شرایط خاص ژل SSCP مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). نمونه‌های دارای باند متفاوت بر روی ژل الکتروفورز SSCP و بررسی هتروودوپلکس به منظور تایید نهایی، تعیین توالی گردیدند. واکنش تعیین توالی با استفاده از سیستم ABI(Capillary System) 3730 XL انجام شد. در ادامه این مطالعه، برای بررسی نوع تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شده (جهش یا پلی مورفیسم) در نمونه‌های توالی یابی شده اگزون‌های مورد بررسی بیماران، از آنالیز RFLP بر روی نمونه‌های افراد کنترل استفاده شد؛ برای این منظور، برای توالی ناحیه 3'UTR به‌منظور تکثیر کل توالی مورد نظر در یک مرحله PCR پرایمر طراحی شده و تکثیر صورت گرفت. محصول PCR توالی ناحیه 3'UTR با استفاده از آنزیم محدودالاثر MboII ($GAAGA(N)_{10}$) برش یافته و نتایج

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

با الکتروفورز بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

نوع پرایمر	توالی پرایمر (3 → 5´)	TM° C
V1/aF	GCAGCCCAATCCTATAAAGC	57.3
V1/aR	GATTACCGGACGTGGAGA	56.0
V1FM*	GCAGCCCAATCCTATCAAGC	
V1/bF	AAGTCCTCTTCTTCTTTCTGTGCCATC	63.4
V1/bR	AAGGGACTGCTGATTGGCTCACTG	64.4
V1FM*	AAGTCCTCTTCTTCTTTCTGTGTCATC	
V2/F	ATCATGCTCGGGAGAGAAGA	57.3
V2/R	AAAATGAGGCAACCATCCAG	55.3
V2FM*	ATCATGCTCGGGAGATAAGA	
V5/aF	GCTCAGGTAGCATTGTTCTGC	59.8
V5/aR	TGATGGAAGGAGAGGAGAAGG	0
V5FM*	GCTCAGGTAGCATTGTTATGC	
V5/bF	TGTGTGCCTTCTGCTTCTCC	59
V5/bR	CACCTCCTACAACACCTCGA	60
V5/FM*	TGTGTGCCTTCTGCTCCTCC	

- ***توالی پرایمرهای دارای تغییر نوکلئوتیدی برای واکنش جهش زایی با استفاده از PCR***

جدول ۲: شرایط تنظیم شده‌ی اگزون‌های ۱، ۲ و ناحیه 3'UTR برای SSCP

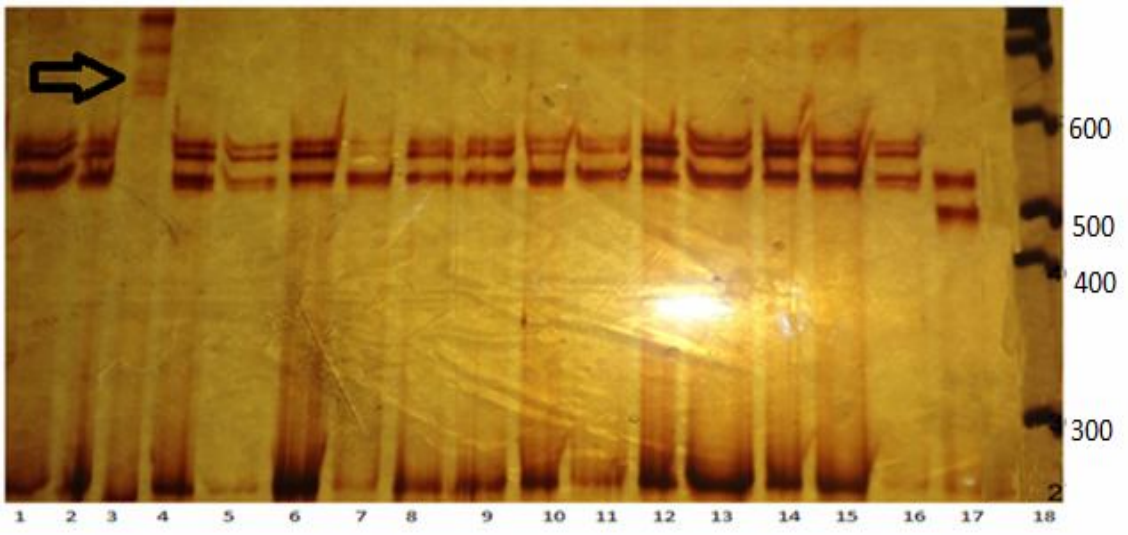
سایر ترکیبات	دما	ولتاژ	زمان	غلظت ژل	قطعه تکثیر شده
۱ گرم اوره	۲۰°C	۳۳۰	۶/۳۰ ساعت	%۱۰	قطعه تکثیر شده 1a
۱ گرم اوره	۲۰°C	۳۳۰	۶ ساعت	%۱۰	قطعه تکثیر شده 1b
۱گرم اوره	۲۲ °C	۳۳۰	۶ساعت	%۱۰	اگزون 2
	۱۲ °C	۳۶۰	۶ساعت	%۱۰	قطعه تکثیر شونده 5a
	۱۲ °C	۳۶۰	۶ساعت	%۱۰	قطعه تکثیر شونده5b

