

# دراسة بعض المتغيرات الوراثية الجزيئية لتأثير الجينين RPE65 و MERTK في التهاب شبكية العين الصباغي

رضاب عجيل جاسم الراوي، سمير مشرف خلف الدليمي

جامعة الانبار/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم علوم الحياة

## الخلاصة:

شملت الدراسة الحالية 74 مريض مصابين بالتهاب الشبكية الصباغي في محافظتي بغداد والانبار , من كلا الجنسين , وبمتوسط فئة عمرية ( 20\_45 ) سنة , بالإضافة الى 20 شخص متعافين من المرض ومن أي اعراض بصرية اخرى تستخدم كعينات سيطرة. وجاءت هذه الدراسة بغرض كشف التغيرات الحاصلة في كل من جين RPE65 , وجين MERTK , لدى هؤلاء المرضى باستخدام تقنية ال-PCR , للتعرف على الخلل الحاصل في هذه الجينات ومدى ارتباطها بحدوث المرض .

واظهرت نتائج الدراسة الحالية على المستوى الجزيئي لجين RPE65 ظهوره بنسبة %43.25 من عموم افراد عينة الدراسة بينما لم يظهر بنسبة %56.75 من مجموع عينة الدراسة الامر الذي يؤكد دور الخلل الحاصل على مستوى تتابعات هذا الجين في احداث المرض .اما نتائج الدراسة على المستوى الجزيئي لجين MERTK فقد اكدت ظهوره بنسبة %63 من عموم عينة الدراسة الحالية بينما لم يظهر بنسبة %37 , فالخلل الحاصل على مستوى جين RPE65 كان اعلى من الخلل الحاصل على مستوى جين MERTK وبالتالي فان جين RPE65 قد يؤثر بنسبة اكبر في احداث المرض . واكدت نتائج الدراسة أن معدل ظهور جين MERTK اكبر من معدل ظهور جين RPE65 في المصابين بالتهاب الشبكية الصباغي ضمن افراد عينة الدراسة الحالية , متوسط الفئة العمرية الاكثر عرضة للإصابة بمرض التهاب الشبكية الصباغي هي الفئة 20\_40 سنة, وبذلك توصي الدراسة بإجراء تحليل اكسونات الجينات المدروسة كاملة لمعرفة السبب الرئيس الحاصل في الجينات بصورة دقيقة المؤدي الى احداث المرض لدى المصابين و اجراء دراسة خاصة على مستوى تركيز بروتينات الجينات المدروسة في الدم ومدى علاقتها بأحداث المرض وتقدمه .

الكلمات المفتاحية: Retinitis pigmentosa, RPE65, RP, MERTK, Retina

## المقدمة:

الاعراض الرئيسية للمرض هي: العمى الليلي night blindness والذي يقصد به فقدان التمييز البصري في الاماكن المظلمة (6), وفقدان الرؤية المحيطية Peripheral visual field loss وتحدث نتيجة لحدوث انحطاط في الخلايا المستقبلية للضوء photoreceptor cells بالإضافة الى تجمع الصبغيات حول الشبكية و توصف هذه الرؤية برؤية النفق tunnel vision (4), وفقدان الرؤية المركزية Central visual loss وتحدث في المراحل المتأخرة من المرض (7) .

كما وتم اكتشاف العديد من الجينات التي كانت وراء التهاب الشبكية الصباغي RP وانتقاله الى الاجيال ومن اهم الجينات في هذا الصدد هي جين RPE65 (retinitis pigmentosa epithelium- 65), الذي يقع في البطانة الظهارية في الشبكية Retinal pigment epithelium والذي يلعب دورا رئيسيا في الحفاظ على الخلايا المستقبلية للضوء photoreceptor cell والذي يسبب حوالي 2% من حالات التهاب الشبكية الصباغي RP المتتحي ويقع هذا الجين على الكروموسوم الاول في الانسان. (8), وجين

انحطاط الشبكية retinal degeneration في الانسان هو واحد من اهم الاسباب الرئيسية للعمى blindness , و التهاب الشبكية الصباغي Retinitis Pigmentosa هو فرع من انحطاط الشبكية والذي يتميز بالفقدان (الموت) التدريجي للخلايا المستقبلية للضوء photo receptor cells , والذي يتميز بوجود علامات وراثية و ظواهر سريرية غير متجانسة (1). ان اصطلاح التهاب الشبكية الصباغي Retinitis Pigmentosa اطلق لأول مرة من قبل (Donders) في العام 1857, ويؤثر هذا المرض في (1 من 3500) الى (1 من 4000) شخص (2). ان مصطلح التهاب الشبكية الصباغي نفسه مصطلح غير دقيق علميا وذلك لان الالتهابات لا تظهر كجزء بارز من فسيولوجيا المرض , وذلك لان هذا الاضطراب هو في الواقع ضمور او انحطاط محدد وراثيا وليس اضطراب التهابي , علاوة على ذلك فإن التهاب الشبكية الصباغي اصبح مرتبط بفئة كاملة من مورثات انحطاط الصبغيات في الشبكية (3). (retina). ومن النتائج الاكثر شيوعا و الاكثر تأثيرا في مرض التهاب الشبكية الصباغي هو العمى الليلي night blindness والفقدان التدريجي في المجال البصري المحيطي peripheral visual field او ما يسمى برؤية النفق (4 tunnel vision) .

ويتوارث التهاب الشبكية الصباغي بثلاث طرق رئيسية وهي اما عن طريق جينات جسمية سائدة Autosomal dominant genes , او عن طريق جينات جسمية متنحية Autosomal recessive genes او عن طريق جينات مرتبطة بالكروموسوم الجنسي (X-linked (X) و من

## Corresponding Address:

Redhab Ajeel Jasem Al-Rawi

University of Anbar/ Coll. of Educ. for Pure Sciences/ Biology Dpt.

Email: redhabajeel@gmail.com

**A- المجموعة المرضية:** تتكون من 74 مريض مصابين بالتهاب الشبكية الصباغي RP ومن كلا الجنسين ضمن فئة عمرية تتراوح بين (20-40) سنة.

**B- مجموعة السيطرة:** تتكون من 20 شخص من المتطوعين السليمين والذين لم تظهر او تشخص لديهم اي اضطرابات بصرية .

## 2 - الدراسة الجزيئية Molecular study

**استخلاص الدنا المجيني من الدم Genomic DNA Extraction from blood**  
تم استخلاص الدنا من دم كل من عينات السيطرة والعينات المرضية وفق طريقة الاستخلاص المعتمدة من قبل الشركة المجهزة (Ge-neid) الأمريكية والمرفقة مع ال (KIT) الخاص بالاستخلاص .

