

بررسی نواحی غیر رمزکننده ژن فاکتور ۸ در مقایسه با نواحی انتخابی از ایترون ۱ ژن فاکتور ۹ انسانی

علی اکبر حداد مشهدریزه^{۱،۲}، علیرضا زمردی پور^{۱*}، فرزانه صابونی^۱ و جعفر همت^{۳،۱}

^۱ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

^۲ مشهد- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، دپارتمان زیست شناسی، انستیتو بیوتکنولوژی

^۳ تهران، سازمان پژوهشهای علمی و پژوهشی ایران، پژوهشگاه فناوری های نوین، پژوهشکده بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۱/۱۴

چکیده

بمنظور تعیین توالیهای احتمالی دخیل در تنظیم بیان ژن واقع در داخل ایترونهای ژن فاکتور ۸ انعقادی انسان، توالیهای ایترونی این ژن با بخشهایی از ایترون ۱ ژن فاکتور ۹ انعقادی انسان که نقش تنظیمی آن قبلاً گزارش شده، مقایسه شد. این مقایسه توالیهای تکراری با طولهای متفاوت بین ۵۰-۳۵۰ جفت باز را در ایترونهای ژن فاکتور ۸ مشخص کرد. توالیهای آشکار شده بیش از ۷۴ درصد همگونی با توالیهای بخشهای مورد بررسی در ایترون ۱ ژن فاکتور ۹ نشان دادند. اگرچه نمی توان رابطه مستقیمی بین تعداد توالیهای تکراری در هر ایترون و طول ایترون مربوطه مشاهده نمود، اما به نظر می رسد که الگوی پراکندگی و تعداد توالیهای تکرار شده در میان ایترونهای ژن فاکتور ۸ اتفاقی نیست. عبارت دیگر تعداد و تراکم نسبی توالیهای تکراری در ایترونهای نزدیک به یکی از دو انتهای ۵' و یا ۳' ژن فاکتور ۸ و همچنین در نزدیکی یکی از دو انتهای ایترونها بیشتر است. جهت یابی این توالیها در طول ایترونهای ژن فاکتور ۸ نشان دهنده وجود تکرارهای معکوس در طول برخی از ایترونها است که می تواند در تشکیل ساختارهای ثانویه در پیشساز mRNA ژن فاکتور ۸ و افزایش پایداری آن مؤثر واقع گردد. بررسی نواحی غیر قابل ترجمه در دو انتهای ۳' و ۵' نشان از حضور یک نسخه از توالی تکراری در هر یک از این مناطق می دهد. مقایسه توالیهای تکراری آشکار شده با توالیهای تکراری شناخته شده ژنوم انسان، نشان می دهد که این توالیها از زیر خانواده های رتروترانسپوزونهای شناخته شده Alu هستند. بررسیهای بیشتر حضور توالیهای کوتاه با قابلیت اتصال عوامل نسخه برداری در داخل عناصر تکراری یافت شده را هویدا کرد. بررسی عملکرد توالیهای آشکار شده در ایترونهای ژن فاکتور ۸ گام بعدی در ادامه این تحقیق است.

واژگان کلیدی: ژن های فاکتور های ۸ و ۹ انعقادی انسان ، نواحی غیر کدکننده، تنظیم بیان ژن، توالیهای تکراری، ایترون

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۴۴۵۸۰۳۴۸، پست الکترونیک: zomorodi@nigeb.ac.ir

مقدمه

ژنها که موجب اختلال در بیان ژن شده و به بیماری منتهی گردند، شواهدی هستند که نقش تنظیمی نواحی غیر رمز کننده ژن را تأیید می کنند (۱۵). عناصر ژنتیکی شناخته شده یوکاریوتی که نقش کلیدی در تنظیم میزان بیان ژن دارند بطور عمده شامل پروموتور و افزاینده (Enhancer) در

تنظیم بیان ژن در موجودات عالی از جمله وظایفی است که عمدتاً بواسطه توالیهای غیرکدکننده داخل و خارج ژنی در سطوح مختلف انجام می گیرد که مستلزم وجود توالیهایی با نقش تنظیمی در این نواحی است (۱۰، ۱۱، ۱۶، ۱۸ و ۳۸). جهشهای موجود در نواحی غیر رمزکننده

بالادست ژن و توالیهای خاتمه دهنده رونویسی و نیز توالیهای مؤثر در فرایند پلی آدنیلایسیون در پائین دست ژن می باشند. همینطور می توان به برخی عناصر مجاور ژن اشاره کرد که تنظیم بعد از نسخه برداری را بعهدہ دارند و در نواحی غیر قابل ترجمه ۵' و ۳' در دو انتهای ژن قرار دارند (۱۹، ۳۴ و ۴۳). زمانیکه از حضور برخی از عوامل تنظیمی در نواحی داخلی ژن سخن به میان می آید، اینترونها جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص می دهند. اینترونها بخشی از نواحی غیررمزکننده می باشند که در داخل بیشتر ژنهای یوکاریوتی قرار دارند و نسبت به نواحی ژنی رمز کننده طول بزرگتری را به خود اختصاص می دهند. این موضوع که یک سلول یوکاریوتی مقادیر زیادی از انرژی و مواد را برای تکثیر و حفظ اینترونها صرف می کند دلالت بر اهمیت و وجود نقش مفید اینترونها در سلول دارد. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که تغییر توالیهای اینترونی بطور مستقیم و یا غیر مستقیم در ایجاد سرطان نقش دارد (۲۷). ارتباط مستقیم بین اینترونها و سرطان را می توان بوجود احتمالی عوامل افزایشده و یا خاموش کننده در اینترونها نسبت داد. حضور اینترون یا بخشی از آن در کنار یک ژن می تواند سبب تغییر در سطح بیان ژن و حتی افزایش آن تا ۵۰۰ برابر شود (۱۱ و ۲۶). البته باید اذعان داشت که تغییرات بیانی یک ژن که به حضور اینترون نسبت داده می شود بعوامل جنبی متعددی چون ماهیت اینترون، موقعیت فیزیکی آن در ژن از نظر فاصله با دو انتهای ۳' یا ۵' ژنی که در آن بکار رفته است و نیز به نوع سلول میزبان بستگی دارد (۷). حضور جایگاه های مؤثر در فرایند پلی آدنیلایسیون در اینترون به خصوص اینترون انتهایی ژن از دیگر دلایل تأثیر اینترون در بیان ژن است (۱۱). مزایا و فعالیتهای متعدد دیگری را نیز به اینترونها نسبت می دهند. از جمله می توان به انجام رونویسی از توالیهای اینترونی که منجر به تولید مولکولهای ریز- RNA (Micro-RNA) می شود، اشاره نمود که در فرآیندهای تنظیمی ژن دخالت دارند (۴۵). از دیگر وظایفی که به

ایترونها نسبت می دهند نقش آنها در خروج مولکولهای RNA پیک (mRNA) از هسته و افزایش پایداری آنها در سیتوپلاسم است. در این رابطه مجموعه ای پروتئینی تحت عنوان Exon Junction Complex (EJC) (محدوده ای بطول ۲۵ تا ۳۰ نوکلئوتیدی از انتهای ۵' اگزون- اینترون را پوشش می دهد. این مجموعه پس از پردازش اینترونها به mRNA بالغ متصل باقی مانده و با ناقله های پروتئینی که در انتقال محصول رونویسی به خارج از هسته نقش دارند برهمکنش داده و خروج مولکولهای mRNA بالغ از هسته را تسهیل می کنند (۹). این کمپلکس در میزان پایداری محصول رونویسی در سیتوپلاسم نیز مؤثر است. تشکیل مجموعه ریبونوکلئوپروتئینی اسپلیسوزوم در حضور اینترونها نیز بر بیان ژن تأثیر گذار است در این رابطه برخی از اجزاء کمپلکس مذکور در برهمکنشهایی که با عوامل رونویسی دارند باعث افزایش سطح رونویسی می شود (۳۶). همچنین می توان به نقش اینترونها در پیرایش چند گزینه ای مولکولهای RNA پیک اشاره نمود که تنوع در محصولات یک ژن را موجب می شود (۱). امروزه مشخص شده است که اینترونها نقش تعیین کننده ای در تکامل ژنوم انسان دارند. در این رابطه می توان به نقش عناصر تکراری داخل اینترونها بعنوان ابزارهای نوترکیبی اشاره کرد که منجر به تبادل ژنتیکی کنترل شده بین آلله ها شده و در نتیجه در ایجاد تنوع ژنتیکی ناشی از کراس اور که منبع اصلی تنوع ژنتیکی در یوکاریوتها می باشد نقش دارند (۴۲). فرآیند انتقال اگزون یا پیرایش چند گزینه ای نیز از فرآیندهایی است که بواسطه حضور عناصر تکراری در اینترون رخ می دهد. پیرایش چند گزینه ای RNA های پیک با ایجاد پلی پپتیدهای متنوع از یک ژن در ایجاد تنوع ژنتیکی و فنوتیپی در یک مسیر سازمان یافته نقش مؤثری دارد. این نقش اینترون در بسیاری موارد بواسطه عناصر مشابه رتروپوزونی موجود در برخی از آنها، انجام می پذیرد. در جریان این فرایند برخی از اینترونها نیز به همراه اگزونهای مجاور خود جایگزین آلل بدون اینترون شده و

فاکتور ۸ انعقادی و اینکه بخش اعظم ژن فاکتور ۸ در برگیرنده نواحی غیر کدگذار بویژه نواحی اینترونی است، تعیین عناصر تنظیمی در این نواحی به فهم هر چه بیشتر ما از نحوه تنظیم این ژن کمک خواهد نمود.