یافته‌ها

بیماران: در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مبتلا بـه ورم ملتحمـه بهاره و۱۰۰ فرد غیر بیمار به روش RFLP مورد بررسی قـرار گرفتند. در این مطالعـه افـرادی کـه دارای علایـم تشخیـصی بیماری VKC بودند مورد بررسی قرار گرفتنـد و افـرادی کـه عـلاوه بـر علایـم بیمـاری VKC دارای علایـم تشخیـصی بیماری‌های چـشمی دیگـر بودنـد از مطالعـه خـارج شـدند.

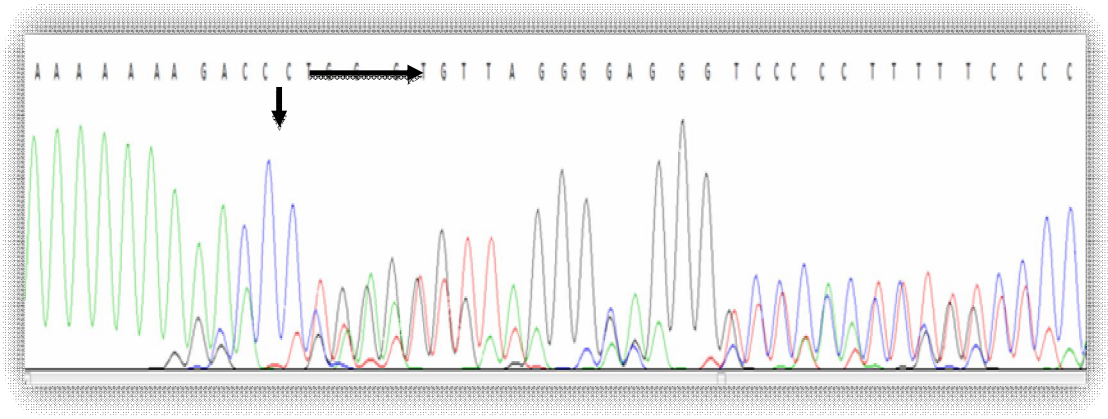
بررسی نتایج PCR-SSCP و PCR-HA: بررسی نتایج روش SSCP و هترو دوبلکس اگزون‌های ۱ و ۲ در ۶ نمونه و برای ناحیه پایین دست (3'UTR) در ۱۳ نمونه‌بانـدمتفـاوت نـشان داد (شکل ۱). پس از توالی یابی DNA تکثیر شده مربوط بـه نواحی که دارای باند متفاوت بر روی ژل SSCP بودنـد، تنهـا یک تغییرنوکلئوتیدی در ناحیه پایین دست ژن VSX1 (پرایمر 5a) مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲). نتایج توالی‌یـابی هـیچ تغییر نوکلئوتیدی در اگزون‌های ۱ و ۲ را نشان نداد و مشاهده باند متفاوت برروی ژل SSCP به احتمال خطا مرتبط می‌باشد.

