مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (6) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (6) 2013

اكتشاف طفرتين في الإكسون 28 ضمن مورثة فون فيلبراند لدى مريضين راجعا مشفى هلم شاير الجامعي

الدكتور محي الدين عيسى*

(تاريخ الإيداع 7 / 5 / 2013. قبل للنشر في 18 / 8 / 2013)

□ ملخّص □

اكتشفت طفرتان في الإكسون 28من مورثة فون فيلبراند لدى رجل A وامرأة Bمصابين بمرض فون فيلبراند.

وقد أظهرت الاختبارات النوعية مثل مقايسة ارتباط VWF:FVIIIومقايسة ارتباط الكولاجن VWF:CB وتحليل بروتين العامل VWFأن مرض VWDهو من نمط 2Aفي المورثة .كما كشف تحري الإكسون 28 بواسطة تقنية PCR وسلسلة أسس الدنا DNAعن وجود الطفرة A_1 (C>T) في المريض A والطفرة B_1 (G>A)في المريضة Bوهي طفرات مسؤولة عن ظهور المرض VWDمما يؤكد على أن مورثات التخثر الطبيعية هي مورثات منظمة ومبرمجة ذاتياً.

الكلمات المفتاحية : الطفرات –مرض فون فيلبراند –عامل فون فيلبراند متعدد الأجزاء –الإكسون –المورثة الجينومية –الصفيحة الدموية–تسلسل الدناDNA

* أستاذ– قسم علم الحياة الحيوانية –جامعة دمشق –سورية

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (6) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (6) 2013

Exploring two mutations in the exon 28 of Von Willebrand genein two patients follow up the Halmshire hospital – university

Dr. Mohiddin Issa*

(Received 7 / 5 / 2013. Accepted 18 / 8 /2013)

□ ABSTRACT □

Two mutations of exon 28 in the Von Willbrand gene have discovered intwopatients (female and male).Specific tests such as the VWF: FVIIIbinding assay, collagen binding assay VWF:CB and VWF proteinanalysis give that VWD is a type of 2A at the gene. Investigating exon 28 by PCR technique and DNA sequencingrevealed mutation A_1(C>T) in patientA and a mutationB_1(G>A) inpatientB. These mutations are responsible for the presence of VWD.

Assuring that natural genes involved in coagulation are well organised and automated.

Key words: mutations - Von Willebrand disease - VWD- Von Willebrand factor - VWF multimers - exon - genomic gene platelet - DNA sequencing

***Professor, Biology Department , Damascus university , Syria**

مقدّمة:

تشمل المقدّمة عرضاً للدراسات المرجعية حول مشكلة البحث وكيفية الوصول إلى الطفرات :

مرض فون فيلبراند : (V.W.D)

هو مرض وراثي نادر يصيب الرجال والنساء معاً على حد سواء .ويتميّز باعتلال نزفي دموي طويل الأمد ينتج عن انخفاض في مقدار العامل فون فيلبراند (V.W.F) بسبب حدوث طفرة في مورثة العامل .(V.W.Gene) وقد أخذ المرض اسمه من اسم الدكتور فون فيلبراند عام1926الذي وصفه لأول مرة في جماعات من العرق القوقازي واسماه بمرض الهيموفيليا الكاذبة ؛ إذ وجد أن المرض يظهر بمعدل 4–3 في كلّ مئة ألف نسمة(1)

مورثة العامل: (VWGene) VWF

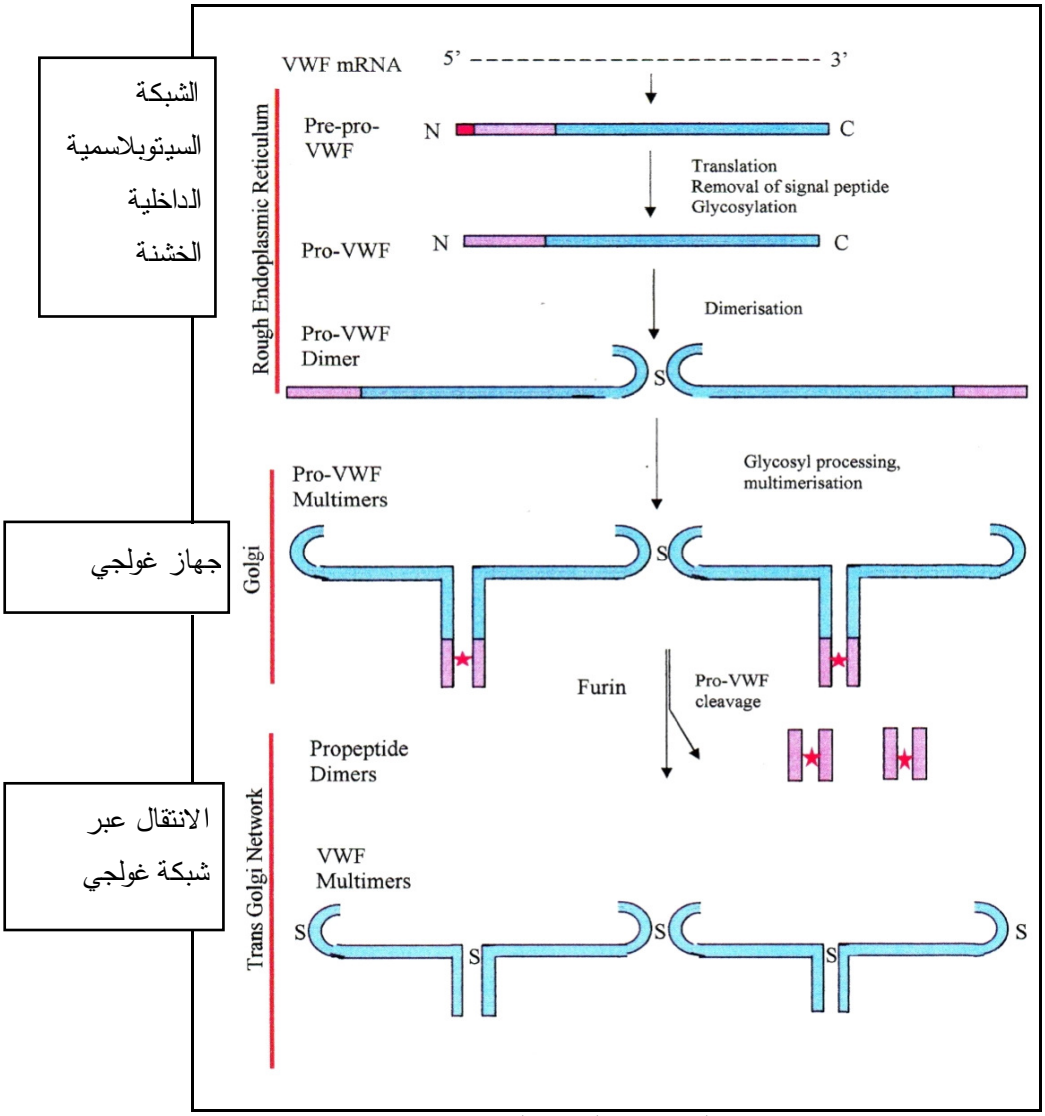
تقع مورثة العامل VWF في الموضع $12P^{12pter}$ من الذراع القصير للصبغي البشري رقم 12 وتتألف من 52إكسوناً بحجم 180 kbase ؛ إذ ترمز الأكسونات 17 الأولى على تركيب ببتيدي الإشارة والطليعة بينما ترمز الإكسونات الباقية35 على بروتين العامل VWF بشكله الوظيفي ثلاثي الأبعاد ولهذا يورث مرض VWD بالوراثة الجسمية(2)

عامل فون فيلبراند: (V.W.F)

هو بروتين تميم أنزيم يتألف من 2813 حمضاً أمينياً منها 22 حمضاً أمينياً تشكل ببتيد الإشارة (signal peptide) ومنها 741 حمضاً أمينياً تشكل طليعة الببتيد مولدة الضد ((antigeneومنها 2050 حمضاً أمينياً تشكل بروتين العامل الناضج(3)

اصطناع العامل:(V.W.F)