ژن فاکتور ۹ به عنوان ژن مدل برای اهداف مختلف مورد توجه پژوهشگران بوده است (۴ و ۲۴). اطلاعات موجود نشانگر وجود برخی فعالیتهای تنظیمی در نواحی مختلف از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ است (شکل ۱ و جدول ۱). در مطالعه حاضر توالیهای ۲۵ اینترون ژن فاکتور ۸ با قطعاتی از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ انعقادی انسان که نقش تنظیمی برخی از نواحی آن قبلاً گزارش شده (۱۸ و ۳۶) مقایسه شده است و توالیهایی که احتمالاً در تنظیم بیان ژن دخالت دارند در طول اینترونهای ژن فاکتور ۸ انعقادی انسان شناسایی و معرفی شده اند.

به این ترتیب انتقال آگزنوها را از نقطه ای به نقطه دیگر تسهیل می کنند (۶). بر اساس شواهدی که در بالا ذکر شد، اینترونها در ساختار ژنتیکی یوکاریوتها نقش تعیین کننده ای دارند. لذا شناختن اینترونها و توالیهای موجود در آنها گام مهمی در جهت درک بیش از پیش و کارایی اینترونها خواهد بود.

ژن فاکتور ۸ دارای ۱۹۲۰۲۹ جفت باز است که بخش اعظم آن متعلق به نواحی غیر رمزکننده شامل ناحیه بالادستی با ۳۱۱۴ جفت باز، ناحیه پایین دستی با ۱۹۶۷ جفت باز و نواحی اینترونی با ۱۷۷۹۱۹ جفت باز است (۱۴). نواحی بین آگزنونی این ژن در ۲۵ اینترون توزیع شده است. اختلال در این ژن و برخی دیگر از ژنهای رمز کننده فاکتورهای انعقادی مثل ژن فاکتور ۹ می تواند هموستاز خون را به مخاطره اندازد. با توجه به اهمیت



شکل ۱- اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ انسانی و موقعیت زیر قطعات مربوطه که در جدول ۱ به آنها اشاره شده است.

جدول ۱: موقعیت و تأثیر زیر قطعاتی از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ انسانی بر میزان بیان (۱۸).

نام و موقعیت عنصر تکراری	تأثیر بر بیان	موقعیت قطعه بر روی اینترون ۱ ژن فاکتور ۹	نام زیر قطعه اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ انسان
	+	۹۸ - ۱۳۱۲	A ۱
	+	۵۸۵ - ۱۳۱۲	A ۲
عنصر ۵ (۱۲۰۴ - ۱۱۵۱)	-	۱۰۰۹ - ۱۳۱۲	A ۳
عنصر ۴ (۶۰۷۱ - ۵۸۴۲)	++	۹۸ - ۶۵۰	A ۴
عنصر ۱ (۶۱۳۰ - ۵۸۴۸)	+	۵۶۶۰ - ۶۳۵۰	B ۱
	-	۶۰۱۱ - ۶۳۵۰	B ۲
	-	۵۶۶۰ - ۶۰۷۰	B ۳

مواد و روشها

توالیهای نوکلئوتیدی مرتبط با ژنهای فاکتور ۸ و ۹ انسانی، برتریب با شماره های دستیابی AY769950 و AF536327 در بانک ژنی (NCBI) مورد استفاده قرار گرفتند (۳). موقعیت قطعات هفتگانه مورد مقایسه در اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ در جدول ۱ ارائه شده است (۱۸). جهت انجام همگون یابی (Homology search) فرمت FASTA توالیهای نوکلئوتیدی استفاده شد (۳۳). فرآیند همگون یابی بین توالیها با استفاده از برنامه بلاست (Blast (Basic Local Alignment Search Tool) انجام شد (۴۵). از برنامه های موجود در ورودی بلاست برنامه blast2seq (Align two sequences) (یا بلاست-۲) مورد استفاده قرار گرفت (۴۴). بمنظور همدردی و ترسیم درخت فیلوژنی بین نواحی همگون از برنامه ClustalW استفاده شد (۲۱). رسم درخت فیلوژنی با برنامه PhyloDraw انجام شد (۳۷). جهت آشکارسازی نواحی احتمالی با نقش پروموتوری از برنامه Human promoter prediction استفاده شد (۴۱). با هدف آشکار سازی جایگاههای مؤثر در فرایند پلی آدنیلایسیون، برنامه POLYAH مورد استفاده قرار گرفت (۸). برای بررسی ارتباط توالیهای تکراری آشکار شده با خانواده های عناصر تکراری شناخته شده در طول ژنوم انسان، برنامه Repeat Masking مورد بررسی قرار گرفت (۲۳). حضور موتیفهای (بخشهای) تنظیمی در طول توالیهای تکراری با برنامه NSITE مورد بررسی قرار گرفت (۴۰).

نتایج

مقایسه توالی اینترنهای ژن فاکتور ۸ با توالیهای مشتق از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ انسان: اثرات تنظیمی برخی از قطعات اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ (کاهندگی یا افزایش) توسط Kurachi و همکارانش (۱۸) پیشنهاد شده، و همچنین تأثیر این عناصر بر بیان فاکتور ۸ نو ترکیب

توسط plantier و همکارانش (۳۶) تأیید شده است. آنها نشان دادند که قطعات A^1+B ، A^2 ، A^4 و B^1 میزان ژن را افزایش داده، در حالیکه حضور قطعات A^3 ، B^2 و B^3 در بالادست ژن بیان آن را کاهش می دهد (شکل ۱ و جدول ۱). این اثرات نشانگر حضور احتمالی توالیهای تنظیمی در اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ است. بمنظور بررسی امکان وجود توالیهای تنظیمی در اینترنهای ژن فاکتور ۸ انسانی، در اولین مرحله از این پژوهش با استفاده از برنامه بلاست-۲ (توالیهای ۲۵ اینترون ژن فاکتور ۸ با توالیهای هفت گانه اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ (جدول ۱) بصورت دو بدو مورد مقایسه قرار گرفتند. این مقایسه منجر به آشکار سازی مجموعه ای از توالیهای تکراری در میان اینترنهای ژن فاکتور ۸ شد که با دو قطعه ۲۷۹ و ۳۶۶ جفت بازی برتریب در نواحی B^1 و A^4 اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ از همگونی ۷۴ تا ۱۰۰ درصد برخوردار می باشند. از این پس از قطعه ۲۷۹ جفت بازی که از ناحیه B^1 از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ مشتق می شود با نام عنصر ۱ و از قطعه ۳۶۶ جفت بازی مشتق شده از قطعه A^4 اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ با نام عنصر ۲ یاد خواهد شد. لازم به ذکر است که نتایج حاصل از فرآیند تشابه یابی قطعات همپوشان B^2 و B^3 کامل کننده یکدیگر و تأیید کننده نتایجی است که از بررسی قطعه B^1 بدست آمد (شکل ۱).

