

مقایسه بیان ژن اینوزین تری فسفات پیروفسفاتاز در لوسمی میلوئیدی مزمن و افراد سالم

بهروز حسن نیا^۱، مهرداد بهمنش^{۲*}، محمدتقی اکبری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۷/۹/۹

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱

چکیده

هدف: یکی از مهم‌ترین انواع آسیب‌های سلولی، اکسیداتیو دامیناسیون DNA و نوکلئوتیدهای آزاد در مخزن نوکلئوتیدی سلول است. مشارکت نوکلئوتیدهای دامینه غیرعادی (ITP, dITP, XTP) در ساختار ژنوم می‌تواند فراوانی جهش‌های جابه‌جایی بازها را افزایش دهد. پیشنهاد شده است که انباشت این نوکلئوتیدها می‌تواند منجر به ناپایداری ژنتیکی شود که زمینه‌ساز انواع بیماری‌ها و سرطان‌ها می‌شود. آنزیم ITPase کد شده توسط ژن *ITPA* مسئول حفاظت سلول‌ها از طریق حذف بازهای پورینی دامینه از مخزن نوکلئوتیدی است. هدف این مطالعه بررسی نقص احتمالی در فعالیت ژن *ITPA* به‌عنوان یک عامل مهم در ایجاد پیش‌زمینه ژنتیکی برای ناهنجاری‌های کروموزومی و بدخیمی‌هایی از جمله سرطان لوسمی میلوئیدی مزمن است.

مواد و روش‌ها: بیان ژن *ITPA* در ۲۳ بیمار لوسمی میلوئیدی مزمن و ۲۱ نمونه سالم با استفاده از RT-PCR نیمه‌کمی و به‌کارگیری ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن کنترل داخلی اندازه‌گیری شد. واریانت‌های غیرعادی به‌دست آمده از تکثیر cDNA ژن *ITPA* کلون و تعیین توالی شد و با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی توالی آن‌ها مقایسه شد.

نتایج: داده‌ها بیانگر کاهش بیان ژن *ITPA* در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن در مقایسه با نمونه‌های سالم بود. همچنین دو نوع رونوشت علاوه بر رونوشت اصلی در برخی نمونه‌ها تولید می‌شود که یکی دارای حذف ۱۲۳ نوکلئوتیدی و دیگری حذف ۷۷ نوکلئوتیدی در ناحیه چارچوب خواندنی (ORF) است.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که با کاهش بیان ژن *ITPA* در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن فعالیت آنزیمی ITPase طبیعی نبوده و اختلال در بیان این ژن می‌تواند به‌عنوان یک عامل افزایش‌دهنده ناپایداری ژنتیکی در این بیماران در نظر گرفته شود.

کلیدواژگان: اکسیداتیو دامیناسیون، *ITPA*، لوسمی میلوئیدی مزمن.

۱- مقدمه

به عوامل شیمیایی و فیزیکی مانند رادیکال‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) و نیتروژن (Reactive Nitrogen Species: RNS) اشاره کرد [۱، ۲]. از

مواد ژنتیکی سلول‌ها به‌طور طبیعی در معرض آسیب‌هایی از داخل یا خارج سلول قرار می‌گیرند. از مهم‌ترین عوامل آسیب‌رسان و جهش‌زا در مواد ژنتیکی سلول‌ها می‌توان

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵.

XTP شده و آن‌ها را به شکل مونوفسفات آن‌ها هیدرولیز می‌کند [۹]. این آنزیم توسط ژن *ITPA* کد می‌شود. این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۰ با طولی در حدود ۱۴ کیلوباز قرار دارد و cDNA ای به طول ۱/۱ کیلوباز را کد می‌کند. cDNA این ژن یک چارچوب خواندنی (Open Reading Frame: ORF) ۵۸۴ نوکلئوتیدی دارد که یک پروتئین ۱۹۴ اسیدآمینه‌ای با وزن تقریبی ۲۲ کیلودالتون را کد می‌کند. خانواده ژنی *ITPA* در بسیاری از موجودات زنده شناسایی شده و ساختمان پروتئین ITPase و مکانیسم عمل آن در گونه‌های مختلف مانند باکتری تا انسان مشخص شده است. ارتولوگ (Ortholog) ژن *ITPA* به اسامی *Hamp1* در مخمر، *rdgB* در اثرشیاکلی و *NTPase* در متانوکوکوس جاناشی (*Methanococcus Jannaschii*) شناسایی شده است [۱۰-۱۳].