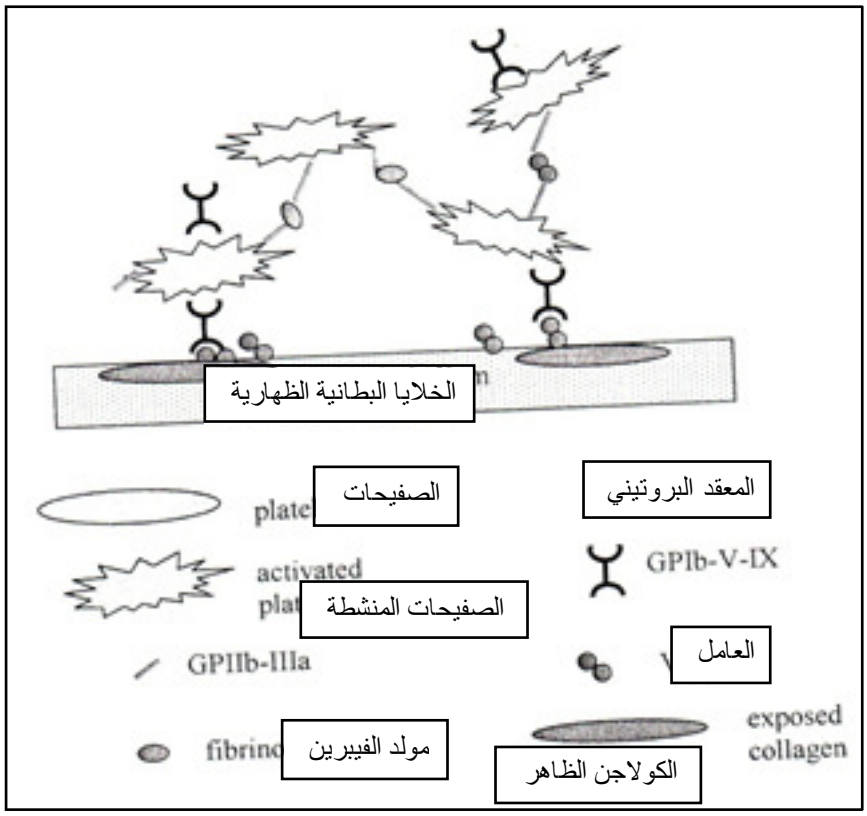
يصطنع بروتين عامل V.W.F في الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية الخشنة بعد ترجمة الرنا المرسالmRNA للمورثة إلى Pre–Pro VWF؛ إذ ينفصل ببتيد الإشارة أنزيمياً وتضاف السكريات وتتشكل البلمرة الثنائية (dimerization)بروابط ثنائية الكبريت ثم تمرّ إلى جهاز غولجي وتنفصل طليعة الببتيد بفعل الفيورين (furine) ويتحرر بروتين العاملVWFمتعدد الأجزاء) شكل (1ويخزن في جسيمات Weibel وفي حبيبات الفا الصفيحية وفي الخلايا البطانية وعندما تنشط الصفيحات الدموية في بداية التخثر تتحرر هذه العوامل كلّها علماً انه يبقى أكثر من 5% حراً في جريان الدم.(4)



(الشكل 1): مخطط يبين اصطناع البروتين VWF في الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية حيث يشير حرف S إلى الارتباط ثنائي الكبريت وتشير * إلى الارتباط غير التساهمي بينما يشير اللون الأزرق الخفيف إلى البروتين VWF الناضج ويشير اللون البنفسجي إلى الطليعة(26)

دور العامل V.W.F في التخثر:

يقوم العامل V.W.F البروتيني بتشكيل جسر بين جدار الوعاء الدموي الشعري المعطوب وبين الصفيحات الدموية بمساعدة المعقد البروتيني السكري الصفيحي Gp1-V-1X للصق الصفيحاتبعد تنشيطها على شفتي الجرح (شكل 2) من خلال المستقبلات المحرضة بالعامل FIII وبمساعدة الكالسيوم (Ca++) والفيتامين K ومولد الفيبرين (fibrinogen)البلاسمي وباستمرار الالتصاق تفعل الصفيحات المتراكمة على الكولاجن (Collagen) لتصمم وتهندس السدادة Plug))الدموية بحجم الجرح ولتنحل بعد شفاء الجرح بمنظومة وراثية مبرمجة يدخل فيها أنزيم البلازمين.(5)

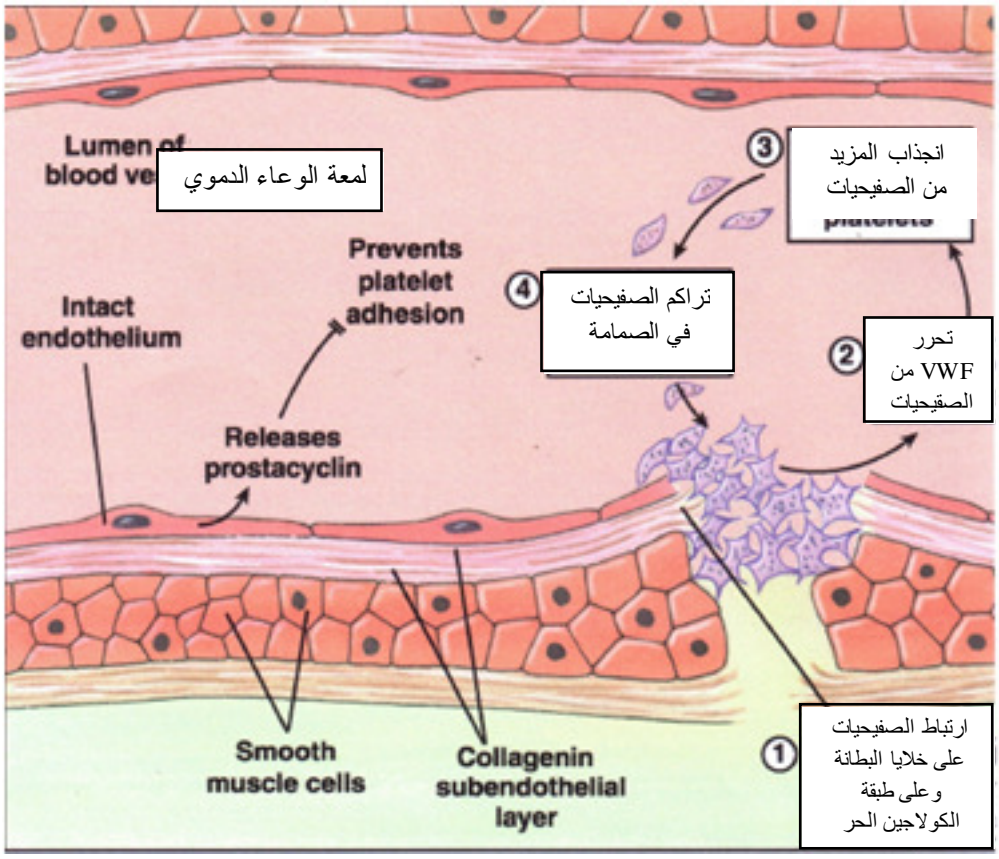


(الشكل 2) : مخطط يبيّن دور العاملVWF كجسر بتوسط الصفيحات الدموية وينشطها على جدار الأوعية الدموية المعطوبة ويلصقها على الكولاجن (Collagen) ويربط الصفيحات معاً(6)

الصفيحات الدموية(Platelets):

هي خلايا دقيقة (لا نواة لها)تنتج من تبرعم الخلايا النواء العملاقة (megakaryocytes) بقطر (1-2) ميكرومتر) وتوجد بمعدل من 150 إلى 350 الف صفيحة في الميلمتر المكعب الواحد (وتدور في الدم .وينتج عن التصاقها على الكولاجن في عملية التخثرتحرر محتوى حويصلاتها الافرازية المشتملة على العامل V.W.F ومختلف العوامل الكيميائية الأخرى لتتراكم الصفيحات وتغير شكلها الكروي إلى الشكل المتطاول) المشرشر (مما يشكل طوراً مهماً في عملية التخثر ؛ إذ يلعب العامل V.W.F بارتباطه إلى المعقد البروتيني الصفيحي Gp1b-v-1x دوراً مميّزاً في تنشيط الصفيحات للالتصاق والتكدس وهذا يتطلب وجود أنزيم thrombin وبذلك تلتصق الصفيحات وتتراكم كما تتحول مادة مولد الفيبرين إلى فيبرين (fibrin) وبذلك يرتبط العامل V.W.F في البطانة الداخلية مع شروط الجهد العالي لتدفق الدم لأن بنية العامل V.W.F أساس للالفة العالية للارتباط ولهذا يعرف العامل V.W.F بأنه البروتين اللاصق (adhesive) (7).