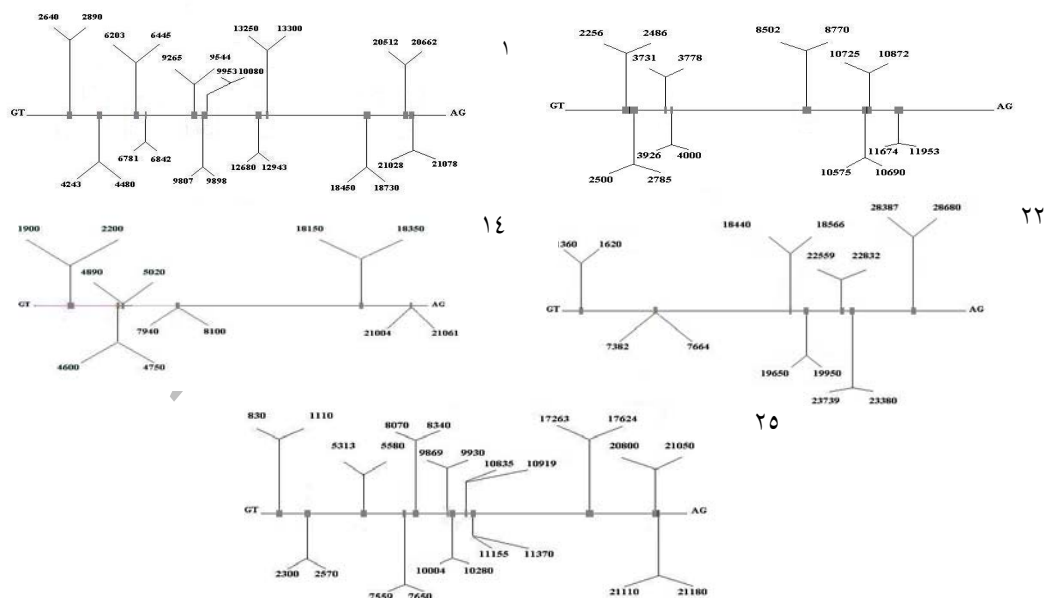
بر اساس حضور و یا عدم حضور توالیهای همگون با عناصر ۱ و ۲، اینترنهای ژن فاکتور ۸ انسانی در دو گروه ۱۶ و ۹ تایی قرار می گیرند. طول اینترنهای ژن فاکتور ۸ انسانی بین ۲۰۷ تا ۳۲۰۰۰ جفت باز است. طول متوسط اینترنهای گروه اول به مراتب بلندتر از طول اینترنهای گروه دوم است. گروه اول حاوی عناصر تکراری است که شامل اینترنهای شماره ۱، ۳، ۵، ۶، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۵ هستند (شکل ۲). تعداد توالیهای تکراری آشکار شده در این گروه بین ۱ تا ۱۶ نسخه و طول آنها بین ۵۰ تا ۳۰۰ جفت باز است. در گروه دوم اینترنهای هیچگونه همگونی با توالیهای انتخاب شده

منعکس است، عنصر ۴ در خانواده توالیهای تکراری LINE (L1) و در زیر خانواده L1PA5 و عنصر ۱ در زیر خانواده AluS2 از خانواده SINE

جایابی شدند. هر قطعه از عنصر ۱ شامل دو توالی مربوط به خانواده Alu (دو قطعه ۴۰ جفت بازی متوالی) است که توسط یک قطعه میانی پلی A از یکدیگر جدا می شوند (۱۳). البته لازم به ذکر است که بررسیهای مشابه انجام شده بر روی بخشی از عنصر ۱ (با نام قطعه B2)، نشان داده است که این توالی نیز به تنهایی می تواند در یک زیر خانواده متفاوت از عناصر تکراری SINE (زیر خانواده SAV) قرار گیرد. همین بررسیها بخش دیگر عنصر ۱ (با نام قطعه B3) را در خانواده SINE، زیر خانواده AluS2 مکان یابی نموده است.

از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ مشاهده نشد. با توجه به اینکه توالیهای تکراری آشکار شده در اینترونهای ژن فاکتور ۸ بیشترین شباهت را با دو ناحیه B1 و A4 از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ نشان دادند، عناصر ۱ و ۴ (مشتق شده از نواحی B1 و A4) برای بررسیهای بعدی در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که نتایج حاصل از فرایند تشابه یابی قطعه A3 از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ با ۲۵ اینترون ژن فاکتور ۸ تنها یک ناحیه ۵۸ جفت بازی با همسانی ۸۱ درصد را در طول اینترون ۱۴ ژن فاکتور ۸ مشخص کرد.

ارتباط فیلوژنی عناصر تکراری اینترونهای ژن فاکتور ۸ با زیر خانواده های عناصر LINE و SINE: تکرار شدن توالیهای مرتبط با عناصر ۱ و ۴ در اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ انسانی و توالیهای غیر کد کننده ژن فاکتور ۸ انسانی دلالت بر احتمال قرارگیری این توالیها در یکی از خانواده های توالیهای تکراری شناخته شده در سطح ژنوم انسان دارد. لذا عناصر مشتق از ژن فاکتور ۹ (۱۸)، بطور مجزا با برنامه Repeat Masking (۲۳) مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده که در جدول ۲



شکل ۲- موقعیت فیزیکی و الگوی توزیع عناصر مشابه با عناصر ۱ و ۴ در بین برخی از اینترونهای گروه ۱ ژن فاکتور ۸ (شامل اینترونهای ۱، ۶، ۱۴، ۲۲ و ۲۵)

جدول ۲: عناصر تکراری موجود در اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ که توسط نرم افزار برنامه Repeat masking آشکار شد (۲۳).

نام	مبداء	انتها	زیر خانواده توالی تکراری	میزان همگونی	Score
عنصر ۴ ژن فاکتور ۹ (A۴)	۱	۳۶۶	LIPA5	۰/۹۶	۳۱۹۰
عنصر ۱ ژن فاکتور ۹ (B۱)	۱	۲۷۹	AluSz	۰/۹۱	۱۸۸۶
A ۳	۱۳۹	۱۹۹	L1MD2	۰/۸۹	۴۲۷
B ۲	۱	۱۰۹	SVA	۰/۸۱	۴۶۴
B ۳	۲	۲۳۰	AluSz	۰/۹۰	۱۴۷۹

زیر خانواده های تکراری که با عناصر موجود در اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ شباهت دارند با اسامی خاص نشان داده شده اند. Score (امتیازی است که از همردیفی در آزمون بلاست بدست میاید).

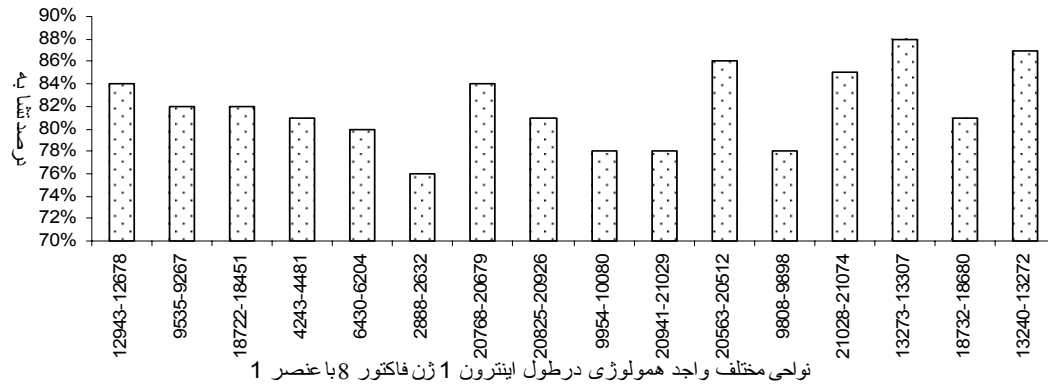
ویژگیهای الگوی توزیع عناصر ۱ تمایل آنها به استقرار در دو انتهای اینترونهای مربوطه است. اما بررسیهای مشابه در رابطه با عناصر ۴، وجود الگوی توزیع معنی داری از آن عناصر را در بین اینترونهای ژن فاکتور ۸ نشان نمی دهد.

حضور توالیهای تکراری در بالا دست و پائین دست ژن فاکتور ۸: یک ناحیه ۳۲۸۴ جفت بازی از بالادست ژن فاکتور ۸ با توالیهای ۲۵ اینترون ژن فاکتور ۸ مقایسه شد. ای که در رابطه با توالی پایین دست ژن فاکتور ۸ (بطول ۱۹۶۸ جفت بازی) انجام شد، منجر به آشکار شدن یک توالی ۲۹۴ جفت بازی (در حدفصل بازهای ۲۸۹ تا ۵۸۳ از انتهای ۵) شد که میزان شباهت آن به عناصر تکراری در اینترونهای گروه اول ژن فاکتور ۸ بیش از ۷۵ درصد است. این جایگاه نسبت به محل مؤثر در پلی آدنیلایسیون ژن فاکتور ۸ قابل تمایز است. مقایسه فیلوژنتیک قطعات یافت شده در بالادست و پائین دست ژن فاکتور ۸ با برخی از عناصر نوع ۱ مستقر در اینترونهای ژن فاکتور ۸، این عناصر را به دو گروه مستقل تقسیم نمود. یک گروه با نسخه تکراری بالا دست ژن فاکتور ۸ و گروه دیگر با نسخه پائین دستی که در یک دسته جمع می شوند (شکل ۵).