ژن *ITPA* در انسان و موش به مقدار زیاد و در تمامی بافت‌ها بیان می‌شود [۹]. گزارش‌هایی در مورد وجود ارتباط احتمالی بین اختلال در عملکرد ژن *ITPA* و بیماری‌های انسانی وجود دارد. به نظر می‌رسد که افزایش در غلظت سوبسترای این آنزیم می‌تواند در شرایط خاص مانند استرس‌های اکسیداتیو برای سلول مضر باشد. برای مثال شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ITP ممکن است در القای شکست‌های کروموزومی در بیماری اسکلرودرما (Scleroderma) نقش داشته باشد [۱۴]. همچنین در گزارشی نشان داده شده است که اضافه شدن ITP و dITP به کشت‌های سلولی می‌تواند میزان نقایص ساختاری کروموزوم‌ها را افزایش دهد [۱۵، ۱۶]. علاوه بر این کاهش فعالیت ITPase در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی پارانوئید (Paranoid Schizophrenia) و چند بیمار عقب مانده شدید ذهنی (Sever mental retardation) نیز گزارش شده است. اخیراً اختلال در عملکرد طبیعی این ژن نیز در افراد مبتلا به سرطان حاد میلوئیدی (Acute Myeloid Leukemia: AML) و نشانگان میلودیسپلازی (Myelodysplastic syndrome) گزارش شده است [۱۷]. ایکلی نول (Null) برای ژن *rdgB* شواهدی دال بر افزایش جهش و ناپایداری در DNA را نشان داده و همراهی آن با جهش در سایر ژن‌های درگیر در سیستم

طرفی سلول‌ها برای حفظ پایداری ژنوم در برابر آسیب‌های وارده به DNA، به مکانیسم‌های ترمیمی دقیق و پیچیده‌ای مجهز شده‌اند. گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که تجمع آسیب‌ها در DNA یا اختلال در سیستم‌های ترمیمی منجر به ایجاد جهش و ناپایداری ژنتیکی (Genetic Instability) می‌شود که می‌تواند در نهایت منجر به مرگ سلولی یا زمینه‌ساز به وجود آمدن انواع سرطان‌ها شود [۳، ۴]. اکسیداتیو دآمیناسیون (Oxidative Deamination) یکی از مهم‌ترین انواع آسیب‌ها به مواد ژنتیکی سلول‌ها است که در دو سطح DNA ژنومی و مخزن نوکلئوتیدهای آزاد داخل سیتوزول روی می‌دهد [۵]. این فرایند به‌طور خود به خودی در سلول‌ها و در شرایط فیزیولوژیک روی می‌دهد اما تحت شرایط استرس اکسیداتیو (Oxidative Sterss) توسط گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن مانند اکسید نیتروژن (Nitric Oxide: NO) و اشعه ماورای بنفش (Ultraviolet: UV) در سلول‌ها افزایش می‌یابد. طی این روند، گروه آمین بازهای آدنین (Adenine) و گوانین (Guanine) جای خود را به گروه کتو (Keto group) داده و به‌ترتیب این بازها تبدیل به هیپوگزانتین (Hypoxanthine: HX) و گزاننتین (Xanthine: X) می‌شوند [۶، ۷]. بررسی‌ها نشان داده است که باز آلی هیپوگزانتین می‌تواند علاوه بر تیمین (Thymine) با باز سیتوزین (Cytosine) نیز تشکیل جفت‌باز دهد. باز گزاننتین نیز توانایی تشکیل جفت‌باز با آدنین را دارد. بنابراین ورود و تجمع این بازهای تغییر یافته در DNA و RNA می‌تواند منجر به افزایش جهش‌هایی از نوع جابه‌جایی بازها (Substitution Mutation)، تغییر اطلاعات ژنتیکی، ناپایداری و اختلال در عملکرد مواد ژنتیکی شود [۶-۸]. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های ترمیمی برای جلوگیری از ورود بازهای تغییر یافته به ساختار DNA و RNA، پاک‌سازی مخزن نوکلئوتیدی از نوکلئوتیدهای سه فسفات‌ای است که دارای باز تغییر یافته‌اند. بر همین اساس در سطح مخزن نوکلئوتیدی سلول‌ها آنزیمی به نام اینوزین تری‌فسفات پیروفسفاتاز (Inosine Triphosphate Pyrophosphatase: ITPase) عهده‌دار حذف بازهای پورین (Purine) سه فسفات دآمینه dITP، ITP،