وتتألف الخثرة الدموية (شكل 3) من السدادة (الصمامة) المؤلفة من الصفيحات المنغمرة في شبكة الفيبرين(غير المنحلة)وأسر العديد من الكريات الحمر والبيض وغيرها لوقف النزيف الدموي.(8)



(الشكل3) : مخطط يبين آلية تشكل السدادة الصفيحية (الخثرة الدموية) بحجم الجرح خلال النزف الدموي بفعل VWFالالتصاق الخلية الصفيحية مع الخلية الصفيحية الأخرى وتراكم الصفيحات مع التصاق الخلايا الصفيحية بالخلايا البطانية وطبقة الكولاجن (8)

التفاعل التسلسلي البوليميرازي: (PCR)

هي تقنية تعتمد على تضخيم الدنا (DNA) باستعمال أنزيم دنا بوليميراز المقاوم للحرارة ثمّ رحلانه الكهربائي على هلام الاغاروز ((agarose gel التي تسمح بفصل العصائب وتباعدها .؛ إذ ترحل شدف الدنا المشحونة سلباً وهي في قوالب الهلام نحو القطب الموجب بسرعة تتناسب عكسياً مع عدد أشفاع الأسس .فالجزيئات الكبيرة تتحرك ببطء أكبر من الجزيئات الصغيرة وبعدها تدرس العصائب من خلال استخدام الملونات البينية مثل إيثيديوم بروماید (Ethidium Bromide)وتصويرها بالأشعة فوق البنفسجية وهي في الهلام(9)

تسلسل الدنا: (DNA Sequence)

هو تحديد تتابع أحرف البنية الأولية لجزيء الدنا وهذه الاحرف هي الأدنين (A)والستوزين (C) والغوانين (G) والتايمين (T) الممثلة للنكليوتيدات الأربعة وهم وحدات سلسلة الدنا ويجب أن تكون أحرف هذا التسلسل متلاحقة بحيث يتلو كلّ حرف الحرف الآخر من دون فجوات أو انثناءات ويكون الرحلان على هلام عديد الأكريلاميد الذي يتيح فصلاً عالياً إلى حدود الأساس الواحد.(10)

طفرات الإكسون: 28

عرفت طفرات الإكسون 28 في المجال 2A من مورثة العامل VWF منذ عام 1989 ودرس منها حتى عام 45(2005) طفرة وتحدث هذه الطفرات بسبب تغيّر في أحد أسس الكلمات الوراثية ثلاثية الأحرف triplets والمعروفة

باسم التعدد الشكلي للنكليوتيد الواحد (SNP) وينتج عنها انخفاض نوعي في كمية العامل VWF وفي إلفته مع معقد التخثر GP1b وفي الربط غير التساهمي مع العامل FVIII وهي مخزنة في البنك الوراثي(30) NCBI

أهمية البحث وأهدافه:

تهدف هذه الدراسة إلى توصيف مورثة مرض VWD في مجال 2A في حالتي عدم وقف النزيف الدموي وعدم تكون الخثرة واعتماد الاختبارات المخبرية الجزيئية على مستوى مستضد العامل V.W.F ونشاط العاملين VWF و .FVIIIوإجراء المقايسات المتخصصة للارتباطVWF:FVIII و .VWF:CBوتحليل بروتين العامل V.W.F عالي الوزن الجزيئي واستخدام تقنية التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR) لتحديد العصائب الطافرة .ومسح الإكسون 28حاسوبياً لتحري تسلسل أسسه وتحديد الأساس الطافر ثم مسح كامل سلسلة المورثة)الجين(المعرفة الطفرة في الحالة الوراثية موضوع الدراسة.

طرائق البحث ومواده:

قمنا باستخدام المواد والأدوات والأجهزة الموجودة في مخبر قسم الوراثة الجزيئية وذلك من واقيات) (دارئات) (Buffers) وبادئات نوعية ومختلف المحاليل والأنزيمات وتقنية PCR وتضخيم الدنا ورحلانه وقراءة سلسلة الدنا وتطبيق المقايسات واستعمال الأجهزة المختلفة:

• جمع الدم:

جمعنا الدم الوريدي من مريضين هما رجل (A)وامرأة (B)المشخصين مسبقاً بمرض VWDمن أصل 45 مريض راجعوا مركز التخثر والنزف في مشفى هالم شاير الجامعي و ذلك بعد استخدام الدارئة المضادة للتخثر بنسبة (0.038 %)

• فصل البلاسما :

أخضعنا عيّنات الدم السابقة إلى التثفيل بسرعة2500gلمدة 10دقائق ثم أخذت البلاسما وخزنت في 1مل في الدرجة (70c°−)

• استخلاص الدنا الجينومي :

تمّ استخلاص الدنا الجينومي من الخلايا المترسبة باستخدام طاقم جاهز (Nucleon Bacc2 Kit)بحلّ الكريات الحمر وتفكيك بروتينات الكريات البيض وبالتثفيل لمدة 20دقيقة بسرعة 1800gثم غسل الراسب بالدارئة Lysis Bufferثم التثفيل ثانيةً بسرعة 1300gلمدة 3دقائق ثم أخذ الدنا الجينوميم قدراً بالميكروغرام (µg)وخزّن في الدرجة (20c°−)

• مقايسة مستضد العامل VWF: Ag

تمّت مقايسة المستضد VWF: Agللعامل VWFباستخدام طاقم جاهز)اليزا (ALISA؛ إذ تغطى صفيحة مكروية براصة العامل VWF المتعددة النسيلة وتوضع فوق مستضد العامل VWFثم تترك لمدة ساعة وبعدها تغسل بالدارئةPBS Buffe r ثم تقارن ببلاسما الأفراد الأصحاء الشواهد لقياس المستضد Ag بمقايسة مناعية .(11)

• مقايسة ارتباط FVIII: VWF

تمّت مقايسة ارتباط العامل FVIIIبالعامل VWFباستخدام الطاقم الجاهز (FVIII Chromogenic–Kit) ثم مقارنته مع الارتباط في البلاسما المأخوذة من الأسوياء)الشواهد (لقراءة الصفيحة المكروية في 405 نانومتر بالمقايسة اللونية لمعرفة كمية VWFالمرتبط بالعامل FVIII (12).

• مقايسة العامل المساعد ريستوساتين ((ristocetin للعامل (VWF (VWF:Rco

تمّت مقايسة هذا العامل المحرض للتراص الصفيحي ولفاعلية العامل FVIIIباستخدام الطاقم الجاهز (RCOchromogenitic Kit) لتحري نشاط VWF:Rco(13)

• مقايسة ارتباط الكولاجن بالعامل VWF

تمّت مقايسة هذا الارتباط VWF:CBباستخدام الطاقم الجاهز (WF:CB–immunozymKit)وبتطبيق المعايير الواردة في الطاقم مع نتائج التجربة مع الشواهد بعد تغطيتها مع الكولاجن البشري وسلسلة من الغسل والتمديد والحفظ بالمحم لفترات مختلفة حتى ظهور اللون لقراءة النتيجة (14)

• تحليل بروتين العامل VWF

العامل VWFهو بروتينسكري متعدد السلاسل .وقد تمكنا من تحليله بواسطة سولفات دوداسيل الصوديوم (soudium dodecyl sulphate))بعملية صبّ البلاسما المخزنة في 1mlعلى هلام الأكاروز واستخدام الرحلان الكهربائي لفصل مكونات بروتين VWFعالي الوزن الجزيئي حتى إظهار لمعان (Luminescent visualization) العصائب في الهلام لدراستها بماسح الصور الحاسوبي ببرنامج Syn Geneلمعرفة تنميط المرض VWD(15)

• تقنية PCR وتضخيم الدنا((DNA

بتطبيق تقنية PCR بأخذ (1µg)من جينوم الدنا في كلّ إنبوب تجربة مع دارئة من (16 mM–NH4, 0.4,mM, Tris– HCl PH8.8, 0.01% tween 20) وعلى (1U)بوليميراز دنا Taq(Bioline)وعلى 200µm من كل dTTPو dGTPو dCTPو dATP ومع 300ngلكل من البادئات (شكل4) الأمامية والعكسية للإكسون 28وعلى الطاقم الجاهز (Minelute PCR Purification Protocol Kit)لتنقية الشدف. وتبدأ الدورة الحرارية من خطوة التمسخ denaturation لفصل سلسلتي دنا الحلزون المتتامتين لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة (96c°)ثم خطوة التلدن الحراري لالتصاق البادئ لتقديم الزمرة –OHلاستهلال السلسلة الجديدة لمدة دقيقة واحدة بالدرجات 48 و 55و 59وإلى خطوة الاستطالة والتتام بين السلسة الأصلية)المرصافية (والسلسلة الجديدة بالاتجاهين لمدة دقيقتين بالدرجة 72° وبإضافة النكليوزيدات الريبية المنقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات (dNTPs)إلى السلسلة النامية وبهذا نحصل على عدد كبير من النسخ 35)دورة (وهذا هو التضخم أو التكثير (amplification)وبعدها توضع الهلامات بشكل مقلوب على مقياس الأشعة فوق البنفسجية (UV)لتصور عصائب التضخم للإكسونات 28لدراستها في المريضين والشواهد لتحديد العصائب الطافرة وتحريها (16)