**طريقة عمل تفاعل سلسلة البلمرة المتعددة - Polymerase Chain Reaction**  
**action:** أجريت طريقة العمل باستعمال PCR Micro tubes حجم 0.2 ml وبحسب طريقة العمل المرفقة مع عدة ال PCR-premix المجهزة من قبل شركة Bioneer الأمريكية وبحجم نهائي 20 ml كما موضح في الجدول (1).

(MERTK (C- mer proto oncogene tyrosine- kinase) الذي يقع على الكروموسوم الثاني ويلعب دورا مهما في العديد من انسجة الجسم المختلفة واهمها شبكية العين retina فهو يرتبط ارتباطا وثيقا مع الاغشية الميكروسكوبية لشبكية العين. (9) وبالنظر لأهمية هذه الجينات وعلاقتها بالتهاب الشبكية الصباغي جاءت هذه الدراسة تهدف الى :

دراسة تأثير جيني RPE65 و MERTK لدى الأشخاص المصابين بالتهاب الشبكية الصباغي RP . ومقارنة تأثير الجينات المدروسة في المصابين بالمرض في العراق .

## المواد وطرائق العمل:

### 1 - جمع العينات:

تم جمع عينات الدراسة من المصابين بالتهاب الشبكية الصباغي RP بالتنسيق مع اطباء العيون في مستشفى ابن الهيثم التعليمي بغداد/العراق للفترة من 19/2/2016 ولغاية 15/7/2016 ، وقد اشتملت عينات الدراسة على مجموعتين :

### جدول (1) مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

Volume µl/sample	Component
2	Primer F بادئ امامي
2	Primer R بادئ خلفي
8	Nuclease free water ماء خالي النيوكلييز
3	DNA template قالب الدنا
5	PCR premix خليط التفاعل
20	الحجم النهائي

حرارة الإرتباط Annealing temperature الملائمة للعمل . وقد أستعمل زوج من البوادئ لجين RPE65 و اربع بوادئ لجين MERTK ، حيث جهزت البادئات بشكل lyophilized من شركة Bi-oneer الأمريكية وذويت في الماء المقطر. وتم تحضير تركيز نهائي مقداره 10 بيكومول / ميكروليتر. والجدول (2) و (3) يمثل البوادئ المستعملة في هذه الدراسة :

وأضيفت جميع المواد السابقة الى البريمكس Lyophilized Premix المجهزة من شركة Bioneer ورُجت بواسطة الهزاز exspin لمدة دقيقة ثم شغل PCR ، وأدخلت العينات بعناية في جهاز المبلر الحراري لإجراء التفاعل وباستعمال البرنامج المناسب في التضاعف الذي تم تطبيقه على وفق برنامج خاص للبوادئ المعدة خصيصا للدراسة الحالية ، وقد تم اجراء تفاعلات PCR بعد تهيئة الظروف المثلى optimization لكل البوادئ لمعرفة درجة

### جدول (2) البوادئ Primers المستعملة لجين RPE65 مع تتابعاتها والحجم المتوقع لها.

اسم البادئ	Primer sequence التتابع		الحجم المتوقع bp
P1	F	AGCATCCTGCTGGTGGTTAC	20
	R	GCTTGCCCATCAAACAGGTG	20
P2	F	CACCTGTTTGATGGGCAAGC	20
	R	CCAGCAGCAGAGATCCACAA	20

جدول (3) البوادي Primers المستعملة لجين MERTK مع تتابعاتها والحجم المتوقع لها.

اسم البادئ	التتابع Primer sequence		الحجم المتوقع bp
M1	F	TGTTTTACCAACCCAGCCT	20
	R	AAAGGTGCTACTGATGGGG	19
M2	F	GCAGTGAGCCCTTGGATTCT	20
	R	CTCCCGCTGTGAAGAGTTGT	20
M3	F	CGGACAGGGAGCTTCGC	17
	R	GGACGGATGGACAGATGGAC	20
M4	F	CCATCCGTCCGGAGAGAAAT	20
	R	GGGAGGAAGAGGCCAG	18

F: Forward R: Reverse

جدول (4) برنامج تفاعل PCR

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة م°	الخطوات
1	5 دقيقة	95	المسخ الاولي
35	30 ثانية	95	المسخ النهائي
	30 ثانية	55-60	*الالتحام
	1 دقيقة	72	الاستطالة
1	5 دقيقة	72	الاستطالة النهائية

\*متغيرة حسب البادئ ( حيث كانت للبادئ p1 و p360 م° ، وللبادئ p2 57 م° ، وللبادئ p4 55.4 م° ، وللبادئ M1 و M2 59.3 م° ) .

### النتائج والمناقشة:

1 - توزيع المصابين حسب التاريخ العائلي للإصابة بمرض التهاب الشبكية الصباغي : يبين الجدول (5) توزيع أفراد عينة الدراسة الحالية وفقاً لتاريخ الإصابة بمرض التهاب الشبكية الصباغي (وجود أكثر من حالة إصابة بـ RP ضمن تاريخ العائلة) إذ بلغت نسبة المصابين ذوي التاريخ العائلي الطبيعي (45.9%)، أما المصابين ذوي التاريخ العائلي الموجب فكانت نسبتهم (54.1%).

وبعد انتهاء وقت التفاعل اخرجت أنابيب PCR Micro tubes الحاوية على عينات الدنا المتضاعفة من الجهاز، وسحب منها 7 مايكروليتر وحمل على هلام الاكاروز بتركيز 2 غم في 100مل، ورحلت بجهاز الترحيل الكهربائي لمدة ساعة ونصف. ربط جهاز القدرة الكهربائية Power sup- ply مع حوض الترحيل بواسطة الاسلاك والاقطاب الموجبة والسالبة ثم شغل جهاز القدرة وضبط عند 90 فولت لمدة ساعة واحدة بعد ذلك تم إيقاف جهاز القدرة وانهاء عملية الترحيل الكهربائي. رفع الهلام من حوض الترحيل الكهربائي وفحص بجهاز التوثيق Gel Documentation بواسطة الأشعة فوق البنفسجية وصور بالكاميرا الرقمية المرفقة بالجهاز.

جدول (5) توزيع المصابين حسب التاريخ العائلي للإصابة بـ RP.

