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

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۸، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۵/ ۲۰-۱۰

**مقاله پژوهشی**

# بررسی ارتباط جهش در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 با بیماران کاردیومیوپاتی هایپرتروفی به روش PCR-SSCP/HA در استان چهارمحال و بختیاری

امیرحسین شیخ شاهرخ دهکردی[۱]، مرتضی هاشم زاده چالشتری[۲*]، عباس دوستی[۱]، شهربانو پرچمی برجوئی[۲]

[۱]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۰

## چکیده:

***زمینه و هدف:*** **کاردیومیوپاتی هایپرتروفی یک نوع بسیار رایج از بیماری های قلبی با وراثت مندلی است و دلیل رایج مرگ های ناگهانی قلبی در افراد جوان تر از ۳۵ سال می باشد. در بیش از ۵۰٪ از موارد HCM علت بیماری جهش های ژنی شناسایی شده است. جهش در ژن MYBPC3 (که کد کننده پروتئین C متصل شونده به میوزین قلبی است)، عامل حدود ۴۰٪ از موارد بالینی HCM است. این مطالعه با هدف بررسی احتمال وجود جهش در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.**

***روش بررسی:*** **۳۰ فرد مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی مراجعه کننده به کلینیک قلب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در نظر گرفته شدند. استخراج DNA از نمونه های خون این بیماران با استفاده از روش استاندارد فنل- کلروفرم انجام شد. با استفاده از روش PCR اگزون های ۳۰ و ۳۳ تکثیر شدند و با روش SSCP به صورت تک رشته ای تبدیل شدند و همراه با نمونه های دو رشته ای روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند.**

***یافته ها:*** **افراد انتخاب شده برای نمونه گیری دارای کاردیومیوپاتی هایپرتروفی با علت ژنتیکی بودند. با انجام الکتروفورز نمونه های DNA استخراج شده و بررسی نسبت جذب آن ها، کیفیت نمونه ها تأیید شد. با بررسی نتایج حاصل از الکتروفورز SSCP/HA اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 در ژل پلی اکریل آمید در هیچ یک از نمونه های بیماران تغییری مشاهده نشد.**

***نتیجه گیری:*** **هیچ یک از بیماران مورد مطالعه در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 جهش نداشتند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی با توارث اتوزومی غالب هیچ گونه تغییری در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 مشاهده نشد. در نتیجه اگزون های مذکور نقشی در ایجاد بیماری HCM در استان چهارمحال و بختیاری ندارند و به عنوان اگزون های مشکوک جهت پیش آگهی و علت ایجاد بیماری HCM در استان چهارمحال و بختیاری معرفی نمی شوند.**

***واژه های کلیدی:*** **کاردیومیوپاتی هایپرتروفی، واکنش های زنجیرهای پلیمراز، چند شکلی فضایی تک رشته ای، MYBPC3، اگزون ۳۰، اگزون ۳۳.**

## مقدمه:

کاردیومیوپاتی هایپرتروفی (HCM)، رایج ترین بیماری ارثی مربوط به عضله قلب می باشد که در صورت درگیری ماهیچه بطن چپ قلب، به طور غیر طبیعی رشد کرده و ضخیم می شود (۱). بر این اساس، حفره بطن چپ کوچک شده و با وجود حفظ قدرت انقباضی، قدرت انبساط حفره و پذیرش خون کم می شود. به دلیل حفظ قدرت انقباضی در اوایل بیماری، علائم نارسایی قلب کمتر دیده می شود، ولی

*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۳۰۷۰۹، E-mail: mchalesh@yahoo.com



Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

در موارد پیشرفته موجب کاهش برون ده قلبی و بروز علائم نارسایی قلب می شود. دامنه آن از فقدان علائم بیماری در تمام عمر تا پیشرفت سریع نارسایی قلبی یا مرگ قلبی ناگهانی در ابتدا و گاهی اوقات با کمی و یا حتی بدون هایپرتروفی است (۳،۲). در بیماران مبتلا به HCM معمولاً افزایش در توده عضلانی بطن چپ، بی نظمی سلول عضله یا فیبروز علت آریتمی محسوب می شود (۷-۴). میزان فیبروز عضله قلبی با اختلال در آرامش قلب و افزایش نارسایی قلبی در ارتباط است. در مدل های حیوانی ترانس ژنیک HCM، ارتباط روشنی بین میزان فیبروز قلبی و یا بی نظمی سلول عضله و خطر آریتمی نشان داده شده است (۹،۸). از علت های این بیماری می توان گاهی بیماری ثانویه مثل پر فشاری مزمن خون و یا تنگی دریچه ای یا بیماری های ارتشاحی قلب را نام برد؛ اما نوع اولیه (ایدئوپاتیک) ناشی از اختلال ژنتیکی می تواند در هر سنی رخ دهد. برخی بیماران دارای سابقه خانوادگی هستند؛ اما موارد بدون سابقه خانوادگی هم دیده می شود. این فرم درگیری یکی از شایع ترین علل مرگ ناگهانی قلب است. دامنه آن از فقدان علائم بیماری در تمام عمر تا پیشرفت سریع نارسایی قلبی یا مرگ قلبی ناگهانی در ابتدا و گاهی اوقات با کمی و یا حتی بدون هایپرتروفی است (۲). اولین کاردیومیوپاتی که به علت ژنتیکی نسبت داده شده است، کاردیومیوپاتی هایپرتروفی می باشد که علت بیماری در بیش از ۵۰٪ از موارد جهش های ژنی شناسایی شده است (۱۰). جهش در ۲۳ ژن سارکومری یا پروتئین های مرتبط با سارکومر، با HCM در ارتباط است (۱۲،۱۱). عمدتاً تغییرات در دو ژن MYH7 و MYBPC3 (که کد کننده پروتئین C متصل شونده به میوزین قلبی است)، عامل بیش از ۷۵٪ از تمام موارد بالینی HCM است که در آن زمینه ای از جهش تعریف شده است. جهش در پروتئین های رشته های نازک، مانند تروپونین T عضله قلب، تروپونین I عضله قلب و تروپومیوزین کمتر از ۱۰٪ موارد HCM را تشکیل می دهند (۱۳). تنوع قابل توجه در فنوتیپ بالینی HCM تا حدودی به علت جهش های ژنی بیماری زای متعدد است. حتی جهش مشابه در یک خانواده می تواند باعث تنوع قابل ملاحظه ای در نفوذ بیماری، سن شروع علائم، فنوتیپ بالینی و نتیجه شود. این مشاهدات نشان می دهد که فراتر از تغییر خاص در ساختار و عملکرد یک پروتئین جهش یافته، اصلاح کننده های دیگری برای بیماری باید وجود داشته باشند، مانند واریانت های ژنتیکی شایع و یا متوسط در کل ژنوم، یا بر هم کنش ژنتیکی- محیطی از طریق سیگنال اپی ژنتیک جهش های MYBPC دارای نفوذ ناقص هستند و منجر به بروز دیر رس و دوره خوش خیم بیماری می شوند (۱۴). جهش های MYBPC با پیش آگهی ضعیف همراه هستند (۱۵). در صورتی که جهش های بیماری زا در بیماران مبتلا به HCM تشخیص داده شود، خطر بروز عوارض نامطلوب مانند مرگ قلبی- عروقی، سکته مغزی غیر کشنده و یا پیشرفت نارسایی قلبی، ۳ تا ۴ برابر افزایش را در مقایسه با بیماران مبتلا به HCM که در آن ها جهش های بیماری زا شناسایی نشده است، نشان می دهد (۱۷-۱۵). شیوه زندگی، جنس و زمینه ژنتیکی، چندین عامل اصلاح کننده برای توجیه تنوع فنوتیپی بالا در HCM هستند (۲۰-۱۸). سیستم رنین- آنژیوتانسین- آلدوسترون نقش مهمی به عهده دارند (۲۲،۲۱). به عنوان مثال، بین تنوع ژنتیکی آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین (کدگذاری شده توسط ACE) و میزان هایپرتروفی در بیماران مبتلا به HCM، ارتباطی یافت شده است (۲۱). بررسی ژنتیکی موجب تسهیل تشخیص بیماری در مراحل پیش کلینیکی می شود که این موجب پیشرفت های زیادی در شناخت مبنای ژنتیکی بیماری شده است. تشخیص بیماری با توجه به تعیین ژنوتیپ بیماران روز به روز بیشتر می شود و به خصوص که وجود روش های دارویی و مداخله ای برای پیشگیری از مرگ ناگهانی افراد مستعد، اهمیت موضوع را بیشتر می کند؛ همچنین طبقه بندی میزان خطر زایی بیماری

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

بر اساس معیارهای مولکولی قابل انجام است. جهش در ژن MYBPC3، عامل حدود ۴۰٪ از موارد بالینی HCM است که این موضوع ضرورت بررسی این ژن را آشکار می کند. ژن MYBPC3 از ۲۱۲۹۶ جفت باز تشکیل شده و دارای ۳۵ اگزون است که ۳۴ تا از آن ها کد کننده پروتئین cMYBP-C با ۱۱۷۲ اسید آمینه هستند. ۲ تا از اگزون ها به صورت غیر معمولی از نظر اندازه کوچک هستند و هر کدام ۳ جفت باز دارند. طول کامل cDNA ۴/۵ کیلو باز است که ۱۱۷۳ باز، آمینو اسیدی را کد می کند (۲۳). تکنیک چند شکلی ساختار تک رشته ای (SSCP) در سال ۱۹۸۹ توسط Orita و همکاران ابداع شد. SSCP یک تکنیک ساده، ارزان و حساس است و در واقع یک روش غربالگری بر محصولات PCR جهت جداسازی نمونه های دارای جهش می باشد (۲۴). تحت شرایط بهینه این تکنیک می تواند تفاوت های تک بازی را شناسایی کند. این روش مبتنی بر حرکت متفاوت تک رشته های DNA روی ژل پلی آکریل امید است (۲۴). به همین دلیل با استفاده از روشSSCP می توان به طور دقیقی به تغییر در بازهای رشته DNA پی برد و این تغییرات را بررسی کرد. SSCP برای تشخیص جهش های نقطه ای مفید است و هترودابلکس به حذف و اضافه شدن حساس است. در نتیجه آنالیز ترکیبی آن ها باعث افزایش حساسیت تشخیص می شود. هترودابلکس ها بین آلل های متفاوت DNA شکل می گیرند. در این روش قطعات DNA نرمال و جهش یافته با هم مخلوط می شوند، سپس در دمای ۹۵°C قرار می گیرند تا دناتوراسیون انجام شود و بعد در دمای اتاق قرار می گیرند تا اتصال مجدد رشته ها به صورت آرام در دمای اتاق انجام گیرد. اگر DNA هدف شامل آلل های متفاوتی باشد، هترودابلکس ها به صورت خودکار شکل می گیرند و نتیجه آن تشکیل دو هموداپلکس و دو هترودابلکس است که در ژل آکریل آمید با تأخیر حرکت می کنند (۲۵)؛ بنابراین با انجام هم زمان روش SSCP و هترودابلکس در ژل، حساسیت تشخیص در هر دو روش افزایش می یابد که به میزان بیش از ۹۵٪ برای جهش های بی معنی و بد معنی تخمین زده شده است (۲۶).