Exon 28 primer detailsتسلسلات بادئات الأكسون 28		
Exon Number		Primer sequenceتسلسلات البائات
28-1	بادئتا السلسلة الأمامية و العكسية	GGG AAT ATG GAA GTC ATT G ACA GTG TGT ATT TCA AGA CCT
28-2	بادئتا السلسلة الأمامية و العكسية	CCC AGA AGT GGG TCC GCG TGG CC CAC AGA GGT AGC TAA CGA TCT CG
28-3	بادئتا السلسلة الأمامية و العكسية	ACC TCA AGC AGA TCC GCC TCA TC GCC CAG TGT TGG TCC TGT TGC CG

(الشكل4) : جدول يبيّن بادئتي دنا المريض (exon 28-1) A وبادئتي دنا المريضة (exon 28-2) B وبادئتي دنا الشاهد (exon 28-3)

8) تسلسل الدنا DNA

قمنا بدراسة تسلسل أسس السلسلة الواحدة باستخدام البادئات النوعية وبإضافة العديد من النكيلوزيدات الريبية المنقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات ($dNTP_s$) كما هو الأمر في تقنية PCR وبإضافة العديد أيضاً من ثنائي ($\overline{2}-\overline{3}$) نكليوزيدات ريبية منقوصة الأوكسجين متفلورة منddATP ومن ddCTP ومن ddGTP ومن ddTTP مقاومة للحرارة وبتطبيق تقنية وقف نمو السلسلة العشوائي على هلام عديد الأكريلاميد لإظهار الأساس الواحد في التسلسل لأن كل من $ddNTP_s$ يمتلك ميسم (tag) متفلور يعطي اللون الأخضر (الفلوريسين) للأدنين واللون الأحمر (الرودامين) للثايمين واللون الأزرق (الكومارين) للسيتوزين واللون الأسود للغوانين (17). وتتم تقنية التسلسل بفصل سلسلتي الدنا لمدة دقيقة واحدة بالدرجة (°94)وارتباط البادئ المناسب على سلسلة واحدة فقط لمدة 15 ثانية بالدرجة (°50) وبالاستطالة بنمو السلسلة الجديدة لمدة 4 دقائق بالدرجة (°60) بإضافة مزيج من dNTPs ومنddNTPs المتفلورة لقراءة تسلسل سلسلة واحدة بتسجيل إشارة الفلورة كلما عبر الدنا (DNA) نقطة ثابتة في الهلام من داخل البئر الواحد لأن شعاع الليزر يحرض الملونات على الفلورة بالحد الأعلى وبعدها تظهر القمم المتفلورة في المخطط البياني لتسلسل الأسس ضمن برمجيات الحاسوب لمعرفة الأساس الطافر:

a) لأظهار تسلسل الأكسون 28 نستخدم البادئات الأمامية (الشكل4) لقراءة المخطط البياني ومنه تحديد الأساس الطافر من سلسلة الأكسون المرمزة

b) كشف الطفرة:

c) تستخدم تقنية الحلزون المتغاير (heteroduplex) بتهجين الأكسون28للمريض مع الأكسون 28 للشاهد واستخدام البادئة العكسية (الشكل4) حتى ظهور القمم المتفلورة لسلسلتي الحلزون المتغاير وبالتصوير بالأشعة فوق البنفسجية وقراءة السلسلتين المرمزتين لكشف الأساس الطافر (18)

d) سلسلة دنا المورثة:

يستخدم جهاز التسلسل الآلي (Automated Sequencer) المرتبط بنظام حاسوبي لإظهار القمم المتفلورة لأسس المورثة بعد تطبيق بادئتها لزمن يتراوح (12-24) ساعة لقراءة سلسلة الدنا من المخطط البياني للبرنامج الحاسوبي للمورثة الطافرة بعد مقارنته مع سلسلة دنا مورثة الشاهد المرمزة التي تمت قراءة تسلسلها الكامل في الخريطة الأولى لمشروع الجينوم البشري (2003) التي خزنت في البنك الجيني (NCBI) للتأكد من وجود الأساس الطافر (19)

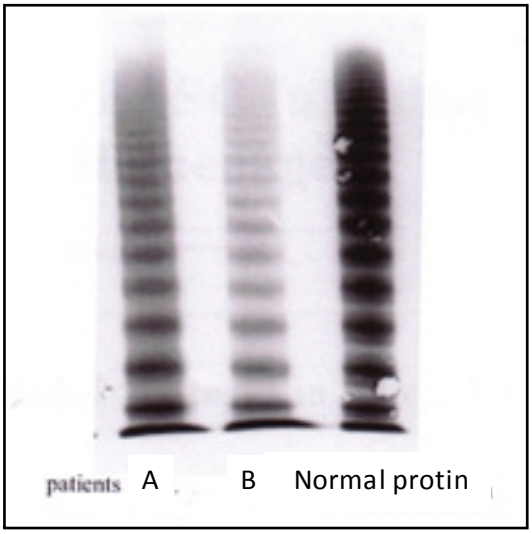
النتائج والمناقشة:

النتائج (Results)

يمكن عرض النتائج بالصورة الآتية:

1. تحليل عصائب بروتين العامل VWF

تبين صور المسح الحاسوبي لتحليل بروتين العامل VWF للمريضين A وBوهو في الهلام ظهور عصائب منسجمة في نمطها ونوعها وتسلسلها بالمقارنة مع العصائب الطبيعية الشاهدة ولكنها تختلف عنها بالحجم جزئياً (الشكل5) كما يبين قياسها في الكثافة اللونية بعد الرحلان الكهربائي ومقارنة مرتسماتها مع مرتسمات بروتينات الشواهد وجود انخفاضٍ في كمية البروتين بمعدل (10–15) % مما يشير إلى وجود المرض VWD في المجال 2A



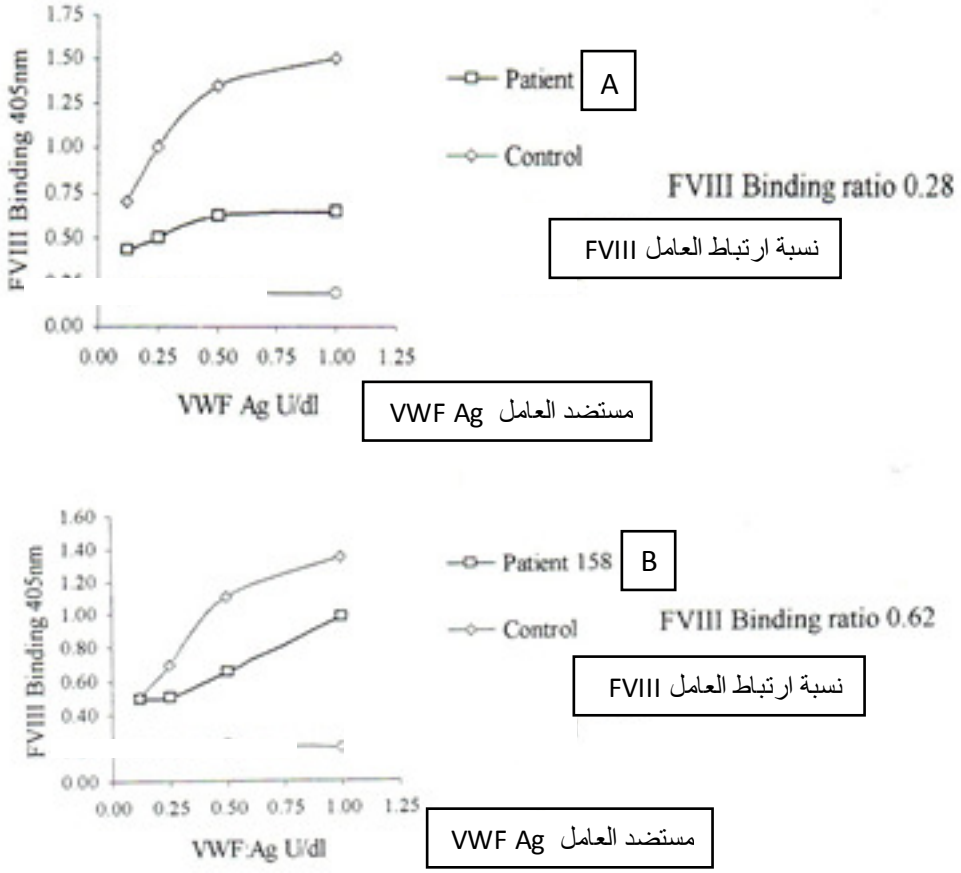
(الشكل5) : صورة تبين نمط عصائب VWFفي المريضين A و B
المنسجمة مع عصائب بروتين الشاهد الطبيعي ولكنها تختلف عنها في الحجم نسبياً