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی نمونه‌های مورد مطالعه

نمونه‌های بیماران از افرادی که توسط متخصص خون و سرطان که علائم بالینی مطابق با CML را نشان می‌دادند و برای انجام آزمایش‌های مولکولی به آزمایشگاه معرفی شده بودند انتخاب و پس از تأیید وجود جابه‌جایی میان کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ در این مطالعه بررسی شدند. همچنین افراد سالم و کنترل براساس عدم وجود علائم بالینی و جابه‌جایی کروموزومی ۹ و ۲۲ در آنان انتخاب شدند. بر همین اساس ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی از ۲۳ بیمار CML و ۲۱ فرد سالم پس از کسب رضایت کتبی از آن‌ها گرفته شد. نمونه‌های خون به آرامی در یک لوله ۱۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) با غلظت نیم مولار و pH=۸ ریخته شد و همزمان لوله تکان داده شد تا خون با EDTA به‌خوبی مخلوط و از لخته شدن آن جلوگیری شود. سپس گلبول‌های سفید خون با استفاده از فایکول (Bahar Afshan) جداسازی و برای آنالیز مولکولی استفاده شدند.

۲-۲- استخراج RNA و ساخت cDNA

از 10^6 سلول گلبول سفید جدا شده از خون محیطی با استفاده از محلول RNX (RNA extraction solution) (Cinnagen)، RNA کل استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز و اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. از ۵ میکروگرم، RNA کل با استفاده از الیگو dT-18 به‌عنوان آغازگر (Primer) برای ساختن cDNA استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Cinnagen) و طبق دستور شرکت سازنده آن انجام شد. برای بررسی بیان ژن *ITPA* از آغازگرهای اختصاصی ژن و به‌عنوان کنترل داخلی از آغازگرهای اختصاصی ژن *GAPDH* (جدول ۱) که با استفاده از نرم‌افزار (Generunner) طراحی شده بودند استفاده شد.

ترمیم DNA مانند *recA* (Recombinase A) و *recABC* سبب مرگ سلول می‌شود [۱۲]. از این رو به‌نظر می‌رسد اختلال در عملکرد این ژن می‌تواند زمینه‌ساز ایجاد ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت شود. یکی از مهم‌ترین خصوصیات سلول‌های سرطانی، وجود ناپایداری ژنتیکی گسترده در این سلول‌ها است. به‌نظر می‌رسد که ناپایداری ژنتیکی نه تنها باعث تشکیل تومور می‌شود بلکه حداقل به‌عنوان فاکتوری در پیشرفت تومور نیز می‌تواند در نظر گرفته شود [۱۸]. افزایش زیاد آسیب به DNA و عدم توانایی سیستم ترمیم برای بازیابی یکپارچگی و تمامیت ژنوم و نیز وجود سیستم‌های ترمیمی آسیب‌دیده که قادر به اصلاح آسیب به DNA نیستند، از عوامل اصلی ناپایداری ژنتیکی محسوب می‌شوند.

لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic Myelogenous Leukemia: CML) یکی از انواع شایع لوسمی‌ها (Leukemia) است که در بیش از ۹۵ درصد از موارد عامل ایجاد آن یک جابه‌جایی (Translocation) دو طرفه بین بازوهای بلند کروموزوم ۹ و ۲۲ است که باعث ایجاد کروموزوم فیلادلفیا (Philadelphia Chromosome) می‌شود. ۵ درصد دیگر شامل جابه‌جایی‌های پیچیده و متنوعی در دیگر کروموزوم‌ها است. گزارش شده که در نتیجه جابه‌جایی فیلادلفیا یک ژن دورگه (Hybrid) غیرطبیعی *BCR-ABL* تولید می‌شود و این ژن قادر به کد نمودن یک پروتئین غیرطبیعی به‌نام *BCR-ABL-Tyrosine-Kinase* است که باعث افزایش غیرعادی گلبول‌های سفید خون می‌شود [۱۹-۲۱]. شواهد روزافزونی وجود دارد که نشان می‌دهد بیان *BCR-ABL* چرخه‌ای از ناپایداری‌های ژنتیکی را شروع می‌کند که توانایی ایجاد دیگر جهش‌ها را در سلول‌های CML دارد، از این رو ناپایداری ژنتیکی در پیشرفت این سرطان نقش چشمگیری دارد [۲۲]. از آن جایی که به‌نظر می‌رسد اختلال در عملکرد *ITPase* می‌تواند در ایجاد بیماری‌های انسانی و ناپایداری ژنتیکی نقش داشته باشد، در این تحقیق بیان ژن *ITPA* به‌عنوان یک فاکتور در ایجاد یا افزایش فراوانی ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های سرطانی CML مورد مطالعه قرار گرفته است.

تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه انجام شد. سپس مقدار مساوی از هر محصول PCR روی ژل آگارز برده شد و توسط نرم‌افزار Uvtec شدت باندهای مربوط به *ITPA* نسبت به شدت باندهای مربوط به *GAPDH* به عنوان میزان بیان ژن *ITPA* در نمونه‌های بیمار و کنترل ارزیابی و مقایسه شد.

۲-۵- کلون کردن cDNA ژن *ITPA*

قطعات غیرعادی حاصل از تکثیر cDNA ژن در بررسی بیان ژن *ITPA* با استفاده از کیت (Bioneer) از ژل استخراج شد. پس از کلون کردن در ناقل T (T-vector) (Fermentas) کلونی‌های سفید نوترکیب حاصل از ترانسفورم شدن باکتری DH5 α در محیط کشت انتخابی حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین (Ampicillin) و در حضور ۴۰ میکرولیتر (۲۰ درصد وزنی به حجمی: W/V) از X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -galactoside) و ۵ میکرولیتر (۲۰ درصد وزنی به حجمی) IPTG (Isopropyle-1-thio- β -galactoside) انتخاب شدند. برای تأیید کلونینگ (Cloning) و تأیید اندازه قطعه کلون شده از کلونی PCR از آغازگرهای عمومی استفاده شد. کلونی‌های حاوی قطعات مورد نظر انتخاب و پس از تکثیر و جداسازی پلاسمیدهای نوترکیب، برای تعیین توالی ارسال شدند.

۲-۶- آنالیز نتایج

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۰ و آزمون آماری من‌ویتنی (Mann-Whitney) برای مقایسه میانگین بیان ژن در دو گروه بیمار و کنترل استفاده شد. برای بررسی توالی مقایسه توالی‌های به دست آمده و هم‌ردیفی آن‌ها از نرم‌افزارهای Clustal W نسخه ۱/۸۳ و Generunner نسخه ۳/۰۵ استفاده شد.

۳- نتایج

در این تحقیق بیان ژن *ITPA* در بیماران مبتلا به CML در مقایسه با افراد سالم اندازه‌گیری شد. در ابتدا افراد بیمار توسط

۲-۳- بررسی مولکولی جابه‌جایی کروموزومی ۹-۲۲

به منظور تشخیص مولکولی بیماران CML از یک RT-PCR چندگانه (Multiplex RT-PCR) برای شناسایی واریانت‌های mRNA ناشی از جابه‌جایی کروموزومی ۹-۲۲ استفاده شد. بر این اساس از ۲ جفت آغازگر که در مکان‌های مختلفی روی ژن *ABL* و *BCR* قرار می‌گرفتند استفاده شد (جدول ۱). طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شده است که با توجه به منطقه شکست در کروموزوم ۲۲، قطعاتی با اندازه‌های متفاوت تکثیر می‌شود که تأیید کننده جابه‌جایی کروموزومی است [۲۳]. برای بررسی مولکولی وجود جابه‌جایی کروموزومی واکنش PCR در تعداد ۳۵ چرخه به صورت زیر انجام شد: در ابتدا دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه که با دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، برای اتصال آغازگرها دمای ۶۳ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی به مدت ۶۰۰ ثانیه در ۷۲ درجه انجام شد.

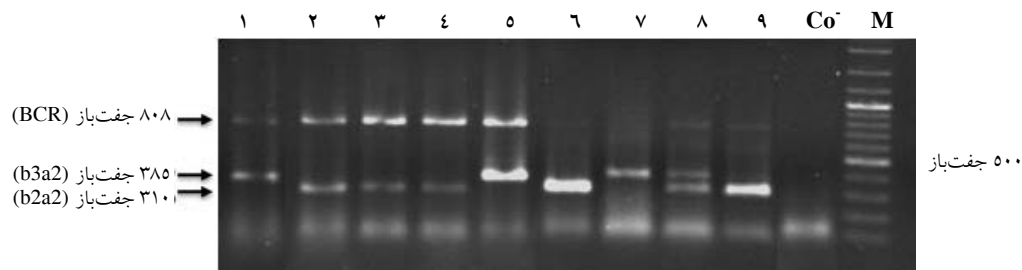
۲-۴- بررسی نیمه کمی بیان ژن *ITPA*

به منظور بررسی بیان ژن *ITPA* از دو دسته آغازگرهای اختصاصی ژن *ITPA* و آغازگرهای ژن کنترل داخلی *GAPDH* (جدول ۱) استفاده شد.