ت	الجنس	العدد	التاريخ العائلي الموجب		التاريخ العائلي الطبيعي	
			العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
1	ذكور	41	22	29.9%	19	26%
2	إناث	33	18	24.2%	15	19.9%
المجموع		74	40	54.1%	34	45.9%

والمصابين بمرض RP فقد بلغت نسبتهم (45.9%) وهذا ما يؤكد وجود حالات فردية مصابة ضمن العائلة الواحدة على الرغم من عدم وجود تاريخ عائلي للمرض في العائلة وهو وارد جداً لأن أغلب حالات الإصابة بمرض RP تكون حالات مفردة من الإصابة والتي تكون نسبتها (46%) بصورة عامة، وغالباً ما يحدث المرض لدى هؤلاء الأفراد نتيجة لحدوث طفرة جديدة في العائلة في بعض الجينات المسؤولة عن إحداث المرض لدى هؤلاء المصابين، وهذا وأن ظهور هذه الطفرة لدى شخص وحيد من العائلة لا يمنع من وراثة هذه الطفرة لدى أبنائه لاحقاً (20).

2 - توزيع المصابين وفقاً للفئات العمرية : يبين الجدول (6) توزيع أفراد عينة الدراسة المصابين بالتهاب الشبكية الصباغي RP وفقاً للفئة العمرية إذ أظهرت نتائج الدراسة أن أعلى نسبة (43.2%) تقع ضمن الفئة العمرية (20-30) سنة، تليها الفئة العمرية (40 سنة فأكثر) والتي بلغت نسبتها (35.2%)، ثم الفئة العمرية (30-40) سنة بنسبة (21.6%).

نلاحظ من الجدول (5) أن نسبة التاريخ العائلي الموجب لدى أفراد عينة الدراسة والبالغ عددهم (74) من كلا الجنسين المصابين بالتهاب الشبكية الصباغي بلغت (54.1%) وذلك لأن أغلب الحالات المدروسة كانت ضمن عوائل لها تاريخ في الإصابة بمرض RP، وهذا ما يؤكد دور العوامل الوراثية والعوامل البيئية التي تشترك في إحداث الإصابة بين أفراد العائلة الواحدة. كما وأن التهاب الشبكية الصباغي RP واحد من الأمراض الوراثية النادرة الحدوث، والذي ينتقل بين أفراد العائلة الواحدة وراثياً عن طريق الجينات الجسمية السائدة والمتنحية وكذلك المرتبطة بالكروموسوم (X) وهذا ما يؤكد أن نحو (46%) من مرض التهاب الشبكية الصباغي هو مرض متوارث ضمن العائلة الواحدة إذ أن نسبة وراثة المرض بالجينات السائدة يبلغ نحو (19%) وكذلك الجينات المتنحية لها نسبة (19%) من وراثة المرض فضلاً عن نسبة (8%) تنتقل خلال جينات مرتبطة بالكروموسوم (24)، (2)، (X).

أما أفراد عينة الدراسة ذوو التاريخ العائلي الطبيعي من كلا الجنسين

جدول (6) توزيع المصابين وفقاً للفئات العمرية.

ت	الفئة العمرية	العدد	النسبة المئوية
1	(20-30) سنة	32	43.2%
2	(30-40) سنة	16	21.6%
3	(40 سنة فأكثر)	26	35.2%
المجموع		74	100%

RP syndromic) وحددت دراستهم الفئة العمرية الأكثر إصابة بالمرض كانت تتراوح (25-48) سنة علماً أن أعمار بدء المرض في عينة دراستهم كانت لا تتجاوز (20-25) سنة.

بينما دراسة (26) والتي أجريت في أمريكا حددت أن الفئة الأعلى تكراراً بين المصابين بالتهاب الشبكية الصباغي الناتج عن حدوث خلل في جين MERTK كانت بين (13-3) سنة وهذا ولم تتجاوز أعمار المصابين بالمرض الـ (30) عاماً.

3 - توزيع المصابين حسب الإصابة بمرض السكري :

وعند دراسة توزيع المصابين بمرض التهاب الشبكية الصباغي RP من أفراد عينة الدراسة حسب الإصابة بمرض السكري حيث كما موضح في الجدول (7) كان (56) مريضاً من أفراد عينة الدراسة نسبة السكر في الدم لديهم ضمن الحدود الطبيعية (80-120) Mg/dl، وهذا ما يؤكد القلة النادرة المصابة بمرض السكري مع التهاب الشبكية الصباغي RP إذ كانت نسبة (24.2%) من أفراد عينة الدراسة ظهر لديهم خلل في نسبة السكر في الدم وكان معدل أعمارهم يتراوح بين (30-72) سنة.

إن مرض التهاب الشبكية الصباغي ينتقل ويصيب كل الفئات العمرية الشبابة تقريباً وعلى اختلافها ونادراً ما نجد هناك حالات إصابة RP من مرحلة الطفولة المبكرة وإن وجدت فهي قليلة جداً إلا إذا تلازم المرض مع أعراض أو أمراض أخرى مرتبطة بأمراض الطفولة المبكرة، ويرجح أن علامات المرض لا تظهر جملة واحدة وإنما يتدرج المرض في أعراضه بدءاً من العمى الليلي وانتهاءً بفقدان الرؤية المركزية وهذا ما يؤكد أن المرض يظهر بعد سنوات من حدوث الخلل المسؤول عن المرض، وما يؤكد ذلك هو أن مرض التهاب الشبكية الصباغي مرض يتدرج في أعراضه مع انخفاض أسّي واضح في المجال البصري بمعدل (3.5 - 13.5) سنوياً (7).

كما أشارت الدراسات السابقة التي حددت عمر بدء مرض RP وانتشاره ومنها دراسة (25) والتي أجريت في أمريكا والتي جاءت بغرض تشخيص مرض RP عند بعض المصابين نتيجة لطفرات حاصلة في جين MERTK، إذ حددت الفئة العمرية (20-42) سنة الأعلى تكراراً بين المصابين والذين كانت أعراض المرض لديهم واضحة جداً، وكذلك دراسة (17) والتي جاءت بغرض تشخيص أعراض مرض RP المتلازم وغير المتلازم (Syndromic and non)

جدول (7) توزيع المصابين بـ RP حسب الإصابة بمرض السكري.