2. مقايسة مستوى مستضد العامل VWF:Ag

أظهرت مقايسة مستوى مستضد العامل VWF:Agفي بلاسما المريضين A وBمقارنةً بمستويات بلاسما الشواهد بعد ظهور اللون الواضح للكثافة البصرية (490nn)اختلافاً بين كميتي VWF: RCO وVWF: Ag مما قد يؤدي إلى تغير في وظيفة البروتين العامل VWF المنخفض نوعياً.

3. مقايسة ارتباط العامل FVIIIبالعامل VWF

تظهر نسبة ارتباط العامل FVIIIبقرينه VWFفي المريض (A) بمعدل 28 % وتظهر هذه النسبة بمعدل 62 % في المريضة(B)مما يشير إلى اعتماد العامل FVIII بوظيفته على العامل VWF وإلى ارتباطه الجزئي (0.28–0.62)الذي هو أعلى للمريضة(B)مما يفترض وجود خلل حاسم في وظيفة FVIIIفي المريضة (B) عندما يختل العامل VWF(شكل6)



(الشكل6): مخططان بيانيان للمريضين A و Bيشيران الى الارتباط الجزئي للعاملين FVIIIو VWF حيث يرتبط FVIII إلى VWFبالطور الصلب التركيز (U/d_1) ضد التماص بسرعة الموجة405nmمما يشير إلى خلل ناتج في الارتباط

4. مقايسة VWF:CB هي اختبار مناعي تم فيه حساب نسبة كل من VWF:Ag/VWF:CB لكل مريض وشاهد بعد قراءة الصفيحة بموجة 450 µ m وحساب النسبة VWE:CB/VWF:Ag لكل مريض وشاهد مما يشير إلى الألفة المنخفضة لربط الكولاجن والعامل VWFعلى الصفيحات الدموية في المريضين A و B.

5. مقايسة ارتباط العامل المساعد RCO(ristocetin)

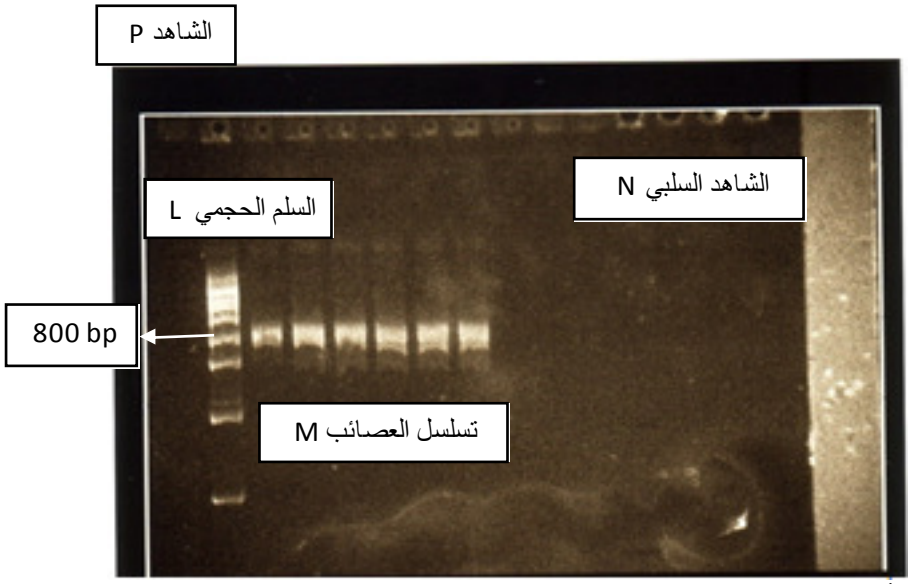
يشير هذا القياس في التجربة إلى انخفاض في إلفة VWF و RCO المرتبطةببروتين العامل VWFعند تراكم الصفيحات في عملية التخثر وتشكل السدادة

6. عصائب (Bands) دنا الإكسون 28 المضخمة

تظهر صورتقنية PCRوتضخيم الإكسون 28(الشكل7) بالبادئتين الأمامية والعكسية عصائب نوعية تدل على وجود عصابة طافرة واحدة خارج خط العصائب في المريضينA و B وعلى عدم وجودها في تسلسل عصائب الشاهد النموذجي. كما تدل الصورة على عدم وجود أي تلوث في الشاهد السلبيN (الماء المقطر) وترمز أحرف الصورة إلى أن P للمريض أو للشاهد و L للسلم الحجمي وMالتسلسل العصائب وNللشاهد السلبي علماً أن تسلسل العصائب M تعود إلى عدة تفاعلات وتجارب أخذ منها الشكل النموذجي

أولا"عصائب الشاهد

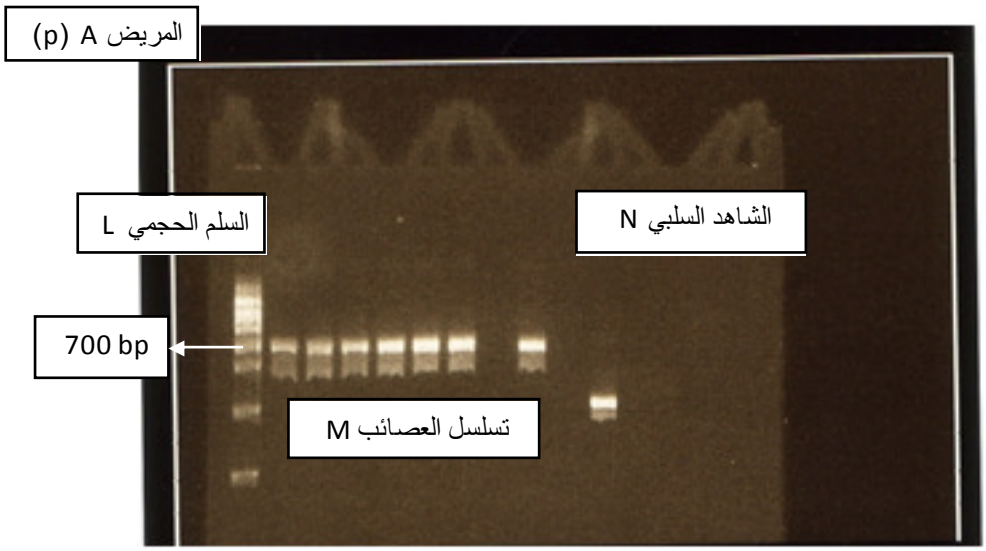
تظهر الصورة (الشكل 7– أ) سلسلة من العصائب المتجانسة النموذجية المتتالية في الإكسون 28من دنا الشاهد كعصابة واحدة بحجم 800bpفي المستوى نفسه مما يؤكد على خلو الشاهد من الطفرات الجزيئية



(الشكل 7 – أ)عبارة عن صورة عصائب الإكسون 28 في الشاهد حيث تتسلسل العصائب المتجانسة في مستو واحد