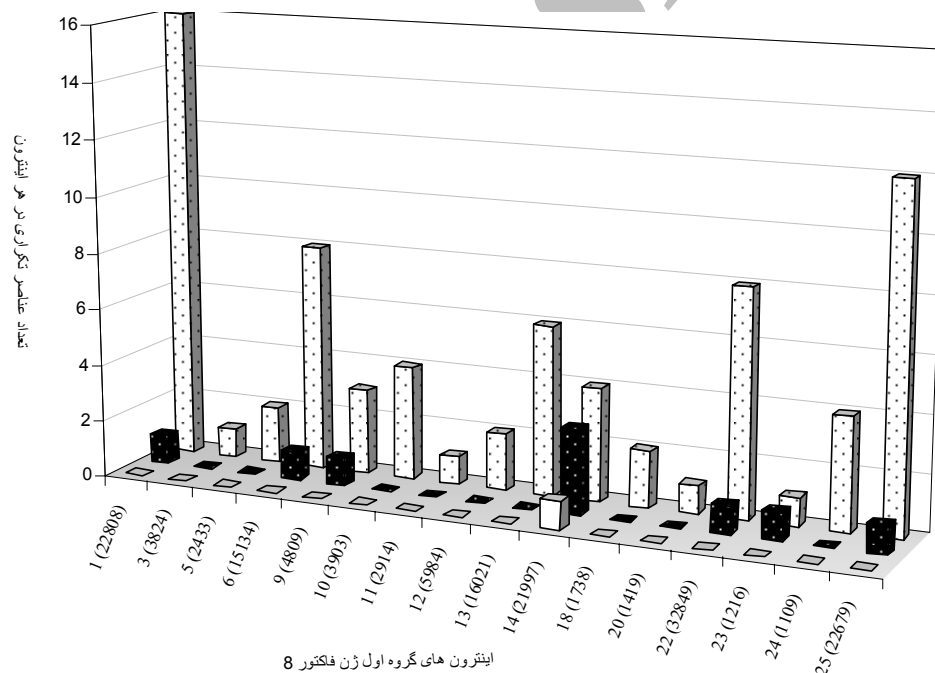
ویژگیها و نحوه پراکندگی عناصر تکراری در طول اینترون های ژن فاکتور ۸: موقعیت فیزیکی و نحوه پراکندگی توالیهای تکراری همگون با عناصر تکراری ۱ و ۴ در طول برخی از اینترونهای گروه اول از ژن فاکتور ۸ در شکل ۲ نشان داده شده است. عنصر ۱ در تمامی اینترونهای گروه اول ژن فاکتور ۸ با فراوانی و طولهای مختلف (بین ۳۷ تا ۲۹۴ جفت بازی) تکرار شده است. در اینجا برای نمونه موقعیت، تعداد و میزان شباهت نواحی همگون با عنصر ۱ در اینترون ۱ ژن فاکتور ۸ در شکل ۳ ارائه شده است.

در مقایسه ای که بین توالی قطعه ۳۶۶ جفت بازی عنصر ۴ و توالیهای اینترونی ژن فاکتور ۸ انسانی انجام شد، نواحی همگونی در طول اینترونهای ۱، ۶، ۹، ۱۴، ۲۲، ۲۳ و ۲۵ ژن فاکتور ۸ آشکار شد. این توالیها که تا میزان ۹۷ درصد با عنصر ۴ شباهت دارند، در ۱۰ ناحیه از اینترونهای ژن فاکتور ۸ حضور دارند.

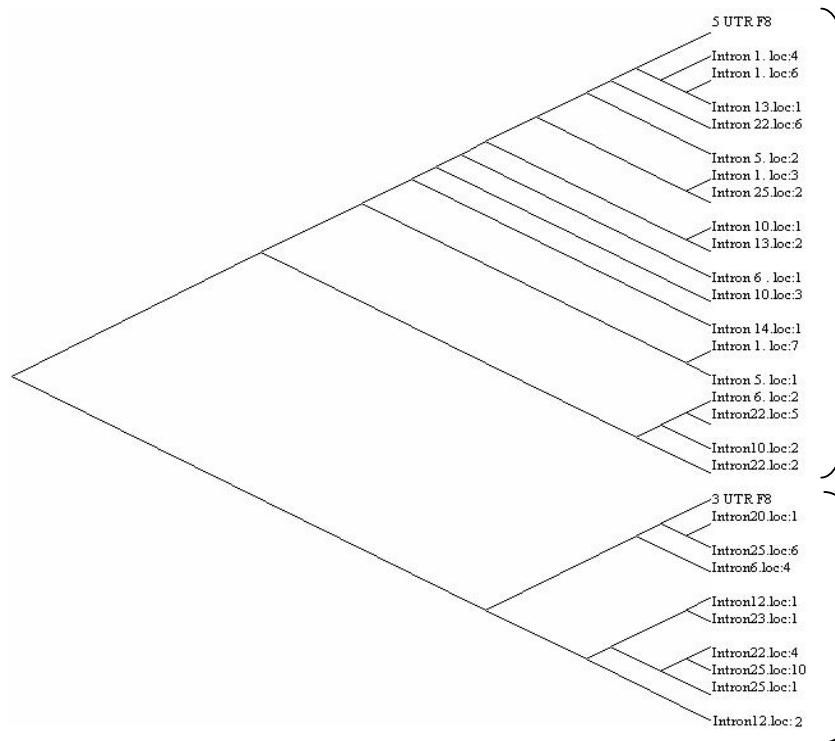
توزیع غیراتفاقی عناصر ۱ در بین اینترونهای ژن فاکتور ۸: نحوه توزیع عناصر نوع ۱ در میان اینترونهای ژن فاکتور ۸ انسانی نشان می دهد که تراکم عناصر ۱ در دو اینترون انتهایی ژن (اینترونهای ۱ و ۲۵) بمراتب بیشتر از اینترونهای میانی این ژن است (شکل ۴). از دیگر



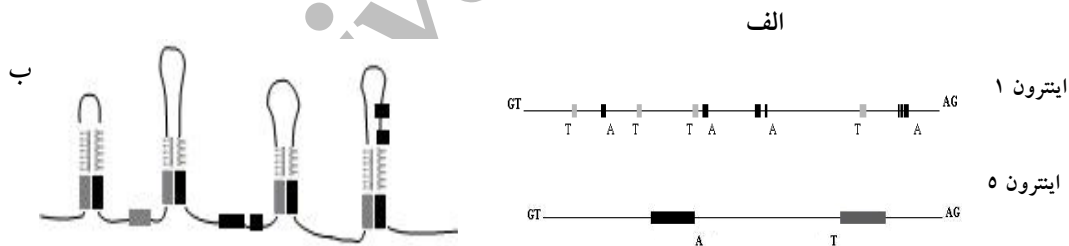
شکل ۳- نمودار بدست آمده از مقایسه عنصر ۱ با توالی اینترون ۱ فاکتور ۸. میزان شباهت توالی های آشکار شده با توالی های فعال-تنظیمی اینترون ۱ فاکتور ۹ بصورت درصد نمایش داده شده است. موقعیت نواحی آشکار شده در طول اینترون ۱ ژن فاکتور ۸ در پائین هر ستون نشان داده شده است.



شکل ۴- نحوه پراکندگی عناصر مشابه با عناصر ۱، ۴ و قطعه A3 در طول اینترنهای گروه اول ژن فاکتور ۸. شماره و طول هر اینترون در پایین هر ستون نشان داده شده است. ستون ها از عمق شکل به جلو نماینده فراوانی عناصر ۱، ۴ و قطعه A3 هستند.



شکل ۵- درخت فیلوژنی بین بالادست و پایین دست ژن فاکتور ۸ با نواحی واجد تشابه در طول اینترونهای گروه اول ژن فاکتور ۸ انسانی. شماره اینترونها و موقعیت نسبی قطعات همگون در هر انتهای شاخه های درخت فیلوژنی نشان داده شده است.



شکل ۶- الف: جهت یابی عناصر ۱ در طول اینترون های ۱ و ۵ ژن فاکتور ۸.. حروف T و A به ترتیب دلالت بر توالی های پلی T و پلی A مینمایند. ب: شکل گیری ساختمانهای سنجاق سری در طول اینترون ۱ در نتیجه حضور توالی های معکوس.

در حالیکه نسخه یافت شده در بالادست ژن دارای یک توالی پلی T در انتهای ۵ خود است. نکته جالب توجه این است که این نوع توالیهای تکراری در اینترون ۱ به جزء یک مورد، بصورت یک در میان تکرار شده اند و فواصل این توالیها در کمترین و بیشترین فاصله بترتیب ۲۶۵ تا ۵۱۱۰ جفت باز است. به این ترتیب این ساختار می تواند احتمالاً به تشکیل ساختارهای سنجاق سری در طول

دو گروه از عناصر نوع ۱ که بر اساس درخت فیلوژنی آشکار شد، در مواردی در جهت معکوس یکدیگر در طول اینترونهای ژن فاکتور ۸ واقع شده اند. شاخصه برخی از این توالیها وجود یک توالی پلی T در انتهای ۵ و یا یک توالی پلی A در انتهای ۳ آنها است (شکل ۶-الف). نسخه تکراری پائین دست ژن فاکتور ۸ با عناصر نوع ۱ که در انتهای ۳ خود دارای توالی پلی A هستند هم گروه است.