ت	نسبة ال سكر في الدم	العدد	النسبة المئوية
1	mg/dl (80-120)	56	75.8%
2	mg/dl (125-350)	18	24.2%
المجموع		74	100%

يعد مرض السكري واحداً من الأسباب المهمة للإصابة بالعمى نتيجة لما يحدثه من ضرر في الشبكية نتيجة حدوث تغيرات في الأوعية الدموية للشبكية عند مريض السكري، ويعد تأثر داء السكري على العين أقوى من مضاعفاته على أي جزء آخر (كالدماغ) مما دفع إلى القول بأن هناك عوامل موضعية في الشبكية ذاتها هي المسؤولة عن هذه المضاعفات، ومن ناحية فسلجية فإن انخفاض الأوكسجين في الشبكية هو السبب الرئيس لظهور هذه المضاعفات وتفاقمها (28) (27).

وأجريت دراسة (29) في السعودية على مريضين مصابين بمرض التهاب الشبكية الصباغي RP وأمراض أخرى منها داء السكري لتوضيح مدى علاقة مرض السكري في اعتلال الشبكية لدى هذين المريضين، وكان المريضان يعانيان من أمراض ومتلازمات أخرى مثل قلة السمع والعقم وارتفاع ضغط الدم وخلل في وظائف الكلية والكبد وغيرها من الأمراض المشخصة لديهم وكانت أعمارهم تتراوح (34-35) سنة على التوالي والمريض الأول كان يعالج بالحقن بالأنسولين والثاني كان مصاباً بداء السكري من النوع الثاني المقاوم للأنسولين ولوحظ أن المريضين يعانيان من اعتلال شبكية واضح جداً ولكن لم يشخص هذا الاعتلال نتيجة السكري وذلك لأنهما مصابان بـ RP الذي يعمل على فقدان المستلزمات الضوئية لوظيفتها في الشبكية، ومجرد حدوث هذا الخلل فإن اعتلال الشبكية نتيجة

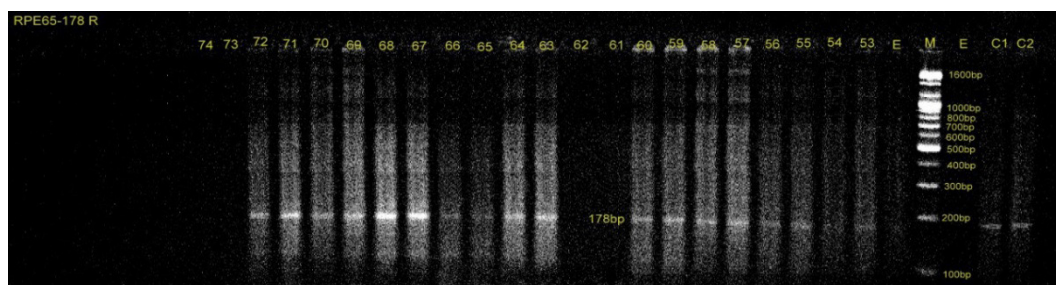
وأجريت دراسة (29) في السعودية على مريضين مصابين بمرض التهاب الشبكية الصباغي RP وأمراض أخرى منها داء السكري لتوضيح مدى علاقة مرض السكري في اعتلال الشبكية لدى هذين المريضين، وكان المريضان يعانيان من أمراض ومتلازمات أخرى مثل قلة السمع والعقم وارتفاع ضغط الدم وخلل في وظائف الكلية والكبد وغيرها من الأمراض المشخصة لديهم وكانت أعمارهم تتراوح (34-35) سنة على التوالي والمريض الأول كان يعالج بالحقن بالأنسولين والثاني كان مصاباً بداء السكري من النوع الثاني المقاوم للأنسولين ولوحظ أن المريضين يعانيان من اعتلال شبكية واضح جداً ولكن لم يشخص هذا الاعتلال نتيجة السكري وذلك لأنهما مصابان بـ RP الذي يعمل على فقدان المستلزمات الضوئية لوظيفتها في الشبكية، ومجرد حدوث هذا الخلل فإن اعتلال الشبكية نتيجة

#### 4 - نتائج تقنية PCR لجين RPE65

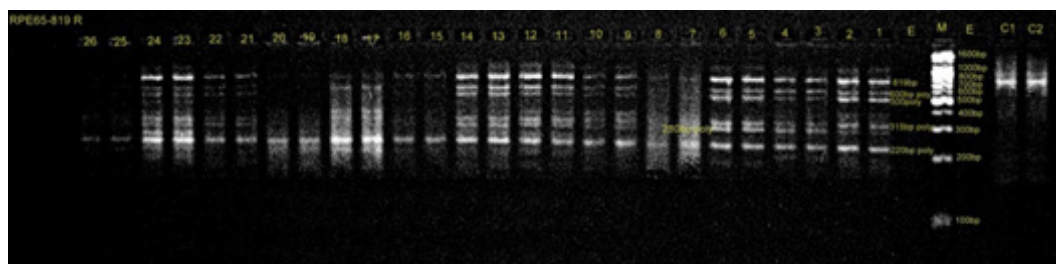
أظهرت نتائج تقنية الـ PCR لأفراد عينة الدراسة التي أجريت باستعمال زوج من البودائ المتخصصة للجين RPE65 إن من بين (74) مصاب بالتهاب الشبكية الصباغي هناك (45) مصاب يعانون من اضطرابات جينية على مستوى جين RPE65، تراوحت هذه الاختلافات بين غياب الحزم المتوقع ظهورها أو ظهور الحزم في مواقع غير متوقعة (وزن جزيئي أعلى أو أقل) من الوزن الجزيئي المطلوب، في حين لم يبدي أفراد عينة السيطرة أي اضطراب جيني، كما موضح في الجدول رقم (8) والصور (1)، (2) ادناه

**جدول (8) البودائ المستعملة لجين RPE 65، حجم البادئ المتوقع، وعدد مرات ظهور أو غياب الحزمة ونسبتها المئوية لأفراد عينة الدراسة والسيطرة**

عينة السيطرة (٢٠)		عينة الدراسة (٧٤)				حجم البادئ bp	رمز البادئ	ت		
عدد مرات غياب الحزمة	عدد مرات ظهور الحزمة	عدد مرات غياب الحزمة	عدد مرات ظهور الحزمة	عدد مرات غياب الحزمة	عدد مرات ظهور الحزمة					
النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد			
0%	0	100%	20	45.9%	34	54.1%	40	178	P1	1
0%	0	100%	20	67.6%	50	32.4%	24	819	P2	2