ثانياً عصائب المريض A

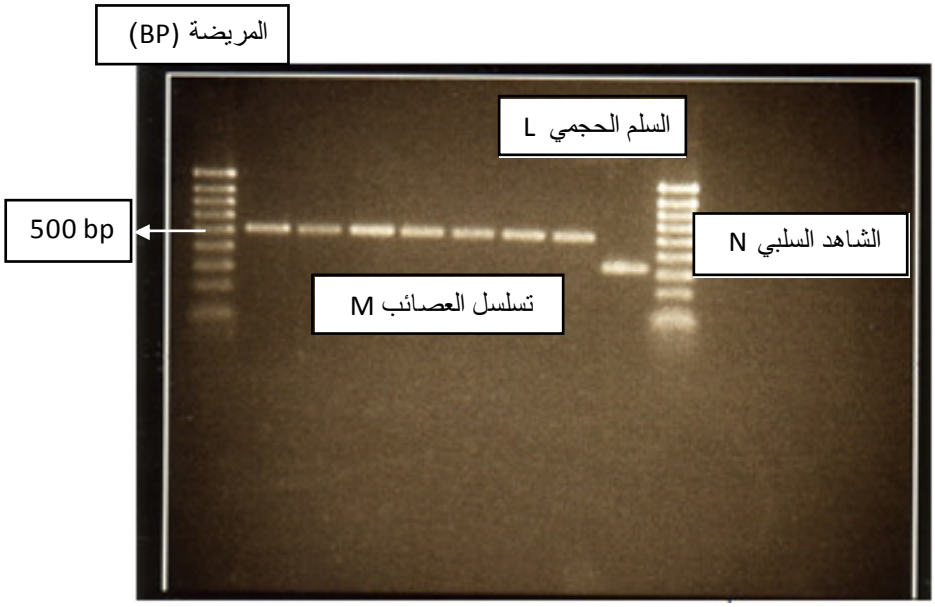
تظهر الصورة (الشكل 7– ب) وجود عصابة واحدة خارج خط العصائب في المريض A مما يشير إلى وجود عصابة طافرة في الإكسون (28) وبمقدار حجمي يصل إلى 700bpمقارنة بالسلم الحجمي



(الشكل 7 –ب)صورة نموذجية تبين عصائب الإكسون28 في المريض Aالتي تظهر وجود عصابة طافرة واحدة خارج خط العصائب

ثالثا"عصائب المريضة B

تظهر الصورة النموذجية (الشكل7–ج)وجود عصابة واحدة 500bp خارج خط العصائبمما يشير إلى وجود طفرة واحدة في الإكسون 28 للمريضة B

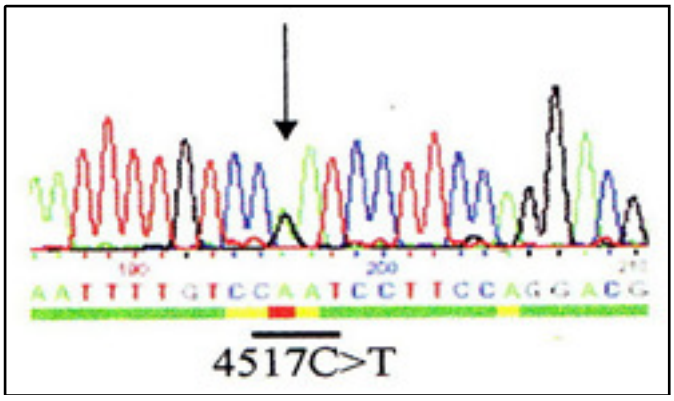


(الشكل 7 –ج) صورة عصائب الأكسون 28 في المريضة B تبين وجود عصابة واحدة طافرة خارج خط العصائب

7. تحديد تسلسل الطفرتين A_1 و B_1

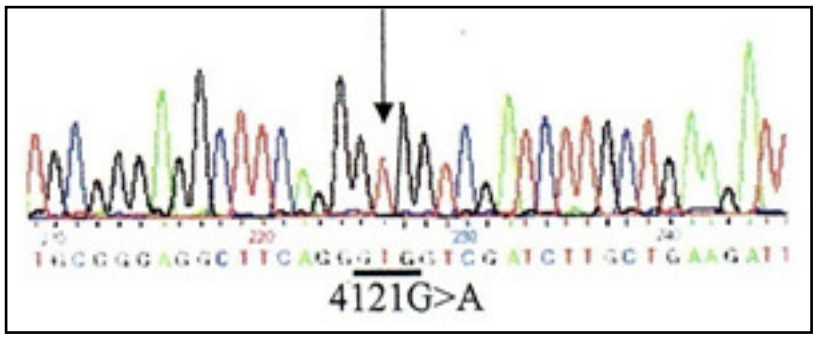
يظهر المخطط البياني للمسح الحاسوبي بتطبيق تقنية سلسلة دنا الإكسون 28 أن الطفرة A_1 هي C>T4517وأن الطفرة B_1 هي G>A4121 على السلسلة المرمزة (coding strand) بعد التاكد من ثباتها كما يأتي:

a) يظهر تسلسل الأكسون 28 في المريضA(المتغاير اللواقح)حدوث طفرة مورثية أدت لتغير أساس السيتوزين (C) إلى أساس الثايمين (T) على السلسلة المرمزة لأن استخدام الحالةالعكسية يظهر تغير CGA إلى CAA (الشكل8) وهذا يعني أن التغير حصل في السلسلة المرمزة TCG إلى TTG



(الشكل8) : يبين المخطط البياني لطفرة C>T 4517 في الإكسون28 للمريض A للحالة العكسية التي تظهر CAA التي هي TCG المتغيرة إلى TTG على السلسلة المرمزة

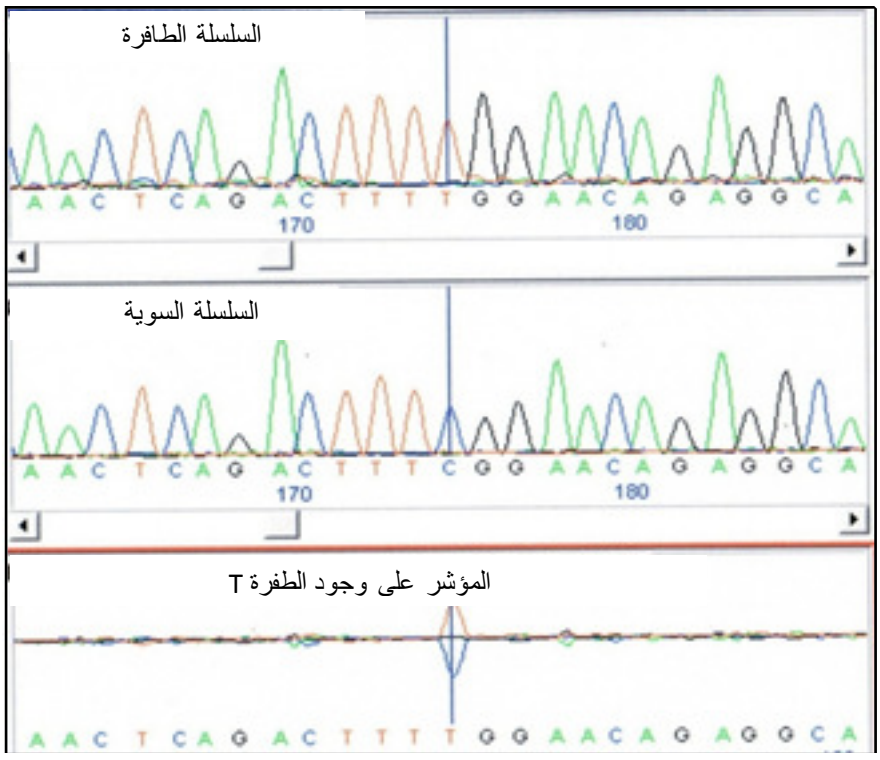
b) يظهر تسلسل الأكسون 28 في المريضة B(المتغايرة اللواقح) تغير أساس الغوانين (G) إلى أساس الأدنين (A) على السلسلة المرمزة لأن استخدام الحالةالعكسية يظهر تغير GCG إلى GTG (الشكل9) وهو يمثل على السلسلة المرمزة $C\underline{G}C$ إلى $C\underline{A}C$



(الشكل9) المخطط البياني لتسلسل الإكسون 28 للمريضة B يظهر الطفرة G>A4121
باستخدام الحالة العكسية التي تظهر GCG إلى GTG التي هي تغير في $C\underline{G}C$ إل$C\underline{A}C$على السلسلة المرمزة