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017



شکل ۱: ژل پلی اکریل آمید مربوط به واکنش SSCP و هترودوپلکس در توالی تکثیر شده ناحیه 3'UTR ؛ ستون۳ مربوط به فردی می‌باشد که دارای الگوی باندی متفاوتی نسبت به دیگر نمونه‌ها می‌باشد که پس از تعیین توالی، تغییر نوکلئوتیدی، مورد تأیید قرار گرفت. ستون ۱۷ ؛ کنترل مثبت (نمونه دارای تغییر نوکلئوتیدی) ستون ۱۸: مارکر bp ۱۰۰

در بررسی نتایج SSCP ناحیه 3'UTR ، ۱۳ نمونه دارای باند متفاوت بودند که بعد از تعیین توالی، در همه نمونه‌ها یک تغییر به‌صورت یک حذف نوکلئوتیدی با الگوی هتروزیگوس در نوکلئوتید G در سیصدو هفتاد و پنجمین نوکلئوتید پایین دست کدون پایان در 3'UTR دیده می‌شود. طبیعتاً به دلیل اینکه این تغییر در خارج از چارچوب خواندن رونویسی ایجاد شده است، اثری بر روی توالی اسیدآمینه‌ای محصول پروتئینی نخواهد داشت (شکل ۲).



شکل ۲: توالی نوکلئوتیدی واریانت آللی g.25057561delG بالا : تغییر هتروزیگوت حذف تک نوکلئوتیدی ناحیه 3'UTR ژن VSX1

بررسی نتایج RFLP: بررسی نتایج RFLP با استفاده از ۱۰۰ نمونه کنترل، در ۵ نمونه از افراد مورد مطالعه تغییر نوکلئوتیدی g.25057561delG را به‌صورت ناحیه‌ی بدون جایگاه برش برای آنزیم برشی مورد استفاده نشان داد.

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

بحث

در ایـن مطالعـه در تـوالی اگـزون‌هـای ۱و ۲ تغییـر نوکلئوتیدی یافت نشد، SSCP قطعات تکثیر شده ناحیه پایین دست در ۱۳ نمونه بیمار تغییـر نـشان داد کـه پـس از تعیـین تـوالی، تغییـر نوکلئوتیـدی g.25057561delG در ناحیـه‌ی پایین دست تمام نمونه‌های دارای باند شیفت مشاهده شد. بـه دلیل اینکه این تغیر نوکلئوتیدی در مطالعات گذشـته گـزارش نشده بود (۱۲و۱۱)، احتمال حضور این تغییر در افراد کنترل با روش RFLP بررسی شد. نتایج بررسی این تغییر را در ۸ نفر از این افراد نـشان داد. ناحیـه 3'UTR اغلـب شـامل نـواحی تنظیم کننده می‌باشد که بعد از مرحله رونویسی بر روی بیـان ژن تأثیر می‌گذارد. این نـواحی مـی‌تواننـد پلـی آدنیلاسـیون، کارایی ترجمه و همچنین پایداری mRNA را تحت تاثیر قرار دهند. ناحیه 3'UTR همچنین شامل جایگاه‌های اتصال بـرای پروتئین‌های تنظیمی و miRNA می‌باشد؛ مطالعـات صـورت گرفته بر روی بیـان ژن VSX1 نـشان داده اسـت کـه ناحیـه 3'UTR ترجمه mRNA مربوط به این ژن را تحت تاثیر قرار داده و سبب کاهش بیان این ژن در سلول‌های دو قطبـی لایـه داخلی درون شبکیه شده است و احتمالا از این طریق بر روی عملکرد پـروتئین در سیـستم بینـایی اثـر گذاشـته اسـت (۴). یادآور می‌شود برخی از تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییـر پـروتئین شـده (p.D144Ep.L159M, p.G160D, p.R166W, p.H244R, and p.P247R) احتمالا در بیمـاری‌زایـی کراتوکونـوس دخالـت دارنـد کـه البتـه در مطالعـات بعـدی درگیـری ژن VSX1 در کراتوکونوس تک گیر و فـامیلی و همچنـین بیمـاری‌زایـی PCP آشکار شده‌است (۱۹). در مطالعـه‌ی دیگـری دو تغییـر نوکلئوتیدی *Asp144Gluand* و *His244Arg* علاوه بر افراد بیمار در افـراد کنتـرل نیـز مـشاهده شـدند بنـابراین احتمـال همراهـی آن هـا بـا ایـن بیمـاری را افـزایش داد (۲۱و ۲۰).