**صورة (1) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2% لنتائج RCP للبادئ 1P للعينات (53-47) بفرق جهد 09 ملي فولت لمدة ساعة ونصف حيث ان ( 1C,2C ) يمثل دنا العينات السليمة ( E ) حفرة بدون دنا ( M ) reddaL**



**صورة (2) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2% لنتائج RCP للبادئ 2P للعينات (62\_1) بفرق جهد 09 ملي فولت لمدة ساعة ونصف حيث ان ( 1C,2C ) يمثل دنا العينات السليمة ( E ) حفرة بدون دنا ( M ) reddaL**

أبوية بتتابعات ثلاثية النيوكليوتيدة كانت موجودة لدى أفراد عينة الدراسة المصابين ولكنها كانت غالبة في كل أفراد عينة السيطرة، مما أكد أن هذه التتابعات الثلاثية النيوكليوتيدة زادت على التابع الرئيسي للجين مما أدت إلى إحداث خلل في وظيفة الجين وبالتالي إحداث المرض. بالإضافة إلى ما تم ذكره هناك العديد من أنواع الطفرات على مستوى جين RPE65 والتي كانت ناتجة عن حدوث عيوب في الموقع والناتجة عن حدوث حشر وحذف في نفس الوقت، وطفرات نقطية في نيوكليوتيدة واحدة ضمن كودون يشفر لحمض أميني معين، بالإضافة إلى الطفرات الناتجة عن وجود اثنين من الاليل المتحثة لنفس الجين، وطفرات أخرى ناتجة عن انتقال نسختين من الكروموسوم أو جزء من الكروموسوم من أحد الأبوين دون الآخر إلى الذرية (UPD Uniparental disomy)، حيث شكلت هذه الطفرات نسبة (98.7%) من بين الطفرات الحاصلة في جين RPE65 والتي كانت قد أحدثت خللاً في شكل الأحماض الأمينية amino acids للبروتين (RPE65 Kd) في مرحلة بدء الترجمة initiation of translation في عمليات التعبير الجيني وبناء البروتين ولم تكن هذه الطفرات محددة على موقع معين بل أنها كانت موزعة على طول البروتين (14)، (15)، (16).

كل الطفرات سابقة الذكر وبمختلف تأثيراتها ونسبتها ومعدل توأجها الحاصلة في جين RPE65 لدى مرضى التهاب الشبكية الصبغية وغيره من أمراض انحطاط الشبكية الأخرى مثل (LCA)، جميعها تعمل على إيقاف دور جين RPE65 في إكمال الدورة البصرية عن طريق إيقاف سابق لأوانه في عمليات التعبير الجيني لإنتاج بروتين (RPE65kd) الأساسي في عملية الرؤية الطبيعية (10). كما وتعمل هذه الطفرات على إيقاف عمل البروتين حتى وإن تم إنتاجه والذي سيؤثر على عمله في تحويل فيتامين (A) إلى ما يعرف - cis retina 11 في المستقبلات البصرية وبالتالي إيقاف عمل الصبغيات البصرية في الشبكية (16).

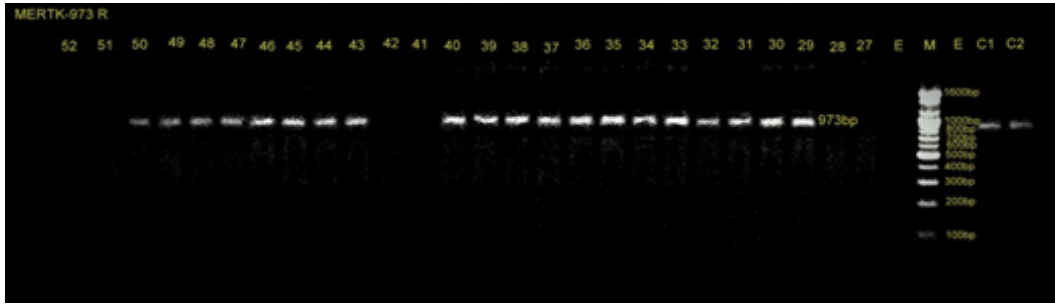
## 2 - نتائج تقنية PCR لجين MERTK

أظهرت نتائج تقنية PCR لأفراد عينة الدراسة التي أجريت باستخدام أربع بواقي متخصصة للكشف عن جين MERTK، أن من بين (74) مصاب بالتهاب الشبكية الصبغية هناك (43) مريض يعانون من اضطرابات جينية على مستوى جين MERTK تراوحت هذه الاختلافات بين غياب الحزم المتوقع ظهورها، أو ظهور الحزم في مواقع غير متوقعة (وزن جزيئي أقل) من الوزن الجزيئي المطلوب، في حين لم يبدي أفراد عينة السيطرة أي اضطراب جيني كما موضح في الجدول رقم (9) والصور (3)، (4)، (5)، (6) ادناه