8. تسلسل كشف الطفرة

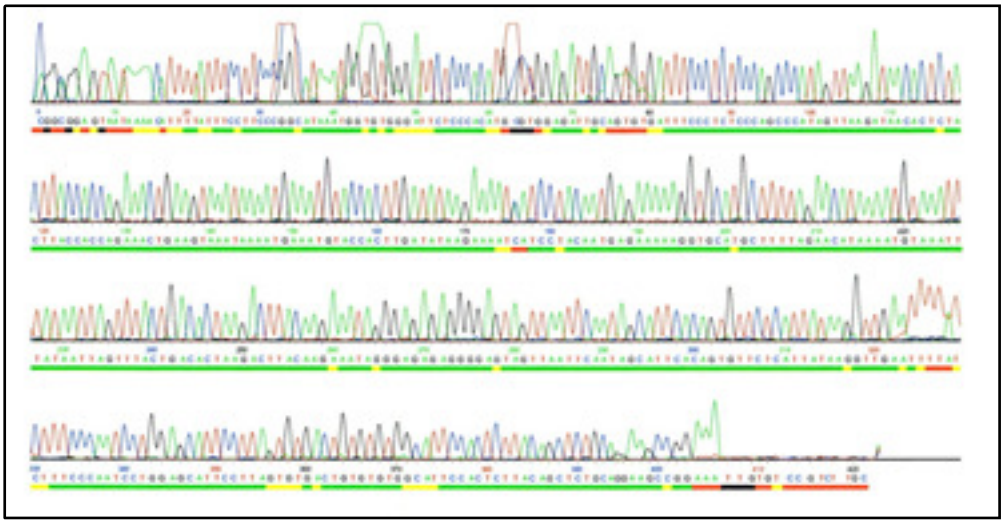
يتبين بتطبيق تقنية كشف الطفرة في المريض A وبالمقارنة بين سلسلتين مرمزتين لهما نفس التسلسل في إكسوني المريض والشاهد أن السلسلة الطافرة تحمل الأساس (T) وان السلسلة الشاهدة تحمل الأساس (C) في الإكسون 28وهذا يكفي للتوثيق(الشكل10).



(الشكل10): يبين المخططان البيانيان لكشف الطفرة من C إلى T إذ تم استبدال السيتوزين (C) في السلسله المرمزة للشاهد السوي بالثايمين (T)في السلسلة المرمزة للمريض Aوهذه الطفرة يشير إليها المؤشر

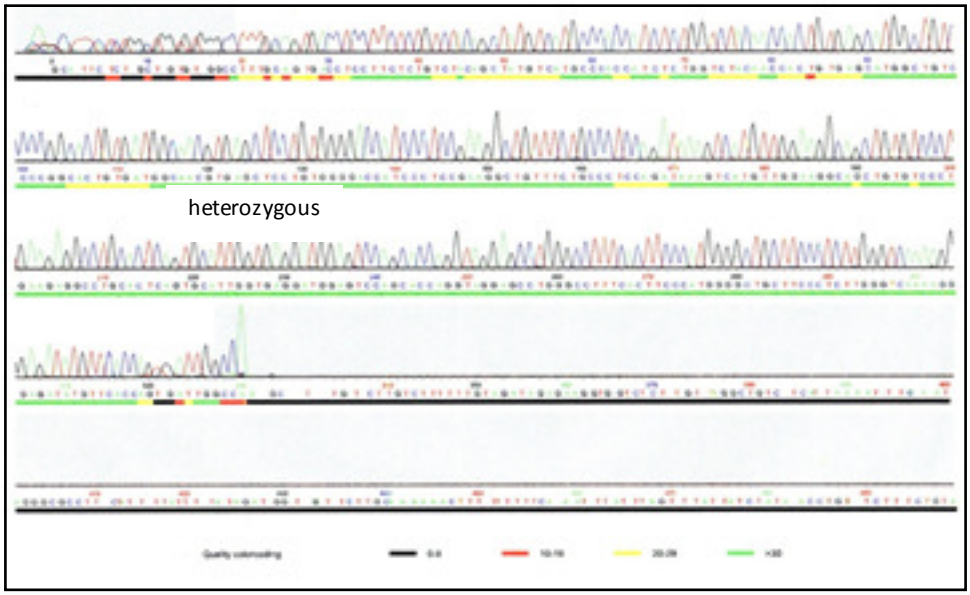
9. سلسلة DNAالمورثة (VWGene)

يبدو من المخطط البياني لسلسة أسس دنا المورثة VWGeneللشاهد بالمقارنة مع التسلسل الموجود في قاعدة البيانات (NCBI) أن التسلسل سوي وخالٍ من الطفرات (شكل11) أما عند مقارنة هذا التسلسل مع سلسلة المورثة الطافرةVWGene في المريض A يتبين ظهور طفرة الأساس T مع خلو بقية المورثة من أي طفرة (الشكل12) وكذلك يتبين وبالطريقة نفسها من ظهور الطفرة Aالوحيدة في مورثة المريضة B(الشكل13)



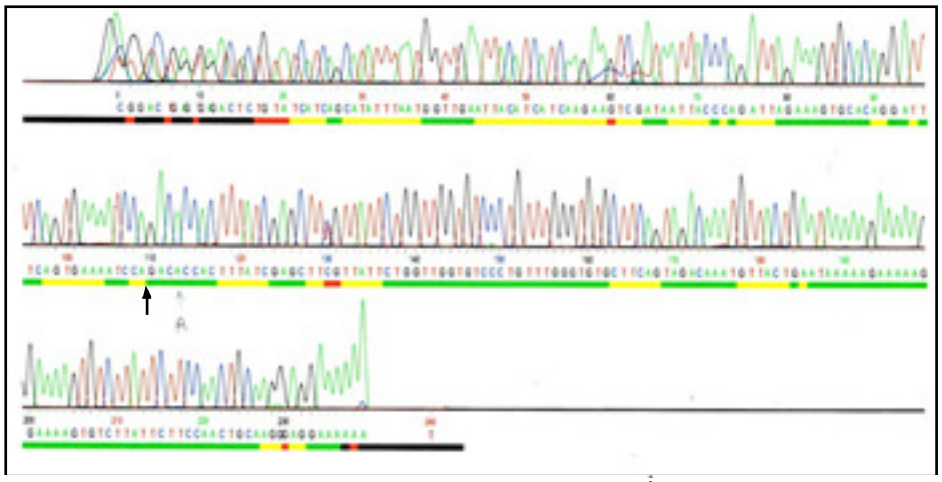
(الشكل)11:مخطط بياني يبين المسح الحاسوبي لمورثة VWGene للشاهد السوي

إذ يظهر الشكل أن التسلسل كان فيه سويا" بالمقارنة مع تسلسل المورثة المخزنة في بنكNCBI



(الشكل12): مخطط بياني يبين ظهور الطفرة T في مورثة VWGene

في المريض A إذ يشير السهم إليها بالمقارنة مع سلسلة المورثة السوية

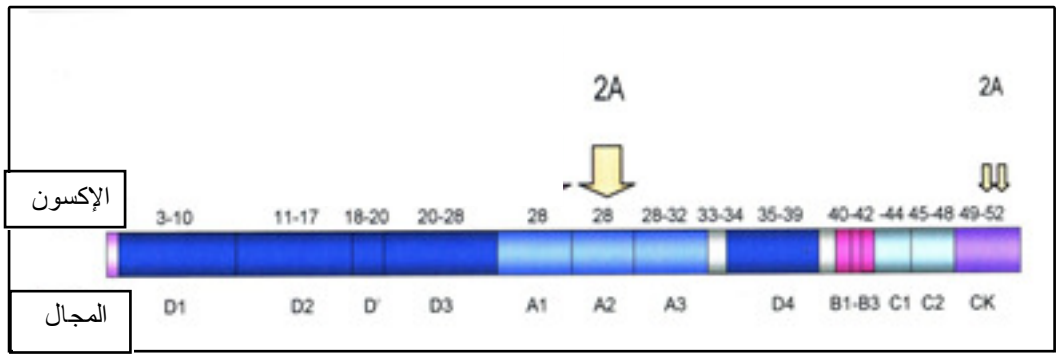


(الشكل13):يبين المخطط البياني ظهور طفرة الأساس A (إذ يشير السهم) في المريضة B نتيجة لمقارنتها مع سلسلة دنا المورثة السوية

المناقشة(Discussion)

يتبين من دراسة النتائج الجزيئية الوراثية بمجملها لمريضي فون فيلبراند(A) و(B)بالمقارنة مع معطيات الشواهد في الاختبارات المناعية النوعية أن مستوىVWF:Agيحدد كمية العامل VWF(11) وأن مقايسةVWF:RCOتحدد نشاطه الوظيفي (13) وأن مقايسة VWF:CBتبين انخفاض الألفة لربط الكولاجن والعامل VWF(14) على الصفيحات وأن الارتباط الجزئي (0.62–0.28) للعاملين VWF و FVIII(12) يؤدي إلى عدم استقرار العاملFVIII وإلى أعراض تشبه أعراض مرض الناعور Aمع أن مورثة العامل FVIII غير طافرة(20)