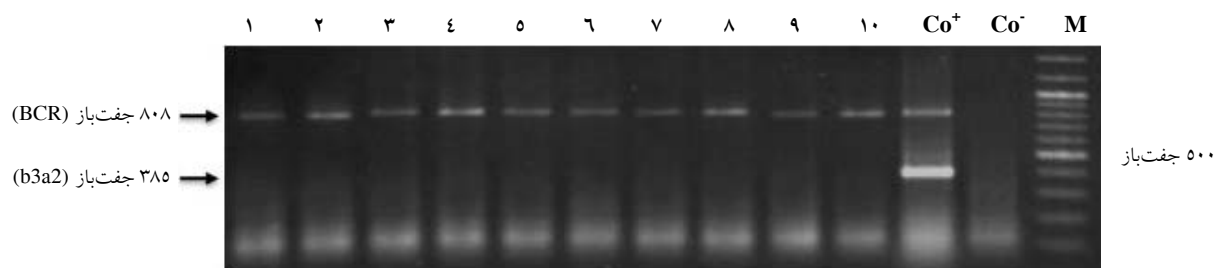
جدول ۱ توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق.

5' ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG 3'	BCR-C
5' ACAGGATTCGCTGACCATCAATAAG 3'	B2B
5' ATAGGATCCTTTGCAACCGGTCTGAA 3'	C5E
5' TGTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3'	CA3
5' CCAGCCGAGCCACATCGCTC 3'	GAPGH(F)
5' ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT 3'	GAPDH(R)
5' GTAACCGGGGATCACCATGGC 3'	5-IITPA
5' GAAGTCAAGCTGCCAAACTGC 3'	3-IITPA

برای ارزیابی نیمه کمی بیان ژن *ITPA* و ژن کنترل داخلی تعداد چرخه بهینه برای ژن *ITPA*، ۳۵ و برای *GAPDH*، ۲۵ چرخه با استفاده از گرادیانت PCR تعیین شد. چرخه‌های PCR استفاده شده به ترتیب عبارت بود از: در ابتدا دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه که با دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، برای اتصال آغازگرها دمای ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه،