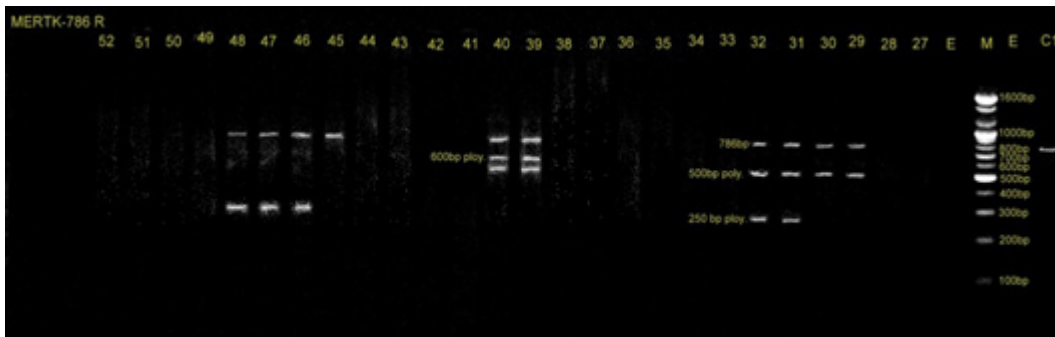
أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنه أكثر من (56.75%) من المصابين بالتهاب الشبكية الصبغية ضمن عينة الدراسة أظهروا تغيراً واضحاً على مستوى جين RPE65 والذي يؤكد دور هذا الجين والتغيرات الحاصلة فيه في إحداث التهاب الشبكية الصبغية لدى أفراد عينة الدراسة. شخّصت حوالي 60 طفرة مرضية (Pathogenic mutations) تابعة للـ (14) أكسون ضمن جين RPE65 كانت وراء العديد من أمراض انحطاط الشبكية (retinal degeneration) ومنها متلازمة ليبير الخلقية من النوع الثاني (LCA type2)، والتهاب الشبكية الصبغية المتتحي (arRP) هذا وأن عمر وشدة المرض تعتمد على نوع معين من الطفرات الحاصلة في هذا الجين (10)، (11). أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنه هناك طفرات حاصلة على مستوى الجين أدت إلى اختفاء الحزم أو عدم ظهورها في منطقة الجين المطلوبة (وزن جزيئي أقل) في زوجين من البادئات التابعة لهذا الجين وغالباً فإن هذه الطفرات قد تكون قد حصلت بسبب حدوث حذف Deletion في تسلسل بعض القواعد النيوتروجينية في منطقة التابع الجيني أدت هذه الطفرة إلى إحداث خلل معين وبالتالي لم تظهر الحزمة في الوزن الجزيئي المطلوب، واتفقت نتائج الدراسة هذه مع دراسة (12) والتي أكدت أنه هناك حوالي (21) مرض مختلف من أمراض التهاب الشبكية وانحطاطها وراثياً ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالتغيرات الحاصلة في تتابعات الـ DNA والظاهرة على شكل طفرات -Muta tion مختلفة كالحذف deletion والاستبدال والإدخال insertion كما وأكدت هذه الدراسة أنه هناك حوالي (8 طفرات) مختلفة حاصلة على مستوى جين RPE65 في مرضى مصابين بأنواع مختلفة من أمراض انحطاط الشبكية. كما وأكدت نتائج الدراسة الحالية ظهور حزم البادئات لبعض أفراد عينة الدراسة في وزن جزيئي أعلى من الوزن الجزيئي المطلوب والتي قد تكون ناتجة عن حدوث طفرة كانت نتيجة لحدوث إدخال insertion أو تضاعف Duplication على مستوى الجين والتي تؤدي إلى حدوث ما يعرف (Over Expression) في الجين والذي يؤدي إلى ظهور الحزم في موقع أعلى من الوزن الجزيئي المطلوب نتيجة لتعدد أشكال الـ DNA DNA polymorphism الحاصلة لهذا السبب، وجاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسة (13) في دراسة وضحت الطفرات الحاصلة في جين RPE65 لدى مرضى مصابين بالتهاب الشبكية الصبغية RP ومرضى مصابين بمتلازمة ليبير حيث جاءت دراستهم بأن حوالي 15 مصاب بالتهاب الشبكية الصبغية كانت لديهم طفرات أو خلل في جين RPE65 وكان أغلب الخلل الحاصل ناتج عن حدوث الإدخال insertion في القواعد النيوتروجينية ضمن تتابع معين من جين RPE65، وكذلك شخّصت طفرات ناتجة عن وجود الأتل طافرة

**جدول (9) البادئات المستعملة لجين MERTK، حجم البادئ المتوقع وعدد مرات ظهور أو غياب الحزمة ونسبتها المئوية لأفراد عينة الدراسة والسيطرة.**

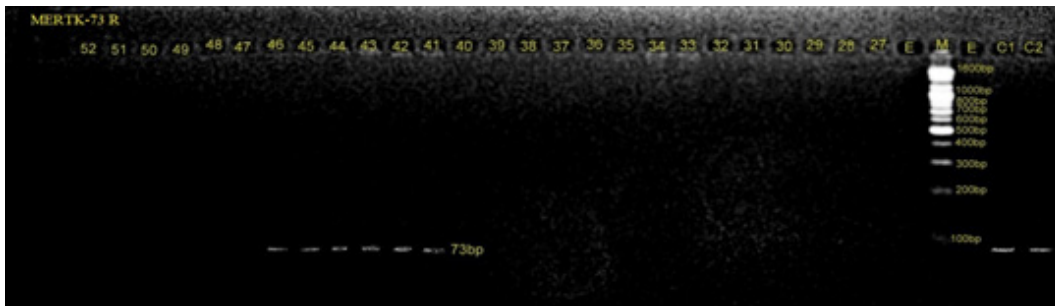
رمز البادئ	حجم القطعة الناتجة	عينة الدراسة (74)				عينة السيطرة (20)			
		عدد مرات ظهور الحزمة		عدد مرات غياب الحزمة		عدد مرات ظهور الحزمة		عدد مرات غياب الحزمة	
		العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
M1	973	43	58.7%	31	41.9%	20	100%	0	0%
M2	786	50	67.6%	24	32.4%	20	100%	0	0%
M3	73	11	14.9%	63	85.1%	20	100%	0	0%
M4	85	43	58.1%	31	41.9%	20	100%	0	0%



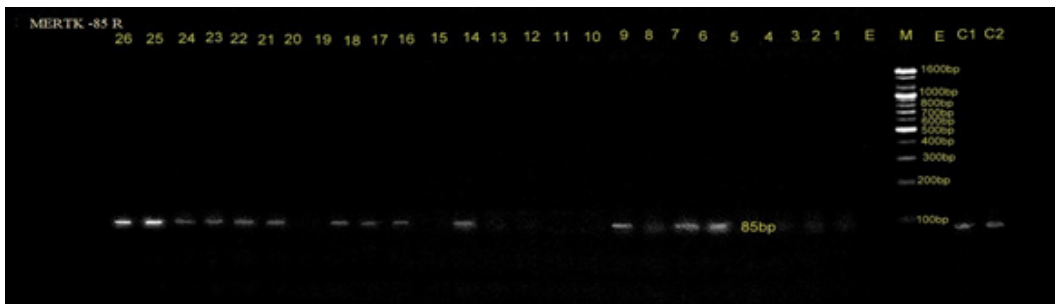
صورة (3) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2% لنتائج RCP للبادئ 1P للعينات (47-53) بفرق جهد 09 ملي فولت لمدة ساعة ونصف حيث ان (1C,2C) يمثل دنا العينات السليمة (E) حفرة بدون دنا, (M) reddaL



صورة (4) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنتائج RCP للبادئ 2M للعينات (25\_72) بفرق جهد 09 ملي فولت لمدة ساعة ونصف حيث ان (1C) يمثل دنا العينات السليمة (E) حفرة بدون دنا, (M) reddaL



صورة (5) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2% لنتائج RCP للبادئ 3M للعينات (25-72) بفرق جهد 09 ملي فولت لمدة ساعة ونصف حيث ان (1C) يمثل دنا العينات السليمة (E) حفرة بدون دنا, (M) reddaL