در ایران مطالعات معدودی در زمینه های ژنتیکی HCM انجام شده است که از میان می توان به مطالعه حیدری و همکاران اشاره کرد که جهش ها در اگزون های ۱۵-۱۲ و ۲۳-۱۹ ژن MYH7 را در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرار داد (۲۸،۲۷) از آنجا که در مطالعات انجام شده در دیگر کشورها در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM جهش گزارش شده است؛ لذا این مطالعه با هدف بررسی حضور جهش های احتمالی در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 در استان چهارمحال و بختیاری طراحی و اجرا شده است.

## روش بررسی:

مطالعه که در محدوده زمانی مهر ماه ۹۲ تا آبان ماه ۹۳ انجام شد، از بین بیماران مراجعه کننده به کلینیک قلب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تعداد ۳۰ نمونه از خون افراد مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری، پس از کسب رضایت نامه از افراد مبتلا و یا والدین آن ها و تکمیل پرسشنامه مربوط به اطلاعات بالینی و دموگرافیک، دریافت شد. بر اساس یافته های اکوکاردیوگرافی و بالینی افرادی که ضخامت دیواره بطن چپ آن ها از ۱۳ میلی متر بیشتر بود و بیماری آن ها وراثتی بود، وارد مطالعه شدند (جدول شماره ۱) (۳۰-۲۸). از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون محیطی دریافت شد و به ازای هر میلی لیتر خون ۱۰ میکرولیتر EDTA استفاده شد و برای آزمایشات مولکولی به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی واقع در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد منتقل شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

**جدول شماره ۱: ویژگی های اصلی ۳۰ بیمار مبتلا به HCM مورد مطالعه**

| ویژگی ها | | تعداد |
|---|---|---|
| تعداد بیماران زن | | ۱۵ نفر |
| تعداد بیماران مرد | | ۱۵ نفر |
| میانگین سنی بیماران | | ۴۹ سال |
| دامنه سنی بیماران | | ۱۷ تا ۸۰ سال |
| ضخامت دیواره بطن چپ | ۱۷-۱۳ میلی متر | ۵ نفر |
| | ۱۹-۱۷ میلی متر | ۷ نفر |
| | >۱۹ میلی متر | ۱۸ نفر |
| دارای سابقه فامیلی از HCM | | ۱۶ نفر |
| بدون سابقه فامیلی از HCM | | ۱۴ نفر |

در این مطالعه جهت استخراج DNA از روش استاندارد فنل- کلروفرم استفاده شد (۳۰). به منظور بررسی میزان خلوص DNA در این مطالعه از روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر NANODROP 2000 USA) استفاده شده است. جهت طراحی پرایمر ساختمان کامل ژن MYBPC3، با استفاده از سایت اینترنتی NCBI شناسایی شد. اگزون های ۳۰ و ۳۳ این ژن انتخاب گردید و با استفاده از برنامه نرم افزاری Gene runner پرایمرهای لازم جهت انجام واکنش های زنجیره ای پلیمراز PCR طراحی و از شرکت ژن فناوران خریداری شدند. در این مطالعه از پرایمرهای تغییر یافته که در انتهای ۴ یا ۵ نوکلئوتیدی '۳ هر پرایمر پیشرو ترجیحاً بازهای پیریمیدین (C به T و T به C) و بعضاً بازهای پورین تعویض شده اند، نیز استفاده شد. بدین منظور نمونه هایی که محصول PCR آن ها با استفاده از پرایمر جهش یافته (site directed mutagenesis) باشند، به عنوان نمونه های کنترل مثبت بوده و در باندهای ژل SSCP دارای تغییر و حرکت متفاوت خواهند بود. پرایمرهای جهش یافته در جدول شماره ۲ با علامت (*) مشخص شده اند.

**جدول شماره ۲: پرایمرهای به کار رفته در مطالعه برای انجام PCR اگزون های ۳۰ و ۳۳**

| توالی پرایمر | نوع پرایمر | نام پرایمر | اندازه قطعه | نام اگزون |
|---|---|---|---|---|
| 5'-TTGGCAGGGGTGGGGTGGTCC -3' | Forward | MY30-F | ۲۸۲bp | اگزون ۳۰ |
| 5'- CCACGGTGAGGACAGTGAAGG -3' | Forward | MY30-R | | |
| 5'- TTGGCAGGGGTGGGATGGTCC -3' | Forward* Mutant | MY30-F* | | |
| 5'- GGTCCCCTCTCAGCCTGGATG -3' | Forward | MY33-F | ۳۱۶bp | اگزون ۳۳ |
| 5'- CCGCTCTTCCCATCTCCCAGG -3' | Revers | MY33-R | | |
| 5'- GGTCCCCTCTCAGCCTAGATG -3' | Forward* Mutant | MY33-F* | | |