اینترونها کمک کند (شکل ۶-ب). البته بررسی مشابه توالیهای تکراری در اینترون ۲۵ ژن فاکتور ۸ نشان از تشکیل چنین ساختاری را در آن نمی دهد. این نتیجه احتمالاً اهمیت تشکیل ساختار ثانویه سنجاق سری در انتهای ۵' پیشساز مولکول RNA پیک ژن فاکتور ۸ را نشان می دهد.

حضور موتیفهای مرتبط با تنظیم بیان در اینترونهای ژن فاکتور ۸ انسانی: با در نظر گرفتن نتایج آزمایشگاهی که اثر تنظیمی بخشهایی از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ را نشان می دهد (۱۸)، احتمال وجود موتیفهای اتصال فاکتورهای رونویسی در طول عناصر اینترون ۱ آن ژن با استفاده از نرم افزار NSITE (۳۹) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده دلالت بر وجود بسیاری از موتیفهایی می کند که نقش تنظیمی آنها بعنوان توالیهای اتصال به فاکتورهای رونویسی قبلاً توسط سایر محققین نیز گزارش شده است و در بانک اطلاعاتی موجود می باشد (جدول ۳).

موتیفهای آشکار شده در طول هر دو رشته مکمل عناصر ۱ و ۴ قرار دارند (شکل ۷). براساس این نتایج مجموعاً تعداد ۲۲ موتیف تنظیم کننده با منشاء انسانی بر روی عنصر ۱ و تعداد ۴۰ موتیف در طول عنصر ۴ آشکار شد که برخی از آنها در جدول ۳ نشان داده شده است. همچنین این بررسیها منجر به آشکار سازی ۲۷ موتیف با پتانسیل اتصال فاکتورهای رونویسی در توالی A۳ انسانی شد که هیچگونه مشابهتی با موتیفهای یافت شده در عناصر ۱ و ۴ ندارند. وجود عناصر تکراری نوع ۱ در اینترونهای ژن فاکتور ۸ مؤید حضور گسترده موتیفهای تنظیمی در اینترونهای این ژن است. همچنین به نظر می رسد که تراکم این موتیفها در اینترونهای ۱ و ۲۵ از ژن فاکتور ۸ بطور نسبی بیشتر از سایر اینترونها باشد.

بررسی پراکندگی توالیهای تکراری مشابه عنصر ۱ و ۴ در برخی دیگر از ژنهای مسیر انعقاد خون: نتایجی که از مقایسه میان عناصر ۱ و ۴ اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ با

اینترونها برخی از ژنهای مسیر انعقاد خون بمنظور آشکار سازی نواحی مشابه با این توالیها انجام می شود، وجود توالیهای همگون با تشابه بیش از ۷۳ درصد را نشان می دهد. در جدول ۴ تعدادی از عناصر مشابه با عناصر ۱ و ۴ در طول اینترونهای برخی از ژنهای مسیر انعقاد آورده شده است. الگوی پراکنش این عناصر در طول هر ژن و نیز در طول هر یک از اینترونها در بسیاری موارد نزدیکی به انتهای ۵' و ۳' را رعایت نموده است. همچنین در مواردی وجود توالیهای همگون با عنصر ۱ دیده می شود که بطور معکوس بدنبال یکدیگر قرار گرفته اند؛ این الگوی قرارگیری توالیها آشکار شده مطابق آنچه که در اینترون ۱ ژن فاکتور ۸ مشاهده شد، می تواند احتمال تشکیل ساختارهای سنجاق سری را افزایش دهد. افزایش تراکم عنصر ۱ در طول اینترونهای ژنهای مورد بررسی نسبت به عنصر ۴ نیز از الگوی عمومی مشاهده شده در اینترونهای ژن فاکتور ۸ تبعیت می کند.

بحث

بمنظور بیان پروتئینهای بزرگ و پیچیده در سامانه های نو ترکیب قرار دادن کلیه نواحی مربوط به یک ژن در یک سازه مولکولی میسر نیست. لذا مشاهده می شود که بیان اکثر ژنها در این شرایط نسبت به حالت طبیعی کاهش چشم گیری دارد. در این راستا محققین در جستجوی عواملی هستند که حضور آنها در یک سازه با حداقل اندازه ممکن بتواند نقش افزایشی مناسبی را برای بیان آن پروتئین فراهم نماید. تنظیم میزان بیان ژن از جمله اعمالی است که عمدتاً توسط توالیهای غیر کد کننده انجام می گیرد و برای اینکه عوامل تنظیمی برای بیان یک ژن تأمین گردد می بایست این گونه توالیها در کنار توالی ژنی مورد توجه قرار گیرد (۵، ۱۷، ۱۸ و ۳۲). برخی قطعات اینترونی نیز از جمله توالیهای غیر رمز کننده هستند که برای بیان ژنها به ویژه در میزبانهای

جدول ۳: برخی از موتیفهای تنظیمی در طول عناصر ۱ و ۴ و توالی A۳ اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ که با استفاده از برنامه NSITE بدست آمد. این موتیفها قبلاً توسط سایر محققین نیز گزارش شده و در بانک اطلاعاتی موجود است. توالیهای آشکار شده ممکن است همگونی ۱۰۰ درصد با توالیهای واجد نقش تنظیمی در بانک اطلاعات ژنی نداشته باشند، لذا حروف کوچک مبین عدم تطابق توالیهای یافت شده با موتیفهای شناخته شده است.

عناصر تنظیمی آشکار شده در توالی A۳ از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹		عناصر تنظیمی آشکار شده در توالی عنصر ۱ از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹		عناصر تنظیمی آشکار شده در توالی عنصر ۴ از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹	
نام ژن	توالی و موقعیت	نام ژن	توالی و موقعیت	نام ژن	توالی و موقعیت
collagenase	146ATGAGTgAG138	CYC1	117GCCGGGGTTTc107	Apo CIII	229tCCCACTGAAGAAGt 243
collagenase	146ATGAGTgAG 137	osteocalcin	6GGTGgCTCACA16	insulin receptor	294TgTCACTTCC 303
beta-actin	40CtTTTTATGG31	zeta 2-globin	51GCAGATeACTt61	gamma-globin	274CTATCTCcAt1284
gastrin	210GttGtGGGGTGGGGGG225	beta globin	GAaCtCCTGAC65	hsp70	253GtGGCaGCAC244
c-myc	216GGGTGGG222	apoB	162TGTaATCcCAGcTACT177	glycophorin C	159GcTATGGAAA169
BPAG1	248CCCTAAAtGC240	alpha cardiac actin	151TgGCGGGTG159	glycophorin C	266AcTaTGCCCTATCTC280
insulin	248CCCTAATG241	embryonic zeta-globin I	179GGGAGGcTGAAG190	epsilon globin	296ACACATeTCA286
insulin	248CCCTAATG241	PAI-2	68TGACCTCA 61	PAI-2	21CAAAAAGAC28
insulin receptor	215GGGGtGGGG223	thyroglobulin	121ACTAAAAAtACA132	beta-globin	78CTCaTATCT86
Apolipoprotein B	178CACAGGAA185	EGFR	62CAAGTG57	gamma globin	225TGGGTC230
IL-4	52TgAACTCATTTTt38	involucrin	192TGCCTCA186	Ka+	166GAAATgtAAAGT177
beta-globin	217GGTGGGG223	involucrin	106TGAACCC112	APRT	230GaCCCAACC223
Apo-AII	234CTCcCtCacCCCCACCCC215	involucrin	108TcaCCATTTCa98	Rh50	79AGTCCTTT72
apolipoprotein E	223CCCCACCcC215	estrogen receptor beta	91TGGcCAGGCTGGTg 78		
EGF receptor	238ATCCCTCCcC229	alpha-spectrin	184GCTGAGcCA192		
		insulin	195TcTGCCTCAGCC183		
		GSTP1	192TGCCTCAGC184		
		thromboxane synthase	232GCTGAGATCg241		
		s OLI-D	56ATCtGCCTGcCT 45		

جدول ۴: پراکنش عناصر ۱ و ۴ در نواحی اینترونی برخی از ژنهای فاکتورهای انعقادی انسان