صورة (6) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2% لنتائج RCP للبادئ 4M للعينات (62-1) بفرق جهد 09 ملي فولت لمدة ساعة ونصف حيث ان (1C) يمثل دنا العينات السليمة (E) حفرة بدون دنا, (M) reddaL

tion نتيجة لحدوث حذف deletion في تتابع معين من الجين الذي كان سبباً وراء زيادة أعراض المرض عند المصابين وهذا ما أكدته أيضاً (21) في دراسة سابقة. إن التعبير الجيني لجين MERTK (Expression of mertk) في الطفرات الناتجة عن الحذف يؤدي إلى خفض استقرار البروتين ونسبة عالية جداً في الخلية وبالتالي يؤدي ذلك إلى تقليص عملية الفسفرة phosphorylation اللازمة لإكمال عمل البروتين (20).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أغلب مرضى التهاب الشبكية الصباغي RP ضمن أفراد عينة الدراسة الأقارب (ضمن العائلة الواحدة أو ما يتعداه من درجات القرابة) أظهروا تغيراً واضحاً في كلا الجينات المدروسة RPE65 و MERTK على الرغم من درجة القرابة والتي تحتم حدوث نفس الطفرة في نفس الجين، وتتفق هذه الحالة من الدراسة الحالية مع دراسة فريدة من نوعها قام بها (22) على مريضين من ولاية مقدونيا وغالباً فإن المرض لديهم كان نتيجة طفرة انتقلت لهم من أباهم الذكور، وجاءت نتائج Debra بأن هذين المريضين وعلى الرغم من درجة القرابة بينهم فإن أحدهم كان لديه خلل في جين RPE65، والآخر كان لديه خلل في جين ، هذه الدراسة وغيرها من الدراسات أكدت دور ما يعرف Unipa- (rental isodisomy) (UPD)، (يقصد به أن يستلم الفرد الناتج زوج كروموسومات أو قطع كروموسومية من أحد الأبوين دون الآخر والتي تكون سبب المرض عند الذرية الناتجة) وتقدر نسبة هذه الحالة مع RP حوالي (3%) فقط (23).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنه أكثر من (50.4%) من المصابين بالتهاب الشبكية الصباغي ضمن عينة الدراسة أظهروا تغيراً واضحاً على مستوى جين MERTK والذي يؤكد دور هذا الجين والتغيرات الحاصلة فيه في إحداث مرض التهاب الشبكية الصباغي لدى أفراد عينة الدراسة. إن الطفرات الحاصلة في جين MERTK كانت وراء 2% فقط من التهاب الشبكية الصباغي المتتحي (ar RP) هذا وقد تم تحديد (9) الألائل مختلفة طافرة different mutant allele كانت (5) منها من النوع المتمثل homo zygous والذي ينتج عن زواج الأقارب في دراسة (18) و(19)، وأن الطفرات الناتجة عن حدوث خلل في تركيب جين MERTK ترتبط ارتباطاً وثيقاً وكبيراً بأمراض ضمور القضبان والمخاريط Rod – con dystrophy أكثر من ارتباطها مع مرض التهاب الشبكية الصباغي RP، وإذا اعتبرنا أن الأول منفصل عن الثاني في الأعراض والحدوث (18). أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هناك طفرات حاصلة على مستوى جين MERTK أدت إلى اختفاء الحزم وعدم ظهورها في منطقة الجين المطلوبة أو ظهورها بوزن جزئي أقل من الوزن الجزيئي المطلوب، وغالباً قد تكون هذه الطفرات قد حصلت نتيجة لحدوث عملية حذف deletion في تسلسل القواعد النيتروجينية في منطقة التتابع الجيني المقصودة، أدت هذه الطفرة بالنتيجة إلى إحداث خلل معين وبالتالي لم تظهر الحزم بالوزن الجزيئي المطلوب، وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع دراسة (20) حيث أثبت أن الأفراد الذين يعانون من مرض RP كان لديهم تحور في جين MERTK وأرجح السبب إلى حدوث طفرة واحدة من النوع missense muta-

## References:

- Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C., and Palczewski, K. (2003). Understanding retinitis pigmentosa. *Annul Rev Physiol.* 65: 851- 879 .
- Rivolta, C., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2002). Paternal uniparental hetero disomy with partial isodisomy of chromosome 1 in a patient with retinitis pigmentosa without hearing loss and a missense mutation in the Usher syndrome type 11 gene USH2A. *Arch ophthalmology* 120:1566-1571.
- Tehmin, B. (2007) Genetic basic of retinitis pigmentosa thesis of Doctoral, The university of The PUNJAB.
- Heckenlively, J. R., Yoser, S. L., Friedman, L. H. and Oversier, J. J. (1988) Clinical findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophtholmol.* 105:504 – 511 .
- Wang, D.Y., Chan, W.M., Tam, P.O., Baum, L., Lam, D.S., Chong, K.K., Fan, B.J. and Pang, C.P. (2005) Gene mutation in retinitis pigmentosa and there clinical implications, *Clin Chim Acta* ., 351,14,1:5-16.
- Berson E.L. (1987) Electroretinographic findings in retinitis pigmentosa. *Jpn J Ophthalmol*; 31: 327.
- Berson E.L., Sandberg M.A. and Rosner B. (1985). Natural course of retinitis pigmentosa over a three-year interval. *Am J Ophthalmol* , 99: 240-51.
- Redmond, T.M., Poliakov, E., Yu, S., Tsai, J.Y., Lu, Z. and Gentleman, S., (2005). Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 102:13658–13663.
- Duncan JL, LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Yang H, Trautmann N, Chappelov AV, Feng W, Earp HS, Matsushima GK, Vollrath D. (2003). An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout human and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(2):826-38.
- Travis, G.H., Golczak, M., Moise, A.R. and Palczewski, K. (2007). Retinoids as potential therapeutic agents. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 47:469–512.
- Thompson, D.A., Gyurus, P., Fleischer, L., Bingham, E.L., McHenry, C.L., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Lorenz, B., Richards, J.E., Jacobson, S.G., Sieving, P.A. and Gal, A. (2000). Genetics and phenotypes of RPE65 mutations in inherited retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis, Sci*; 41:4293–4299.
- Debra A. Thompson, Peter Gyurus, Laura L. Fleischer, Eve L. Bingham, Christina L. McHenry, Eckart Apfelstedt-Sylla, Eberhart Zrenner, Birgit Lorenz, Julia E. Richards, Samuel G. Jacobson, Paul A. Sieving, and Andreas Gal. (2000). Genetics and Phenotypes of RPE65 Mutations in Inherited Retinal Degeneration. *IOVS*, Vol. 41, No. 13.
- Hiroiyuk M., Gerald, A., Fishman, Sandeep A., Grover, Anne B. Fulton, Eliot L. Berson, Thaddeus, P., and Dryja (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:3088–3093.
- Hamel, C.P., Tsilou, E., Pfeffer, B.A., Hooks, J.J., Detrick, B. and Redmond, T.M. (1993). Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J Biol Chem*, 268:15751–15757.
- Veske, A., Nilsson, S.D., Narfstrom, K. and Gal, A. (1999). Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics*, 57:57–61.
- Nicola G. Ghazi, Emad B., Abboud, Sawsan R., Nowilaty, Hisham Alkuraya, Abdulrahman, Alhommadi, Huimin Cai, Rui Hou, Wen-Tao Deng, Sanford L., Boye, Abdulrahman, Almaghamsi, Fahad Al Saikhan, Hassan Al-Dhibi, David Birch, Christopher Chung, Dilek Colak, Matthew M., LaVail, Douglas Vollrath, Kirsten Erger, Wenqiu Wang, Thomas Conlon, Kang Zhang, William Hauswirth, Fowzan S. and Alkuraya (2016). Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno associated virus gene vector results of a phase I trial *Hum Genet*, Origin investigation, 10:16-1637.
- Pierrottet C.O., Zuntini, M., Digiuni, I., Bazzanella, P., Ferri, R., Paderni, L.M., Rossetti, S., Cecchin, N., Orzalesi and Bertelli, M. (2014). Syndromic and non syndromic forms of retinitis pigmentosa: a comprehensive Italian clinical and molecular study reveals new mutations. *Genet. Mol. Res*, 13 (4): 8815-8833
- Hamel, C. P. (2007). Cone rod dystrophies. *Orphanet, J Rare Dis*: 2, 7.
- Johnson, S., Halford, S., Morris, A. G., Patel, R. J., Wilkie, S. E.,