همچنین در مطالعات گذشته همراهی جهش‌هـایVSX1 بـا بدشکلی‌های برآمدگی قرنیه مورد تایید قرار گرفته است (۲۰)، اما تاکنون با وجود جهش‌های گزارش شده در ژنVSX1 در گروه‌های نژادی مختلف (۲۱)، نقـش بیمـاری‌زایـی تعریـف شده‌ای برای آن ارایه نشده است. با توجـه بـه اینکـه جایگـاه تغییر مشاهده شده در این مطالعه در چـارچوب بـاز خوانـدن (ORF1) نمی‌باشد، همچنین بر اسـاس اطلاعـات بـه دسـت آمده از تکنیک RFLP تفاوت معنی‌داری بـین گـروه بیمـار و کنترل با مقایسه فراوانی تغییر نوکلئوتیدی ذکر شـده مـشاهده نشد و میزان فراوانی آللی در جمعیت کنتـرل بیـشتر از میـزان مورد انتظار برای یک آلـل بیمـاری‌زا اسـت، بنـابراین نتیجـه احتمالی این تغییر بر عملکرد یا ساختار پروتئین واضح نیست و جهت شفاف سازی نیاز بـه مطالعـات عملکـردی بیـشتر و دقیق‌تر می‌باشد.

نتیجه گیری

با بررسی مطالعات گذشته و مقایسه‌ی نتایج آن‌ها با نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌توان گفـت ژن VSX1 نقـش مـوثری در بیماری‌زایی ورم ملتحمه بهاره ندارد و نقش این ژن به عنـوان پاتوژن ورم ملتحمه بهاره هنوز بحث بر انگیز است و پژوهش حاضر نیز در تایید مطالعات پیشین، عدم ایفای نقش ایـن ژن در بروز ورم بهاره را تایید می‌کند.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهـشی بـه‌دلیـل حمایـت مـالی و از کارمندان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و همچنین کلیه‌ی بیماران شرکت کننده در ایـن مطالعـه تقـدیر و تـشکر می‌گردد. لازم به ذکر است تحقیـق حاضـر برگرفتـه از پایـان نامه‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی می‌باشد.

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

References

1- Kari O. Atopic conjunctivitis. *Acta Ophthalmologica.* 1988; 66: 381-86.

2- Leonardi A. Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Progress in retinal and eye research.* 2002; 21: 319-39.

3- Mantelli F, Lambiase A, Bonini S. A simple and rapid diagnostic algorithm for the detection of ocular allergic diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology.* 2009; 9: 471-76.

4- Ajaiyeoba A. Vernal keratoconjunctivitis and intestinal parasitic infestations in black children. *J Nat Med Assoc.* 2005; 97: 1529.

5- De Smedt SG, Wildner G, Kestelyn P. Vernal keratoconjunctivitis: an update. *Br J Ophthalmol.* 2013; 97: 9-14.

6- Kumar S. Vernal keratoconjunctivitis: a major review. *Acta Ophthalmologica.* 2009; 87: 133-47.