وبأخذ المقايسات الثلاث VWF:Ag و VWF:RCO و VWF:CB بالإضافة إلى القياس المنخفض (10–15) % لعصائب العامل VWF(21) يتبين أن الطفور الوراثي وظهور مرض VWD يقع في الإكسون 28 من المجال 2A (الشكل14) (22) وهذا ما يعلل تعطيل عملية التخثر الدموي من عدم التصاق الصفيحات (7) على الجرح الوعائي وعدم الالتصاق على الكولاجن وإطالة زمن النزف الدموي (23)



(الشكل14) : مخطط يبين الأساس الجزيئي لنمط 2AVWD ويبين موقع الإكسون 28 في المجال 2Aلتتالي الإكسونات (52) في الدنا المتمم cDNA المعتمد كتسلسل مرجعي لمورثة العاملVWF (24)

وبمقارنة نتائج عصائب الدنا (25)وظهور العصابتين الطافرتين بحجم يتراوح بين 500bp و 700bpبحسب التجارب (16) ودراسة تسلسل طفرتي A_1 و B_1(17) وظهورهما في تسلسل المورثة VWGene وتسلسل الطفرة A_1

وكشفها وتحولها من C إلى T وظهورها في السلسلة المرمزة على هيئة TTG وكذلك تسلسل الطفرة B_1 وظهورها من CGC إلى CAC على السلسلة المرمزة يمكن القولأن النتائج دقيقة ومنسجمة معاً وأن الطفرتين المعنيتين قابلتان للحياة (لأنهما متغايرتا اللواقح) في مرض VWDوأنهما السبب في عوز بروتين العامل VWF وفي انخفاضه النسبي (15) وأنهما يقعان في ظاهرة التعدد الشكلي النكليوتيدي المفرد (SNP_s) (26) و(30)

ويتبين من الدراسة أن الطفرتين A_1 و B_1هما خارج الطفرات الخمس والأربعين (45) المكتشفة والمسجلة في بنك المورثات (NCBI) (27) والمدروسة أيضاً من خلال تسلسل الدنا المتمم (cDNA) كما تبين لاحقاً أن الطفرة A_1موجودة ومعروفة في أم المريض A (28) وبذلك يمكن الافتراض أن هذه الطفرة قد نقلت إلى ابنها بفعل الوراثة أما الطفرة B_1فقد حدثت بفعل العبور قبل ظهورها في المريضة B.

وأخيراً نؤكد على أن العمل الوراثي في تشكل الخثرات الدموية وفي هندستها وفي وظيفتها هو عمل مبرمج في سلسلة من المورثات المؤتمته بفعل الوراثة والحياة (29).

الاستنتاجات والتوصيات:

ختاماً يتبين من التشخيص الجزيئي للمريضين وهما رجل (A) وامرأة (B) قد ظهرت فيهما أعراض مرض VWD وهما في حالة البلوغ (20–25) سنة وليس بينهما قرابة وكذلك من دراسة سلسلة دنا الأكسون 28في مورثة العامل VWF ما يأتي :

a) كان المريض A من أسرة لها تاريخها المرضي الحاد في النزف الدموي وقد تطلب له نقلاً للدم وكان يحمل الطفرة A_1 التي هي C>T في الإكسون 28 من نمط 2AVWD

b) كانت المريضةB حاملاً في وقت الدراسة ولها تاريخ طويل بالنزف الدموي وخاصة منذ الدورة الشهرية وتحمل الطفرة B_1 التي هي G>A في الإكسون **28** من نمط 2AVWD

أما التوصية الوحيدة في هذا المجال فهي وجوب دراسة سلسة أسس دنا المورثة في أية دراسة جزيئية تتناول موضوع المورثات سواءً في الإنسان أو في التنوع الحيوي لأهميتها المعرفية والتطورية.

المراجع:

1. Von Willebrand EA:(1962). Hereditar Pseudohermofili Finska Lakaresdlikaptes:Handingar, 672:7-112
2. Sadler JE (1998). Biochemistry and Genetics of V.W.F. Annul review of Biochemistry 67:395-424
3. Titani, K,YoshtakeS, Schach, BG, Foster, DC (1986). Amino acids sequence of human V.W.F.Biochemistry, 25: 3171-3184
4. Verweij. C.L. (1988). Biosynthesis of humanVon Willebrand factor (V.W.F). Haemostasis, 18, 224-245
5. Peake, I.(28/07/2005). Aggregate into platelet plug. http://cwx.prenhall.com/bookbind/puboks/silverthorn2/medialib/image-bank/CHI
6. Kulkarni.C. (2000).Arevised model of platalet aggregation, journal of clinical investigation, 105:783-791
7. Savage B, Saldivar, E, Ruggeri, ZM, (1996).Initiation of platelet adhesion by arrest on to fibrinogen on V.W.F. Cell, 84:289-297

8. Simoni, E. (2004). Best practice guide lines for molecular diagnosis. Int.J. Androl, 27: 240-249
9. Strachan, T and Read A, (1996). PCR. Based DNA cloningand DNA analyses. Human moleculer Gentics. 2nd, ed Gon Willey & sons inc, New york and London. 129-144
10. Wikipedia, DNA sequence (3/10/2005). http://www.answer.com/main/ntguery method=4&dsid=2222&deky=DNA+sequen
11. Mazurien,C, Parquet,T Guernez A & Goudemand, M, (1977). Enzyme- limked immunoabsorbant assay of facotr FVIII related antigen. Pathology and biology 25: 18-24
12. Shi,Q, Verweij, CL, Hart, M, Wagner, DD, (2003). Expression of human factor FVIII under control of the VWF.Molecular genetics and metabolism, vol 79: 25-33
13. Weiss, H, Hoyer, LU, Aichles, FR, (1973).(VWF:RCO) Quantitative assay of a plasma factor deficient in VWD that is necessary for platelet aggregation. Activity and antigen content, 52: 2708-2716
14. Favaloro, EJ. (2000).Collagen binding assay for VWF (VWF:CB). Thrombosis and haemostasis, 83:127-135
15. Schneppenheim, R, Budde U, Obser T, Krey S, Plendl, H.(2001). Expression and characterization of VWF dimerzation defects in different types of VWD. Blood 97: 2059-2066
16. Saiki,A,&Ruggeri, C.(1988). Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a theromostable DNA polymerase: Science, 239: 487 – 491
17. Sequence of single strand DNA. (11/10/2005). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/about/primer/images/DNA sequenceing4.gif.
18. Goodeve. A. (2003).Mutation analysis in V.W.D. Review: oco-75-University of Sheffiled and European commission FPS, Supplement to the journal of thromposis and haemostasis: 1740-1749
19. Human genome project. (2/08/2003). The entire VWF genomic DNA sequence has become available in first draft from a result of the human genome project.http://www.users.rcn.com/jkimball.ma.ultranetbiology pages/H/HGP.html
20. Goodeve, A, (2000).Relationship between factor FVIII mutation type and factor VWF. Haemostasis 83: 844-848
21. Ginsburg, D, & Sadler JE, (10/11/2004). Von Willebrand Factor (VWF) Database.http://www. inmag. 2immedumchedu/VWF/ratio
22. V.W.F homopage. Sheffield University.(3/08/2005). Example multimere patterms in type 2VWD. http://www.shef.ac.uk./multimer.html
23. Goodeve, A. (1998). Review, laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. Cilnical Laboratory, Haematology. 20: 3-19
24. Bonthron, D, (1986). Structure of pre-pro-von Willebrand factor cDNA and its expression in heterologous celles.Nature,24: 270- 273
25. Fujimura Cl anad Titani R. (2002). Structure and Fuction of VWF. Haemostasis and Thrombosis, 70: 99-104
26. Goodeve, A and Peak, L. (2001). A standard nomenclature for VWF gene mutation and polymorphisms. Best practice & research clinical.Haematology. 14, No. 2: 235-240
27. Peak, I, (11/08/2005). Mutation in the VWF gene. http//www. ragtimedesign. com/VWF/mutation
28. Goodeve,A, (12/08/2005). DNA Sequencing, http://www.ncbi.nlm.nih gov/about/primer/images/DNA sequencing 4.gif
29. Tonkin, E. (2004). Principales of automated DNA sequencing. Journal of molecular genetics, 69: 183-185.
30. Mutations in the VWF Gene, 28/07/2005 Sheffiled University VWF Home page http://www.ragtimedesign.com/VWF/mutation