در مطالعه حاضر، برای تکثیر نواحی مورد نظر، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ASTEC ژاپن)، در حجم ۲۵ ماکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل اجزاء زیر بود: ۲/۵ ماکرولیتر بافر PCR (۱۰ X) (سیناژن چین)، ۴ ماکرولیتر منیزیم کلراید (۵۰ میلی مولار)، ۰/۲ ماکرولیتر از مخلوط dNTP (۱۰ میلی مولار) (سیناژن چین)، ۰/۵ ماکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۵۰ ماکرو مول)، ۲ ماکرولیتر از DNA ژنومیک و در نهایت ۰/۲۵ ماکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد بر ماکرولیتر) (سیناژن چین). پس از انجام چندین PCR و تغییر غلظت منیزیم کلراید در هر واکنش و با بررسی ژل های رنگ آمیزی شده محصولات PCR، بهترین کیفیت باندهای محصولات PCR در غلظت ۵۰ میکرو مولار از منیزیم کلراید مشاهده شد؛ بنابراین برای انجام PCR از غلظت ۵۰ میلی مولار منیزیم کلراید استفاده کردیم. برنامه دمایی تنظیم شده برای اگزون های مورد مطالعه در جدول شماره ۳ آمده است.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

**جدول شماره ۳: برنامه دمایی تنظیم شده برای انجام واکنش PCR اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3**

| مرحله | دما (°C) | زمان (دقیقه) | سیکل |
|---|---|---|---|
| واسرشتگی اولیه | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| واسرشتگی | ۹۵ | ۱ | ۳۳ |
| اتصال | ۷۵ | ۱ | |
| تکثیر | ۷۲ | ۱ | |
| تکثیر نهایی | ۷۵ | ۵ | ۱ |

۲ میکرولیتر از محصولات PCR روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ و با ولتاژ ۳۰۰ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و سپس ژل ها به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شده و رویت گردید. در صورت تأیید کیفیت باندها محصولات PCR آن ها جهت SSCP مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر نمونه به میزان ۵ میکرولیتراز محصولات PCR را با ۵ میکرولیتر از SSCP Dye در یک میکروتیوب مخلوط نمودیم. میکروتیوب ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد روی هات پلیت قرار دادیم، تا دو رشته DNA کاملاً از هم باز شوند. برای جلوگیری از اتصال مجدد رشته ها، بلافاصله میکروتیوب ها را بر روی یخ قرار دادیم. نمونه ها حداقل ۵ دقیقه بر روی یخ ماندند. برای SSCP/HA نیز ۲ میکرولیتر از DNA محصول PCR با ۲/۷ میکرولیتر EDTA مخلوط کرده و طبق برنامه Touch Down در دستگاه PCR (corbett استرالیا) قرار دادیم (جدول شماره ۴).

**جدول شماره ۴: برنامه مورد استفاده در هتروداپلکس**

| مرحله | دما (°C) | زمان | سیکل |
|---|---|---|---|
| واسرشتگی اولیه | ۹۵ | ۵ دقیقه | ۱ |
| واسرشتگی | از ۹۵ به ۳۵ (هر سیکل ۱ درجه کاهش دما) | ۳۰ ثانیه | ٦۰ |
| نگهداری | ٤ | ۵ دقیقه | ۱ |

ژل پلی اکریل آمید مربوط به SSCP/HA به نسبت ۳۹:۱ از بیس اکریل آمید: اکریل آمید (MERCK آلمان) تهیه گردید و در تانک الکتروفورز قرار گرفت. از بافر TBE۰/۶X در تانک استفاده گردید. نمونه ها پس از مدت زمان لازم به داخل چاهک های ژل ریخته شدند. مدت زمان و ولتاژ لازم برای نمونه های مختلف متفاوت می باشد و باید برای هر نمونه شرایط دمایی، ولتاژ و زمان مطلوب با انجام آزمایشات متعدد و کسب تجربه به دست آید.

شرایط تنظیم شده جهت انجام الکتروفورز SSCP و SSCP/HA اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 غلظت ژل ۱۰٪، آمپر ۳۱ میلی آمپر، ولتاژ ۳۵۰-۳۲۰ ولت، دما $^{o}$C ۱۲، زمان ۸ ساعت می باشد.