نام ژن	تعداد اینترون	توالیهای مشابه عنصر ۴ (تعداد)				توالیهای مشابه عنصر ۱ (تعداد)					
		شماره اینترون (تعداد عناصر مشابه)				شماره اینترون (تعداد عناصر مشابه)					
فاکتور ۲	۱۳	-				۴ (۴)	۶ (۳)	۹ (۳)	۱۱ (۲)	۱۲ (۲۶)	
فاکتور ۳	۵	-				(۱) ۳			(۱) ۵		
فاکتور ۵	۲۴	(۱) ۴	(۲) ۹	(۳) ۱۰	(۴) ۱۴	(۵) ۲	(۶) ۷	(۷) ۸	(۸) ۱۰	(۹) ۱۴	(۱۰) ۲۴
فاکتور ۷	۸	-				-					
فاکتور ۹	۷	(۱) ۴				(۵) ۶					
فاکتور ۱۰	۷	-				(۲) ۱		(۴) ۲	(۲) ۴	(۳) ۵	(۳) ۶
فاکتور ۱۱	۱۴	-				(۲) ۲	(۱) ۴	(۱) ۵	(۳) ۷	(۱) ۱۰	(۲) ۱۳
فاکتور ۱۲	۱۳	-				-					
فاکتور ۱۳	۱۱	(۱) ۹	(۲) ۱۰			(۱) ۵		(۲) ۹		(۱) ۱۰	

عنصر ۱ >

GGCATGGTGGCTCACA CCTATAATCCCAGCACTTTCAGAGGCCAGGCAGGCAGATCACTTGAGGTCAGGAGTTCGACACCA
 GCCTGGCCAACAAGGTGAAATGGTGAACCCCGGCTTTACTAAAAATACA AAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGGGTGCCCTG
 TAATCCCAGCTACTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATAGCTTGAACCTGGGAGATGGAGGTTGCAGTGAAGCTGAGATCGCACC
 ACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCAAGACTC

>۱ (reverse) عنصر

GAGTCTTGCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCATCTCCCAGGTTCAAGCTATT
 CTCCGCTCA GCCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGCACCCGCCACCATGCCAGCTAATTTTGTATTTTGTAGTAAAGCCGG
 GGTTCACCATTTACCTGTGGCCAGGCTGGTTCGAATCCTGCTCAAGTGATCTGCCTGCCTGGGCCTCTGAAAGTGC
 TGGGATTATAGGTGTGAGCCACCATGCC

عنصر ۴ >

GGCACATATACACCATGGAATACTAGGCAGCCATAAAAAAGAAAATGAGTTCATGTCTTTGTAGGGACATGGATGAAGCTAG
 AAACCATCATTCTCAGCAAACTATCGCAAGGACAAAAAACCAACACCGCATGTTCTCACTCATAGGTGGGAAGTGAACAAT
 GAGAACA CTGGACACAGGAAGGGGAACATCACACCCGGGGCTGTTGTGGGGTGGGGGGTGAAGGGAGGGATAGCATT
 AGGGGATATACCTAATGCTAAATGACGAGTTAATGGGTACAGCACACCAACATGGCACATGTATACATATGAACAAACCTG
 CTCGTGTGCACATGTACCTAAACCTAAAGTATAATAA

>۴ (reverse) عنصر

TTATTACTTTAAGTTTAGGGTACATGTGCACAACGAGCAGGTTTGTACATATGTATACATGTGCCATGTTGGTGTGCTGT
 ACCCATTAACTCGTCATTTAGCATTAGGTATATCCCTAATGCTATCCCTCCCCCACCACCCACAACAGGCCCGGT
 GTGTGATGTTCCCTTCCTGTGTCCAAGTGTCTCATTGTCAGTCCCACCTATGAGTGAGAACATGCGGTGTTGGTTTTT
 GTCCTTGCATAGTTTGTGAGAATGATGGTTCTAGCTTCATCCATGTCCCTACAAAGGACA TGAACCTATTTCTTTTATG
 CTGCCTAGTATTCATGGTGTATATGTGCC

شکل ۷- موتیفهای تنظیمی آشکار شده در طول هر دو زنجیره مکمل از هر یک از عناصر ۱ و ۴. موقعیت موتیفهای تنظیمی آشکار شده در هر مورد با کادر مشخص شده است.

کمتری برخوردارند. این بررسیها منجر به آشکار سازی دو گروه عمده از توالیهای تکراری در طول تمامی ۱۶ اینترون گروه اول شد که از شباهت ۷۴ تا ۱۰۰ درصد با دو ناحیه با طولهای ۲۷۹ و ۳۶۶ جفت باز در اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ برخوردار می باشند. این دو ناحیه از اینترون ژن فاکتور ۹ بترتیب متعلق به نواحی B1 و A4 از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ هستند. بررسیهایی که توسط kurachi و همکارانش (۱۸) انجام شد نشان داد که قطعه A4 بیشترین اثر افزایشی را بر بیان ژن گزارشگر دارد. همان مطالعه نیز نشان داد که قطعه B1 از اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ در بالادست یک ژن گزارشگر می تواند بیان آن را تا حدود ۱/۵ برابر افزایش دهد. بررسیهای انجام شده در مطالعه حاضر نشان داد که این دو گروه از توالیها (عناصر ۱ و ۴) از تراکم و توزیع

هترولوگ مورد توجه هستند (۱۱، ۱۸ و ۳۸). با توجه به طول بسیار زیاد اینترونها، انجام آزمایشهای عملی بصورت حذف سریالی توالیها بمنظور آشکار سازی نواحی مؤثر در تنظیم بیان ژن بسیار وقت گیر و هزینه بر خواهد بود. لذا بمنظور کاهش هزینه ها می توان نواحی واجد پتانسیل تنظیمی را با انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی آشکار نموده و سپس بطور هدفمند با طراحی آزمایشهایی در جهت استفاده از این توالیها اقدام کرد. ژن فاکتور ۸ انسانی در دسته ژنهای حاوی اینترونهای با اهمیت از نظر عملکرد قرار دارد. در بررسی مقایسه ای حاضر اینترونهای ژن فاکتور ۸ انسانی در دو گروه ۱۶ و ۹ تایی جای گرفتند، که گروه اول حاوی توالیهای تکراری رتروترانسپوزونی هستند و گروه دوم از نظر حضور توالیهای تکراری از اهمیت

مشابه در طول اینترونهای ژن فاکتور ۸ برخوردار نیستند، بطوریکه عناصر نوع ۱ در تمامی اینترونهای گروه اول ژن فاکتور ۸ با فراوانیهای متفاوت تکرار شده، ولی عناصر ۴ تنها در ۷ اینترون از میان اینترونهای بیست و پنجگانه ژن فاکتور ۸ مشاهده می شوند. مقایسه این توالیها با خانواده های توالی تکراری شناخته شده ژنوم انسان، تعلق آنها را به زیر خانواده هایی از رتروترانسپوزونها نشان می دهد (۱۳ و ۲۸). در این رابطه می توان به تراکم بالای توالیهای SINE در مقایسه با توالیهای منتسب به زیر خانواده های LINE در اینترونهای انتهایی ژن فاکتور ۸ اشاره نمود که نشان دهنده حضور احتمالی یک ساختار تنظیم کننده در انتهای ۵' یا ۳' ژن فاکتور ۸ است. توالیهای Alu (از زیر خانواده های توالیهای موجود در خانواده SINE) بطور معمول دارای یک ساختار دو بخشی بصورت مونومرهای چپ و راست است که بوسیله یک توالی غنی از آدنین به یکدیگر اتصال دارند (۱۳). بررسی توالیهای تکراری نوع ۱ اینترونهای ژن فاکتور ۸ نیز وجود اینگونه توالیهای دو بخشی متصل به یکدیگر با یک توالی غنی از آدنین نشان می دهد.

نکته قابل توجه در رابطه با عناصر نوع ۱ موجود در اینترونهای مختلف ژن فاکتور ۸، غیر تصادفی بودن پراکندگی آنها است که این از ویژگیهای توالیهای تکراری Alu است که توسط سایر محققین نیز گزارش شده است و بعنوان بزرگترین اسرار عناصر Alu در سطح ژنوم انسان از آن یاد می شود (۲۹). در رابطه با نحوه توزیع این توالیها می توان برای مثال به فراوانی عناصر نوع ۱ در دو اینترون انتهایی ژن فاکتور ۸ (اینترونهای ۱ و ۲۵) اشاره کرد که به مراتب بیشتر از سایر اینترونهای میانی این ژن است. بررسی فراوانی این عناصر در سایر اینترونهای ژن فاکتور ۸ نشان می دهد که نمی توان یک نسبت مستقیم بین طول اینترون و تعداد عناصر تکراری در آن قائل شد و بعبارت دیگر تعداد نسخه های توالیهای تکراری در یک اینترون را نمی توان ناشی از طول آن دانست. شاهد این مدعا دو