7- El-Asrar, Immunopathogenesis of conjunctival remodelling in vernal keratoconjunctivitis. *Eye.* 2005; 20: 71-79.

8- Aldave AJ. No VSX1 gene mutations associated with keratoconus. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2006; 47: 2820-22.

9- BenEzra D, Matamoros N, Cohen E. Treatment of severe vernal keratoconjunctivitis with cyclosporine A eyedrops. *in Transplantation proceedings.* 1988.

10- Eran P. The D144E substitution in the VSX1 gene: a non-pathogenic variant or a disease causing mutation? *Ophthalmic Genetics.* 2008; 29: 53-59.

11- Héon E. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Human Molecular Genetics.* 2002; 11: 1029-1036.

12- Paliwal P. Familial segregation of a VSX1 mutation adds a new dimension to its role in the causation of keratoconus. *Molecular Vision.* 2011; 17: 481.

13- Tanwar M. VSX1 gene analysis in keratoconus. *Molecular Vision.* 2010; 16: 2395.

14- Bonini S. Vernal keratoconjunctivitis revisited: a case series of 195 patients with long-term followup. *Ophthalmology.* 2000; 107: 1157-63.

15- Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research.* 1988; 16: 1215.

16- Rapley B. Influence of extremely low frequency magnetic fields on chromosomes and the mitotic cycle in Vicia faba L., the broad bean. *Bioelectromagnetics*. 1998; 19: 152-161.

17- Nataraj AJ. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis.* 1999. 20: 1177-1185.

18- Rossetti S. “Microthrix parvicella”, a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS microbiology reviews.* 2005; 29: 49-64.

19- Leonardi A. Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in

conjunctival fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003; 44: 183-189.

20- Mantelli F. Systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials on topical treatments for vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmology*. 2007; 91: 1656-1661.

21- Leonardi A. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exper Allergy*. 2006; 36: 777-84.

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

Downloaded from zums.ac.ir at 14:33 IRDT on Saturday July 29th 2017

Mutation Screening of 3'UTR and Exons 1-2 of VSX1 Gene by PCR-SSCP/HA and Sequencing in Patients with Vernal Keratoconjuctivis (VKC) in Shahrekord

Fallahi E[1], Parchami Barjui S[1], Reiisi S[2], Salehi A[3], Amiri B[1], Heybati F[1], Teimori H[1]

[1]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

[2]National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

[3]Dept. of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Teimori H, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran,

E-mail: hteimori@skums.ac.ir

Received: 2 Dec 2014 **Accepted:** 25 Jun 2015

Background and Objective: Vernal Keratoconjuctivis is an immune response in relation to environmental antigens, leading to inflammation of the conjunctiva. One of the presumable genetic factors in VKC is VSX1 gene. In this study, mutations in exon 1, exon 2 and 3'UTR of VSX1 gene in patients with VKC in Shahrekord were investigated by PCR-SSCP and PCR-HA.

Materials and Methods: In this cross- sectional study, peripheral blood samples of 100 patients with VKC and 100 individuals with no confirmed eye disease as control group were investigated. Genomic DNA was extracted by phenol-chloroform method and then PCR was carried out. Then, SSCP and HA were performed and the samples with shifted bands were sequenced for the type of nucleotide change. Afterwards, to investigate the observed nucleotide change, RFLP method was used.

Results: Our SSCP findings revealed six patients with shifted band in exons 1 and 2 and 13 patients in 3'UTR, which were sequenced for nucleotide change. Analysis of sequencing data showed a frameshift change (g. 25057561delG) in 3'UTR. There was no change in other sequences.

Conclusion: The findings of this study showed that, VSX1 gene most probably has no effective role in VKC pathogenesis in the studied population. Therefore, the role of VSX1 genes in VKC pathogens needs further investigation.

Keywords: Mutation, Vernal Keratoconjuctivis, VSX1 gene