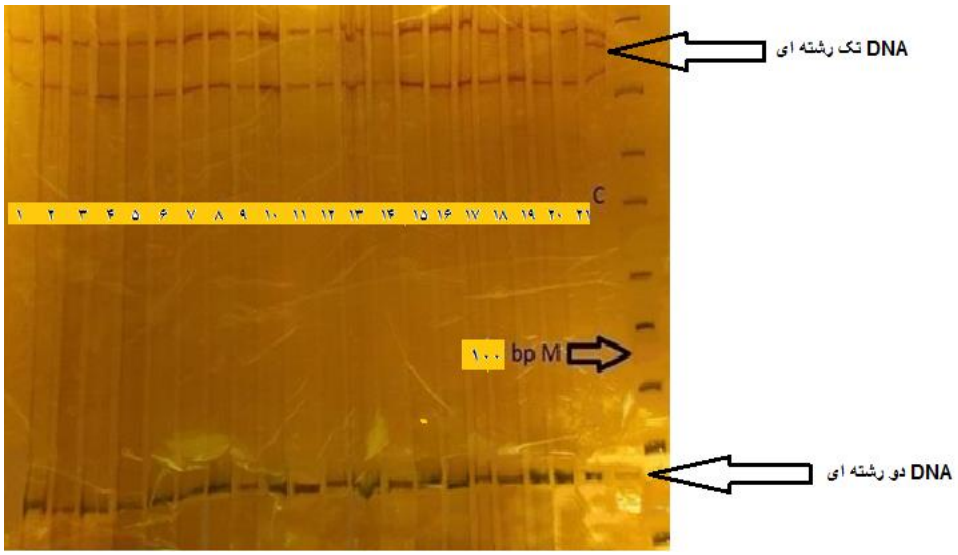
پس از مدت زمان لازم با استفاده از نیترات نقره ژل پلی اکریل آمید رنگ آمیزی شدند و باندهای تشکیل شده، مورد بررسی قرار گرفتند. هیچ نمونه مشکوکی در ژل SSCP مشاهده نشد، بنابراین نیازی به تعیین توالی نبود.

## یافته ها:

جمعیت مورد مطالعه، شامل: ۳۰ نفر از افرادی بود که دیواره بطن چپ آن ها حداقل ۱۳ میلی متر ضخامت داشت. برخی از افراد دارای سابقه فامیلی از بیماری و بعضی بدون سابقه فامیلی از بیماری بودند (۲۸). افراد انتخاب شده برای نمونه گیری دارای کاردیومیوپاتی هایپرتروفی با علت ژنتیکی بودند و تمام افرادی که دارای علل غیر ژنتیکی بودند، از مطالعه حذف شدند. نتایج جمعیت مورد مطالعه، پس از الکتروفورز نمونه های DNA استخراج شده، مشخص شد که از کیفیت بالایی برخوردار هستند و هیچ گونه آلودگی ظاهری ندارند. نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ برابر ۱/۸ بود که بیانگر عدم وجود ناخالصی است. طول قطعه تکثیر شده برای اگزون ۳۰، ۳۱۶ جفت باز و برای اگزون ۳۳، ۲۸۲ جفت باز می باشد. واکنش

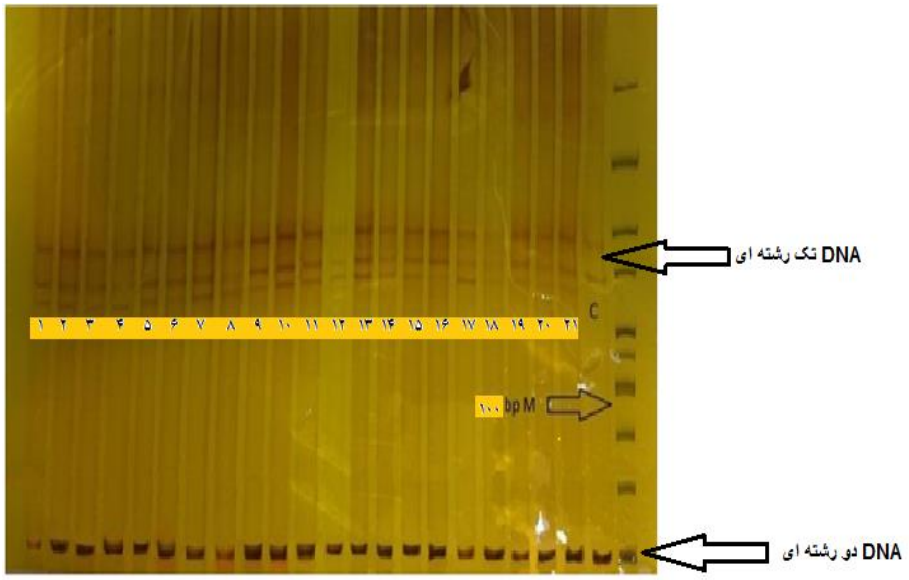
Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

SSCP/HA، نتایج حاصل از الکتروفورز SSCP/HA اگزون های ۳۰ و۳۳ ژن MYBPC3 در ژل پلی اکریل آمید در تصویر شماره ۱ و۲ نشان داده شده است. نمونه های کنترل مثبت که پرایمر پیشرو آن ها دارای جهش ساختگی بود، در تمام تصاویر دارای حرکت متفاوت بوده و با حرف C مشخص شده است. سایر موارد که با عدد مشخص شده اند، مربوط به نمونه های بیماران هستند. همان گونه که در تصویر شماره ۱ و ۲ مشخص شده، در هر دو اگزون ۳۰ و ۳۳، در هیچ یک از نمونه های بیماران تغییری مشاهده نشد.