اینترون داخلی ژن فاکتور ۸ شامل اینترونهای ۱۴ و ۲۲ بترتیب با طولهای ۲۱۹۹۷ و ۳۲۸۴۹ جفت باز است که از نظر طول با دو اینترون انتهایی ۱ و ۲۵ بترتیب با طولهای ۲۲۸۰۸ و ۲۲۶۷۹ جفت باز، بعنوان بزرگترین اینترونهای ژن فاکتور ۸ قابل مقایسه هستند. لیکن از نظر تعداد و توزیع عناصر تکراری با هم تفاوت قابل ملاحظه دارند. به این معنی که تعداد عناصر تکراری در دو اینترون انتهایی ۱ و ۲۵ بمراتب بیشتر از تعداد عناصر تکراری در آن دو اینترون داخلی است. بنابراین در این مورد می توان تعداد عناصر تکراری نوع ۱ را در هر اینترون با موقعیت آن اینترون مرتبط دانست. این شواهد احتمالاً بر اهمیت دو اینترون ابتدایی و انتهایی ژن فاکتور ۸ در تنظیم بیان ژن دلالت می نماید. اهمیت دو اینترون انتهایی در بیان ژنها در رابطه با برخی ژنهای دیگر نیز مطرح است (۱۰، ۱۹، ۲۰ و ۳۴). پراکندگی توالیهای واجد پتانسیل تنظیمی آشکار شده در طول اکثر اینترونهای این ژن از نظم خاصی پیروی می کنند، بطوریکه تمرکز بیشتر این توالیهای تنظیمی به سمت ۵' و ۳' در طول اینترونها است. پراکندگی محدوده های تنظیمی احتمالی آشکار شده در طول برخی از اینترونهای این ژن، نظیر اینترون ۹ و ۱۰ از نظم حاکم بر سایر اینترونها پیروی نمی کند. بررسیهای مقایسه ای حاضر از وجود یک نسخه از عناصر نوع ۱ در بالا دست و در پائین دست ژن فاکتور ۸ نیز خبر می دهد. از نظر ساختار نوکلئوتیدی مجموعه عناصر نوع ۱ موجود در نواحی اینترونی و نواحی غیر قابل ترجمه بالادست و پائین دست ژن فاکتور ۸ در دو دسته قرار می گیرند. در یکی از این دسته ها یک توالی پلی T در انتهای ۵' و در گروه دیگر یک توالی پلی A در انتهای ۳' قرار دارد. این ویژگی از وجود توالیهای تکراری معکوس در طول اینترونهای ژن فاکتور ۸ خبر می دهد. چنانچه این توالیهای تکراری معکوس در مجاورت هم باشند، مانند حالت مشاهده شده در اینترون ۱ ژن فاکتور ۸، می توانند در پیشساز مولکولهای mRNA (stem-) رونویسی شده به تشکیل ساختارهای سنجاق سری

رونویسی در این توالیها، فرضیه حضور احتمالی عناصر تنظیمی در این توالیها را تقویت می نماید. البته لازم است در اینجا بوجود تفاوت الگوی عناصر ۴ (LINE) و ۱ (SINE) از نظر نوع موتیف اشاره نمود. با در نظر گرفتن نقش افزاینده این دو عنصر و اختلاف آنها از نظر موتیفهای آشکار شده می توان پیشنهاد نمود که این دو عنصر نقش خود را برای افزایش بیان ژن فاکتور ۸، از دو مسیر جدا انجام می دهند. اختلاف موتیفها در قطعه A۳ با موتیفهایی که در عناصر ۱ (در قطعه B۱) و ۴ (در قطعه A۴) وجود دارند، مؤید نتایج آزمایشی است که قبلاً نقش کاهنده A۳ و نقش افزاینده دو قطعه B۱ و A۴ را نشان داده است (۱۸). غیر از عناصر Alu برای سایر خانواده های رتروپوزونی نیز نقش مؤثر در بیان پیشنهاد شده است. مثلاً عناصر LINE-1 بعنوان سیگنال پلی آدنیلیشن گزارش شده است (۱۲ و ۲۲). نتایج حاصل از این تحقیق علاوه بر اینترنهای ابتدایی و انتهایی بر اهمیت سایر اینترنهای نیز در تنظیم بیان ژن تأکید دارد. در مجموع این مطالعه شواهدی از حضور برخی عناصر تنظیم بیانی در نواحی غیر قابل ترجمه ژن فاکتور ۸ بویژه در اینترنهای این ژن فراهم نمود که تعیین عملکرد احتمالی آنها با بررسی عملی تأثیر قطعات حاوی عناصر یافت شده بر میزان بیان یک ژن گزارشگر میسر خواهد بود.

قدردانی: نویسندگان این مقاله از خانم دکتر زرین مینوچهر و آقای فرهاد شکوهی فر برای ارائه پیشنهادات ارزشمندشان قدردانی می نمایند.

loop) منجر شوند. توالیهای تکراری در اینترون ۲۵ در انتهای ژن فاکتور ۸ نشان از تشکیل چنین ساختاری را در آن نمی دهد. این نتیجه اهمیت تشکیل ساختار ثانویه سنجاق سری در انتهای ۵ مولکولهای RNA پیک ژن فاکتور ۸ را نشان می دهد. وجود چنین ساختارهایی در مولکولهای RNA نابالغ (پردازش نشده) به پایداری آن کمک می نماید. این توانایی توالیهای Alu (یعنی نقش افزاینده پایداری mRNA که قبلاً توسط سایر محققین پیشنهاد شده است) احتمالاً در تلفیق با signal recognition particle (SRP) انجام می گیرد (۱۳). علاوه بر نقش ساختمانی عناصر تکراری در تکامل ژنوم میزبان، از وظایف دیگری که برای توالیهای تکراری Alu در سطح ژنوم پرایمیت ها پیشنهاد کرده اند، تأثیر آنها در بیان ژنها می باشد، که تأثیر آن در فرآیندهای رونویسی، پردازشهای چند گزینه ای مولکولهای RNA پیک، ویراستاری RNA و تنظیم ترجمه آشکار شده است (۱۳). یکی دیگر از وظائف جالب توجه کسب شده توسط عناصر تکراری نزدیک به ژنها از جمله عناصر Alu، نقش تنظیم نسخه برداری آنها است که بواسطه اتصال فاکتورهای رونویسی به آنها انجام می شود (۲، ۲۵، ۳۰، ۳۱ و ۳۵). نتایج بررسی حاضر نیز نشانگر حضور چشمگیر این نوع از توالیها در طول عناصر تکراری ژن فاکتور ۸ است.

در مجموع نحوه استقرار توالیهای تکراری در هر اینترون و حضور آنها در بالا دست و پائین دست ژن فاکتور ۸ و همچنین حضور پرتراکم موتیفهای اتصال فاکتورهای

منابع

1. Asy, C. M., Williams-Ahlf, B., Naggert, J. and Saith, S, 1992. Intron-Exon organization of the gene for the multifunctional animal fatty acid synthase," *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1105-8.
2. Babich, V., Aksenov, N., Alexeenko, V., Oei, S. L., Buchlow, G., Tomilin, N. 1999. Association of some potential hormone response elements in human genes with the Alu family repeats. *Gene*, 239:341-3349.
3. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman D. J., Ostell, J. and Wheeler, D. L. 2006. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Building 38A, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA, *Nucleic Acids Res.* Jan 1;34(Database issue):D16-20 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
4. Briet, E., Bertina, R.M., van Tilburg, N. H., and Veltkamp, J.J. 1982: Hemophilia B Leyden. A