- Hardcastle, A. J., Moore, A. T., Zhang, K., and Hunt, D. M. (2003). Genomic organisation and alternative splicing of human RIM1, a gene implicated in autosomal dominant cone-rod dystrophy (CORD7). *Genomics* 81, 304-314.
20. Keating, A.K., Linger, R.M.A. and Graham, D.K. (2009). MERTK (c-mer protooncogene tyrosine kinase). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*,13:728-732.
  21. Mchenry, C.L., Liu, Y., Feng,W., Nair, A.R., Feathers, K.L., Ding, X., Gal, A., Vollrath, D.,Sieving, P.A. and Thompson, D.A. (2004.) MERTK arginine-844-cysteine in a patientwith severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*,45: 1456-1463.
  22. Debra A. Thompson, Christina L. McHenry, Yun Li, Julia E. Richards, Mohammad I. Othman, Eberhard Schwinger Douglas Vollrath, Samuel G. Jacobson, and Andreas Gal.(2002). Retinal Dystrophy Due to Paternal Isodisomy for Chromosome 1or Chromosome 2, with Homoallelism for Mutations in RPE65or MERTK, Respectively. *Am. J. Hum. Genet*, 70:224-229.
  23. Engel, E. (1980) .A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 6:137-143.
  24. Inglehearn, C.F. (1998). Molecular genetics of human retinal dystrophies. *Eye*, 12: 571-579.
  25. Tschernutter, M., Jenkins, S. A., Waseem, N. H., Saihan, Z., Holder, G. E., Bird A. C., Bhattacharya, R. R., Ali, A. R. and Webster, (2006). Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *Br J Ophthalmol*,Jun,90:718-23
  26. Mackay, D.S., Henderson, R.H., Sergouniotis, P.I., Li, Z., Moradi, P., Holder, G.E.,Waseem, N., Bhattacharya, S.S., Aldahmesh, M.A., Alkuraya, F.S., Meyer, B.,Webster, A.R. andMoore, A.T., (2010). Novel mutations in MERTK associated with childhood onset rod-con dystrophy. *Mol., Vis.* 16: 369377.
  27. Harris, A., Arendt, O. and Damnis, R.P. (1996).Hyperoxia improves contrast sensitivity in early diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*;80:209-13.
  28. Havelius, H., Berglund, S. and Falke, P. ( 2000). Impaired dark adaptation in polycythaemia. Improvement after treatment. *Acta Ophthalmol Scand* ,78:53-7.
  29. Afaf A. and Fadl A . (2010) .Combined occurrence of diabetes mellitus and retinitis pigmentosa . *Ann Saudi Med* , 30,70-75.
  30. Arden, G B. (2001) . The absence of diabetic retinopathy in patients with retinitis pigmentosa: implications for pathophysiology and possible treatment *Br Ophthalmol* , 85:366-370.

## A study of some genetic molecular variable of RPE65 and MERTK genes effect in Retinitis Pigmentosa

Redhab Ajeel Jasem Al-Rawi, Samir Mishrif Khalaf

University of Anbar/ Coll. of Educ. for Pure Sciences/ Biology Dpt.

### Abstract:

The current study included 74 patients with Retinitis pigmentosa in the provinces Baghdad and Al- Anbar , from both sexes , and the average age group (20-45) years , as well as (20) people healthy from the disease and from any other optical ailments, its used as control samples. This study came to detect changes taking place in each of RPE65 and MERTK genes in these patients by using PCR technology , to get know defect in these genes and how its relate in the occurrence of disease

The result of the present study at the molecular level of RPE65 gene showed appearances by 43.25% from all the members of study sample then it's not appear by 56.75%of total study sample which confirms the role of defect winning at the level of sequences of this gene in the events of the disease . then the result of study at the molecular of MERTK gene its appearance by 63% from all present study samples and it's not appear by 37%, there for the defect winning at the level of RPE65 was higher than from the imbalance winning at the level of MERTK gene, thus RPE65 gene may effect of the largest rate in the events of the disease .

The results of the study showed that the rate of emergence of MERTK gene greater than the incidence rate of RPE65 in patients with retinitis pigment within the sample of the current study, and the average age group is more susceptible to retinitis pigment is the category 20\_40 year, A gene-specific gene that leads to disease progression in patients and a special study on the level of concentration of gene proteins studied in the blood and its relationship to disease events and progression