**تصویر شماره ۱: ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز SSCP/HA مربوط به اگزون ۳۰ ژن MYBPC3**

*M: مارکر؛ C: نمونه کنترل مثبت که هم DNA تک رشته ای و هم DNA دو رشته ای آن متفاوت بودند؛ ۱-۲۱: نمونه های بیماران که در اگزون ۳۰ آن ها هیچ گونه باند متفاوتی مشاهده نشد و در نتیجه فاقد جهش بودند.*




**تصویر شماره ۲: ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز SSCP/HA مربوط به اگزون ۳۳ ژن MYBPC3**

*M: مارکر؛ C: نمونه کنترل مثبت که هم DNA تک رشته ای و هم DNA دو رشته ای آن متفاوت بودند؛ ۱-۲۱: نمونه های بیماران که در اگزون ۳۳ آن ها هیچ گونه باند متفاوتی مشاهده نشد و در نتیجه فاقد جهش بودند.*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

## بحث:

این تحقیق با استفاده از روش PCR-SSCP/HA و با هدف شناسایی جهش های ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. این روش ساده، ارزان و حساس که قادر به شناسایی تغییر در یک باز منفرد در قطعه DNA می باشد، در تحقیق های برخی محقیق توضیح داده شد (۳۱،۲۴). شرایط مطلوب PCR-SSCP برای هرکدام از اگزون های مورد مطالعه با چندین بار تکرار آزمایش و به صورت تجربی به دست آمد. به منظور ارتقاء کیفیت تحقیق، تمام شرایط تکنیک PCR-SSCP رعایت شد. این روش دارای دقت ۱۰۰٪ نیست؛ اما با استفاده از نمونه های کنترل می توان دقت را به ۱۰۰٪ رساند. نمونه هایی که در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت ایجاد کردیم، هم زمان با نمونه های دیگر روی ژل برده شدند و الگوی متفاوتی ایجاد کردند که نشان دهنده صحت واکنش انجام شده است. علاوه بر این، با کاربرد روش هایی مانند هترودوپلکس می توان دقت را افزایش داد؛ بنابراین روش هترودوپلکس نیز هم زمان با PCR-SSCP به کار رفت. این روش قادر به شناسایی بازهای جفت شده ناجور با کارایی و دقت بالا است. در این مطالعه از تکنیک PCR-SSCP با دقت بالا استفاده شد و نتایج این روش با آزمایشات دیگر تأیید شدند؛ بنابراین داده های این تحقیق با اطمینان کامل ارائه شده است.

در یک مطالعه در هندوستان غربالگری اگزون های ژن MYBPC3 انجام شد. پس از انجام آنالیز به وسیله ی تکنیک SSCP، یک جهش در اگزون شماره ۱۹ و نیز یک SNP در اگزون شماره ۳۱ مشاهده شد (۳۲). حذف ۲۵bp در اگزون ۳۲ ژن در هند و در رابطه با HCM شناسایی شد (۳۳). یک حذف ۲۵ جفت بازی معمول در اگزون ۳۲ ژن MYBPC3 منجر به شناسایی ارتباط آن با کاردیومیوپاتی با فراوانی ۴٪ در آسیای شمالی شد (۳۴). در مطالعه حاضر که با هدف تعیین جهش ها در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد، نتایج زیر حاصل شدند: در اگزون ۳۰ ژن MYBPC3 هیچ گونه جهشی مشاهده نشد. در دیگر مطالعات انجام شده نیز در اگزون ۳۰ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM تغییر گزارش شده بود که برخی از آن ها به شرح زیر می باشند: در مطالعه ای که به طور مشترک در آلمان و ترکیه انجام شد، در اگزون ۳۰ ژن MYBPC3 جهش insAA1042 در موقعیت Ins of AA at nt 3156 و جهش delG1047 در موقعیت Del of G at nt 3171 شناسایی شد که هر دو منجر به از دست رفتن جایگاه اتصال میوزین بودند (۳۵). در مطالعه ای که در اسپانیا انجام شد، در اگزون ۳۰ ژن MYBPC3 جهش R1022S در موقعیت c.C3064A شناسایی شد (۳۶).

در مطالعه حاضر در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3 در هیچ کدام از نمونه ها تغییری مشاهده نشد. در حالی که در سایر مطالعات انجام شده، در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM تغییر گزارش شده بود که در زیر به برخی از آن ها اشاره شده: در مطالعه ای که در فرانسه انجام شد، در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3، اختلال در چارچوب خواندن به صورت یک مضاعف شدگی شناسایی شد (۳۷). در مطالعه ای که در آمریکا انجام شد، در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3 تغییر نوکلئوتیدی C>T با واریانت Q1233X و تغییر نوکلئوتیدی –1248 1253dup شناسایی شد (۳۸). در مطالعه ای که در آمریکا انجام شد، در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3، جهش 3776delA شناسایی شد. این جهش تغییر قالب ۱۶ اسید آمینه انتهای پروتئین را تغییر می دهد و منجر به اضافه شدن ۵۵ اسید آمینه می شود (۳۹). در مطالعه ای که در مجارستان انجام شد، در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3، جهش G1233T به علت ترانزیشن C-T در موقعیت c.C3752T شناسایی شد. این جهش منجر به ایجاد یک کدون توقف زودرس به جای گلوتامین در کدون ۱۲۳۳ (p.G1233T) می شود که