- sex-linked hereditary disorder that improves after puberty. *N Engl J Med* 306:788-790.
5. Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E. and Palmiter, R. D. 1988. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl Acad Sci USA*, Vol. 85, pp. 836-840.
 6. Bryk, M. and Belfort, M. 1990. Spontaneous shuffling of domains between introns of phage T4. *Nature* 346:396.
 7. Chamary, J. V. and Hurst, L. D. 2004. Similar Rates but Different Modes of Sequence Evolution in Introns and at Exonic Silent Sites in Rodents: Evidence for Selectively Driven Codon Usage. *Mol. Biol. Evol.* 21(6):1014-1023.
 8. Chu, W. M., Ballard, R., Carpick, B. W., Williams, B. R. and Schmid, C. W. 1998. Potential Alu function: regulation of the activity of double-stranded RNA-activated kinase PKR. *Mol. Cell. Biol.*, 18,58-6.
 9. Dostie, J. and Dreyfuss, G. 2002. Translation Is Required to Remove Y14 from mRNAs in the Cytoplasm. *Current Biol*, Vol. 12, 1060-1067.
 10. Fong, Y. W., and Zhou, Q. 2001. Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature*, Vol. 414, pp. 929-933.
 11. Furger, A., O'Sullivan, J. M., Binnie, A., Lee, B. A. and Proudfoot, Nick. J. 2002. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes & Development* 16:2792-2799.
 12. Han, J. S. and Boeke, J. D. 2005. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression. *Bioessays*, 27, 775-784.
 13. Häslér, J. and Strub, K. 2006. Alu elements as regulators of gene expression. 2006. *Nucleic Acids Res.* Vol. 34, No. 19 5491-5497.
 14. Hedner, U., Ginsburg, D., Lusher, J. M. and Katherine, A. High. 2000. Congenital Hemorrhagic Disorders: New Insights into the Pathophysiology and Treatment of Hemophilia. *Hematology*, January 1, (1): 241-265.
 15. Hirosawa, S., Fahner, J. B., Salier, J. P., Wu, C. T., Lovrien, E. W., and Kurachi, K. 1990. Structural and functional basis of the developmental regulation of human coagulation factor IX gene: factor IX Leyden. *Develop Biol.* 87(12): 4421-4425.
 16. Ismail, S. I., Kingsman, S. M., Kingsman, A. J., and Uden² M. 2000. Split-Intron retroviral vectors: enhanced expression with Improved Safety. *J Virol*, Vol. 74, No. 5,p. 2365-2371.
 17. Jonsson, J. J., Foresman, M. D., Wilson, N. and McIvor, R. S. 1992. Intron requirement for expression of the human purine nucleoside phosphorylase gene. *Nucleic Acids Res*, Vol. 20, No. 12 3191-3198.
 18. Kurachi, S., Hitomi, Y. Furukawa M, Kurachi K. 1995. Role of intron I in expression of the human factor IX gene. *J Biol Chem.* 270(10):5276-81.
 19. Larizza, A., Makalowski, W., Pesole, G., Saccone, C. 2002. Evolutionary dynamics of mammalian mRNA untranslated regions by comparative analysis of orthologous human, artiodactyl and rodent gene pairs. *Comput Chem.* 26:479-490.
 20. Lipman, D. J. 1997. Making (anti)sense of non-coding sequence conservation. *Nucleic Acids Res* 25:3580-3583.
 21. Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>
 22. Kim, D. S., Kim, T. H., Huh, J. W., Kim, I. C., Kim, S. W., Park, H. S. and Kim, H. S. 2006. LINE FUSION GENES: a database of LINE expression within human genes. *BMC Genomics*, 7, 139.
 23. Kohany, O., Gentles, A. J., Hankus, L. J. 2006 Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor. *BMC Bioinformatics*, Oct 25;7:474 <http://www.girinst.org/censor/index.php>
 24. Kurachi, K., Kurachi, S., Furukawa, M., and yao, S. N. 1993. Biology of factor IX. Blood coagulation fibrinolysis, 4:953-973.
 25. Le Goff, W., Guerin, M., Chapman, M. J., Thillet, J. 2003. A CYP7A promoter binding factor site and Alu repeat in the distal promoter region are implicated in regulation of human CETP gene expression. *J Lipid Res*, 44:902 - 9910.
 26. Lu S. and Cullen. Bryan R. 2003. Analysis of the stimulatory effect of splicing on mRNA production and utilization in mammalian cells *,RNA Society* Vol. 9 pp.618-630.

27. Manenti G., De Gregorio L., Pilotti S., Falvella F. S., Incarbone M., Ravagnani F., Pierotti M. A., Dragani T. A. 1997. Association of chromosome 12p genetic polymorphisms with Lung adenocarcinoma risk and prognosis," *Carcinogenesis* 18: 1917-20.
28. Matsutani, S. 2006. Links between repeated sequences *J Biomed Biotechnol* :, V2006, P: 1-3.
29. Medstrand, P., van de Lagemaat, L. N., Dunn, C. A., Landry, J. R., Svenback, D., Mager, D. L. 2005. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenet Genome Res*, 110:342-345.
30. Norris, J., Fan, D., Aleman, C., Marks, J. R., Futreal, P. A., Wiseman, R. W., Iglehart, J. D., Deininger, P. L., McDonnell, D. P. 1995. Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers. *J Biol Chem*, 270:22777-227.
31. Oei, S. L., Babich, V. S., Kazakov, V. I., Usmanova, N. M., Kropotov, A. V., Tomilin, N. V. 2004. Clusters of regulatory signals for RNA polymerase II transcription associated with Alu family repeats and CpG islands in human promoters. *Genomics*, 83:873-8.
32. Palmiter, R. D., Sandgrent, E. P., Avarbockt, M. R., Allen, D. D. and Brinster, R. L. 1991. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, pp. 478-4.
33. Pearson, W. R. and Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *PNAS* 85:2444- 2448.
34. Pesole, G., Mignone, F., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F., Liuni, S. 2001 Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene*. 276:73-81.
35. Piedrafitra, F. J., Molander, R. B., Vansant, G., Orlova, E. A., Pfahl, M., Reynolds, W. F. 1996. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 271:14412 -114420.
36. Plantier, J. L., Rodriguez, M. H, Enjolras N., Attali, O., Negrier, C. 2001. A factor VIII minigene comprising the truncated intron I of factor IX highly improves the in vitro production of factor VIII. *Thromb. Haemost*, 86:596-603.
37. Pusan National University, Phylodrow, Ver.0.8, Copyright (1999), <http://pearl.cs.pusan.ac.kr/phyldrow/>
38. Rohrer. J. and Ellen Conley, M. 1998. Transcriptional Regulatory Elements within the first intron of bruton's tyrosine kinase. *Blood*, Vol 91, No 1. pp 214-221.
39. Salamov, A. A. and Solovyev, V. V. 1997. Recognition of 30-processing sites of human mRNA precursors. *Comput. Appl. Biosci.*, 13, 23-28. <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/gene-finder/gf.html>
40. Solovyev, V. V. and Kolchanov, N. A. 1994. Search for functional sites using consensus In Computer analysis of Genetic macromolecules. (eds. Kolchanov N.A., Lim H.A.), *World Scientific*, p.1621. <http://www.softberry.com/berry.phtml>
41. Solovyev, V. V., Shahmuradov, I. A. 2003. PromH: Promoters identification using orthologous genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3540-3545. <http://www.softberry.com/berry.phtml>
42. Sorek, R., Ast, G. and Graur, D. 2002. Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res.*, 12, 1060-1067.
43. Spicher, A., Guicherit, O. M., Duret, L., Aslanian, A., Sanjines, E. M., Denko, N. C., Giaccia, A. J., Blau, H. M. 1998. Highly conserved RNA sequences that are sensors of environmental stress. *Mol Cell Biol* 18:7371-73
44. Tatusova, T. A., Madden, T. L. 1999. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-25. Align two sequences (bl2seq)
45. Ying, S. Y., and Lin, S. L. 2004. Intron-derived microRNAs—fine tuning of gene functions, *Gene* 342, pp. 25-28
46. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol.* 7(1-2):203-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Analysis of the Non-Coding Region of the Human Factor VIII Gene in Comparison with Selected Regions of the Intron 1 of Human Factor IX

Haddad Mashadrizesh A.A.^{1,2}, Zomorodipour A.¹, Sabouni F.¹, and Hemmat J.^{1,3}

¹ National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology Tehran, I.R. of Iran

² Institute of Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsy University of Mashad, Mashad, I. R. Iran

³ Biotechnology Dept., Institute of Advanced Technologies-IROST, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

To identify possible regulatory elements in the intronic regions of human coagulation factor VIII (hFVIII) gene, the non-coding sequences of this gene were compared to a selected parts of human factor IX (hFIX) intron-1 sequences whose regulatory functions had been suggested previously. With this aim, seven overlapping fragments of hFIX intron-1 were separately compared to the whole sequences taken from 25 introns of hFVIII gene. This comparative study has resulted in detection of several repeated sequences within hFVIII intronic regions, varying in size from 50 to 350 base pairs that are homologues to that of the hFIX-derived sequences. The detected elements show more than 74% homology to that of the sequences taken from hFIX gene. Although it is not possible to show a direct correlation between the numbers of repeated elements found in each intron and the intron length. However it seems that the distribution pattern and the number of repeated elements among hFVIII introns and within each intron are not random. In other word, the results show that the numbers of repeats in the first and last introns in the gene are higher than those of other internal introns. Reverse direction of a number neighboring elements in some of the introns may lead to the formation of stem-loop structures that might be effective in the stability of the hFVIII mRNA precursor. A survey within the 5'- and 3'-untranslated regions of the hFVIII gene detected a common sequence which is repeated in each region. Comparison of the repeated elements to the major repeated elements in human genome shows that the detected elements belong to sub-families of retrotransposon-derived elements, known as Alu sequences. Further sequence analysis of the repeated elements indicates in the presence of many short sequences with the potential of transcription-factor binding activity that supports the regulatory function of the repeated elements found in the hFVIII intronic regions. Experimental analysis of the detected sequences to examine their potential regulatory function on a candidate reporter gene is the next step to this work.

Keywords: human coagulation factors VIII & IX gene, noncoding regions, gene regulation, repetitive elements, intron.