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

احتمالاً باعث از دست دادن ۴۸ اسید آمینه انتهایی در پروتئین C متصل شونده به میوزین می شود که شامل محل های اتصال برای میوزین و تیتین است (۴۰). در مطالعه حاضر، در اگزون ۳۰ ژن MYBPC3 تغییری مشاهده نشد و نتیجه می گیریم که جهش اگزون ۳۰ ژن MYBPC3 در بیماری زایی کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری نقش ندارد. در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3 نیز در هیچ کدام از نمونه ها تغییری مشاهده نشد؛ بنابراین می توان نتیجه گرفت که جهش در اگزون ۳۳ ژن MYBPC3 در بیماری زایی کاردیومیوپاتی هایپرتروفیدر استان چهارمحال و بختیاری بی تأثیر است. دلیل آن می تواند وجود ژن های مختلفی باشد که در HCM نقش دارند و جهش در آن ژن ها منجر به بروز بیماری می گردد؛ همچنین علت آن می تواند، وجود جهش در اگزون های دیگر ژن MYBPC3 باشد. در حالی که در سایر مطالعات انجام شده در دیگر مناطق، در اگزون ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM تغییر گزارش شده بود. علت احتمالی تفاوت در نتیجه حاصله می تواند تفاوت در ژنتیک منطقه ای بیماری باشد. به منظور شناخت بیشتر اساس ژنتیکی این بیماری و برای کسب اطلاعات مورد نظر جهت پیشگیری و مدیریت اختلال عملکرد قلبی وابسته به ژن MYBPC3، مطالعات بیشتری جهت بررسی دقیق تر جهش های این ژن در سایر اگزون ها لازم به نظر می رسد.

## نتیجه گیری:

بر اساس نتایج این مطالعه جهش در اگزون های ۳۰ و ۳۳ ژن MYBPC3 نقشی در ایجاد بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در جمعیت استان چهارمحال و بختیاری نداشته است و می طلبد که جهت بررسی علت بیماری HCM، دیگر اگزون های این ژن و نیز ژن های دخیل دیگر در این بیماری اقدام شود.

## تشکر و قدردانی:

بدین وسیله صمیمانه از پرسنل محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و کارکنان بخش اکوکاردیوگرافی بیمارستان هاجر استان چهارمحال و بختیاری و کلیه بیماران که صمیمانه ما را در اجرای این مطالعه یاری رساندند و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد جهت تصویب این پایان نامه به شماره ثبت ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۳۱۰۰۴ در تاریخ ۱۶ آذر ماه ۱۳۹۲ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

## منابع:

1. Thiene G, Corrado D, Basso C. Revisiting definition and classification of cardiomyopathies in the era of molecular medicine. Eur Heart J. 2008; 29(2): 144-6.
2. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med. 1995; 332(16): 1058-64.
3. Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? Curr Opin Cardiol. 2007; 22(3): 193-9.
4. Spirito P, Bellone P, Harris KM, Bernabo P, Bruzzi P, Maron BJ. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med. 2000; 342(24): 1778-85.
5. Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. Circulation. 2001; 104(12): 1380-4.
6. Varnava AM, Elliott PM, Mahon N, Davies MJ, McKenna WJ. Relation between myocyte disarray and outcome in hypertrophic cardiomyopathy. Am J Cardiol. 2001; 88(3): 275-9.
7. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol. 2001; 33(4): 655-70.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

8. Moreo A, Ambrosio G, De Chiara B, Pu M, Tran T, Mauri F, et al. Influence of myocardial fibrosis on left ventricular diastolic function: noninvasive assessment by cardiac magnetic resonance and echo. Circ Cardiovasc Imaging. 2009; 2(6): 437-43.
9. Wolf CM, Moskowitz IP, Arno S, Branco DM, Semsarian C, Bernstein SA, et al. Somatic events modify hypertrophic cardiomyopathy pathology and link hypertrophy to arrhythmia. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(50): 18123-8.
10. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. Cell. 1990; 62(5): 999-1006.
11. Landstrom AP, Ackerman MJ. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 2010; 122(23): 2441-9.
12. Ho CY. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 2010; 122(23): 2430-40.
13. Christiaans I, Nannenberg EA, Dooijes D, Jongbloed RJ, Michels M, Postema PG, et al. Founder mutations in hypertrophic cardiomyopathy patients in the Netherlands. Neth Heart J. 2010; 18(5): 248-54.
14. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, et al. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. Circulation. 1998; 97(22): 2230-6.
15. Oliva-Sandoval MJ, Ruiz-Espejo F, Monserrat L, Hermida-Prieto M, Sabater M, Garcia-Molina E, et al. Insights into genotype-phenotype correlation in hypertrophic cardiomyopathy. Findings from 18 Spanish families with a single mutation in MYBPC3. Heart. 2010; 96(24): 1980-4.
16. Olivotto I, Girolami F, Ackerman MJ, Nistri S, Bos JM, Zachara E, et al. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Mayo Clin Proc. 2008; 83(6): 630-8.
17. Van Driest SL, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Yield of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy. Mayo Clin Proc. 2005; 80(6): 739-44.
18. Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, Tierney DM, Mueller FO. Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006. Circulation. 2009; 119(8): 1085-92.
19. Dimitrow PP, Czarnecka D, Kawecka-Jaszcz K, Dubiel JS. Sex-based comparison of survival in referred patients with hypertrophic cardiomyopathy. Am J Med. 2004; 117(1): 65-6.
20. Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2005; 6: 185-216.
21. Lechin M, Quinones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, et al. Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 1995; 92(7): 1808-12.
22. Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. Lancet. 1993; 342(8879): 1085-6.
23. Blaxall BC, Spang R, Rockman HA, Koch WJ. Differential myocardial gene expression in the development and rescue of murine heart failure. Physiol Genomics. 2003; 15(2): 105-14.
24. Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat. 1993; 2(5): 338-46.
25. Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. Hum Mol Genet. 1994; 3(5): 801-7.
26. Kakavas VK, Plageras P, Vlachos TA, Papaioannou A, Noulas VA. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. Mol Biotechnol. 2008; 38(2): 155-63.
27. Heydari S, Khaledifar A, Poueahmad R, Hashemzadeh Cm, Heydari S, Bagheri N, et al. Investigation of mutations in exons 19-23 MYH7 gene in Hypertrophic cardiomyopathy patients using PCR-SSCP/HA technique in Chahahrmahal and bakhtiari province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013; 4(6): 35-44.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017

28. Heydari S, Pourahmad R, Khaledifar A, Hashemzadeh M, Amini Z, Badfar S, et al. Investigation of Mutations in Exons 12-15 MYH7 Gene in Hypertrophic Cardiomyopathie Patients Using PCR-SSCP Technique. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15(10):16-20.
29. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Eur J Heart Fail. 2008; 10(10): 933-89.
30. Huang X, Song L, Ma AQ, Gao J, Zheng W, Zhou X, et al. A malignant phenotype of hypertrophic cardiomyopathy caused by Arg719Gln cardiac beta-myosin heavy-chain mutation in a Chinese family. Clin Chim Acta. 2001; 310(2): 131-9.
31. Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Mol Ecol. 2000; 9(11): 1699-710.
32. Tanjore RR, Rangaraju A, Kerkar PG, Calambur N, Nallari P. MYBPC3 gene variations in hypertrophic cardiomyopathy patients in India. Can J Cardiol y. 2008; 24(2): 127-30.
33. Waldmuller S, Sakthivel S, Saadi AV, Selignow C, Rakesh PG, Golubenko M, et al. Novel deletions in MYH7 and MYBPC3 identified in Indian families with familial hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol. 2003; 35(6): 623-36.
34. Dhandapany PS, Sadayappan S, Xue Y, Powell GT, Rani DS, Nallari P, et al. A common MYBPC3 (cardiac myosin binding protein C) variant associated with cardiomyopathies in South Asia. Nat genet. 2009;41(2):187-91.
35. Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, Hummel M, Hammann J, Wollnik B, et al. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 2001; 38(2): 322-30.
36. Garcia-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, et al. [Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. Rev Esp Cardiol. 2009; 62(1): 48-56.
37. Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. Circ Res. 1998; 83(6): 580-93.
38. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 2004; 44(9): 1903-10.
39. Dellefave LM, Pytel P, Mewborn S, Mora B, Guris DL, Fedson S, et al. Sarcomere mutations in cardiomyopathy with left ventricular hypertrabeculation. Circ Cardiovasc Genet. 2009; 2(5): 442-9.
40. Toth T, Nagy V, Faludi R, Csanady M, Nemes A, Simor T, et al. The Gln1233ter mutation of the myosin binding protein C gene: causative mutation or innocent polymorphism in patients with hypertrophic cardiomyopathy? Int J Cardiol. 2011; 153(2): 216-9.

*Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*
*(J Shahrekord Univ Med Sci) 2016; 18(2): 10-20.*

***Original article***

# Study the presence of mutations in exons 30 and 33 MYBPC3 gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy by PCR-SSCP/HA method in Chaharmahal and Bakhtiari

Sheikhshahrokh A[1], Hashemzadeh Chaleshteri M[2*], Doosti A[1], Parchami Barjoui S[2]
Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran;
[2]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.
Received: 29/Jul/2015 Accepted: 1/Nov/2015

**Background and aims:** HCM is a common form of hereditary heart disease with Mendelian inheritance that is a frequent cause of sudden cardiac death in the people younger than 35 years. In more than 50% of cases the cause of HCM identified as gene mutations. Mutations in the gene MYBPC3 (which encodes the cardiac Myosin binding protein C) are about 40% of clinical cases. This study was aimed to investigate the presence of mutations in exons 30 and 33 MYBPC3 gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy in Chaharmahal and Bakhtiari.
**Methods:** 30 probands of hypertrophic cardiomyopathy were selected from patients referred to the cardiac clinic of the Shahrekord Medical University. DNA extraction was done by using of standard phenol - chloroform protocol from blood samples of patients. The exons 30 and 33 were amplified by PCR and were converted to single-stranded with SSCP and they electrophoresed with double-stranded sample on polyacrylamide gels.
**Results:** All of selected patients had hypertrophic cardiomyopathy with genetic cause. Qualities of extracted DNA were certified by electrophoresis and determination of their absorption ratio. By investigation of obtained results from SSCP/HA electrophorese in polyacrylamide, we did not find any change in exons 30 and 33.
**Conclusion:** None of the patients had mutations in exons 30 and 33 gene MYBPC3. Based on the results of this study, there is no change in exons 30 and 33 of MYBPC3 in hypertrophic cardiomyopathy patients with autosomal dominant heritage. As the result, the mentioned exons do not consider as suspicious exons for prognosis and cause of HCM in Chaharmahal and Bakhtiari province.

***Keywords:*** **Polymerase chain reaction, Single strand conformation polymorphism, MYBPC3, Exon 30, Exon 33.**

**Cite this article as:** Sheikhshahrokh A, Hashemzadeh Chaleshteri M, Doosti A, Parchami Barjoui S. Study the presence of mutations in exons 30 and 33 MYBPC3 gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy by PCR-SSCP/HA method in ChaharMahal and Bakhtiari. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(2): 10-20.

[*]**Corresponding author:**
*Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 009803833330709, E-mail: mchalesh@yahoo.com*



Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:03 +0430 on Tuesday September 12th 2017