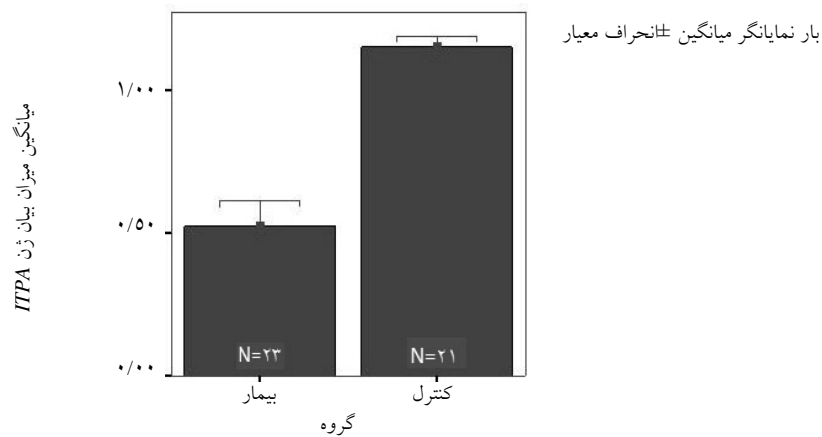
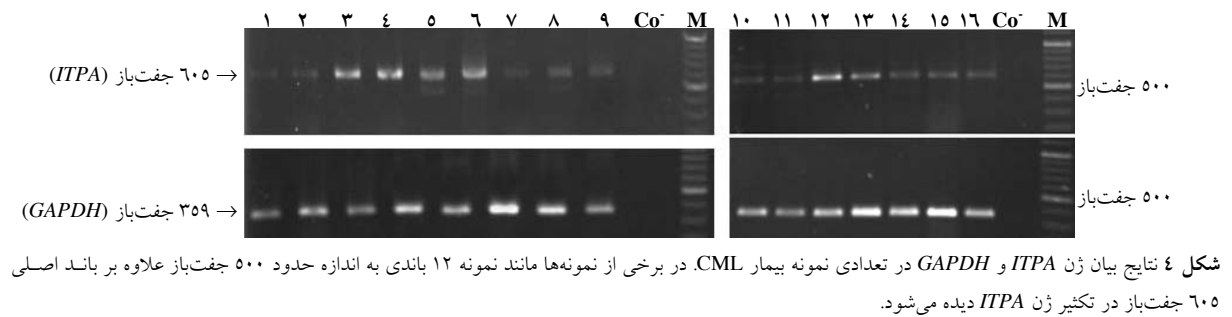
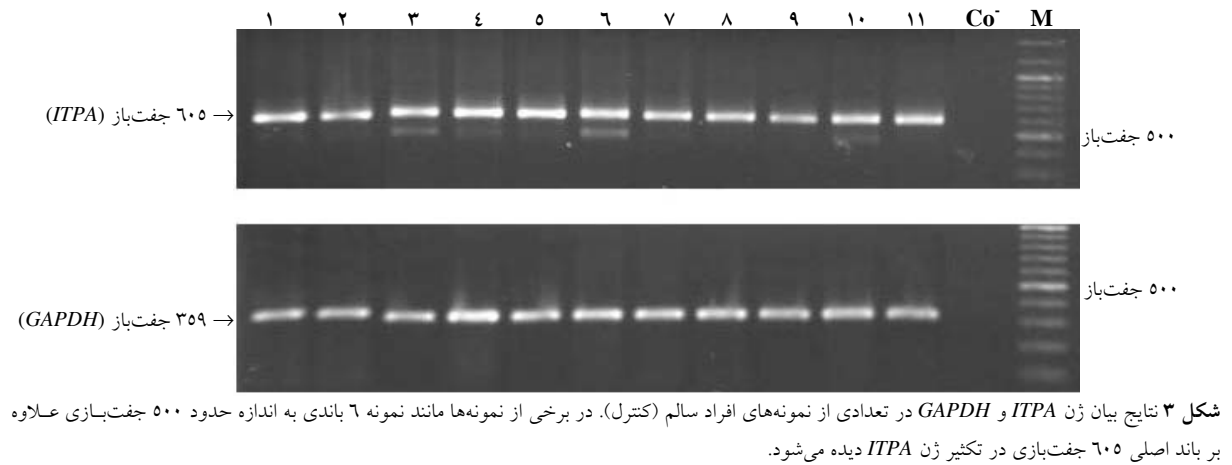
شکل ۱ نتایج RT-PCR چندگانه مربوط به تعدادی بیمار CML. باندهای با اندازه ۳۸۵ جفت باز و ۳۱۰ جفت باز به ترتیب نشان‌دهنده رونوشت‌های کایمیریک b3a2 و b2a2 است که در بیماران CML دیده می‌شود. باند ۸۰۸ جفت‌بازی نیز ناشی از تکثیر رونوشت BCR طبیعی است.



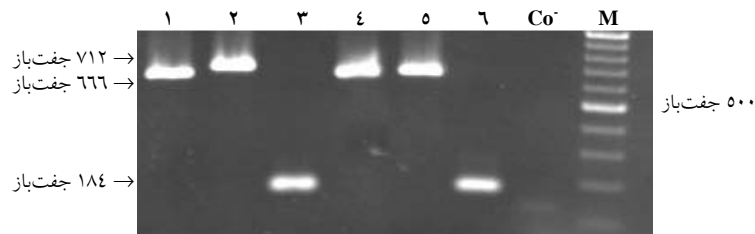
شکل ۲ نتایج RT-PCR چندگانه مربوط تعدادی از افراد سالم (کنترل). باند با اندازه ۸۰۸ جفت‌باز مربوط به تکثیر رونوشت BCR است که در نمونه‌های کنترل که فاقد جابه‌جایی کروموزومی فیلادلفیا هستند تنها این باند دیده می‌شود. باند ۳۸۵ جفت‌باز مربوط به تکثیر رونوشت b3a2 حاصل جابه‌جایی کروموزومی فیلادلفیا است که در نمونه کنترل دارای این جابه‌جایی دیده می‌شود.

اصلی مورد انتظار از cDNA ژن *ITPA* ژن مشاهده شد. که با توجه به تکرار این باندها در تعدادی از نمونه‌ها از ژل استخراج و در ناقل T کلون شد. پس از انجام واکنش الحاق، باکتری *DH5α* با محصول آن ترانسفورم شد. کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب انتخاب و با استفاده از کلونی PCR و آغازگرهای عمومی بررسی شدند (شکل ۵). در نهایت دو کلون که دارای باندی کوچک‌تر از باند مورد انتظار بودند به دست آمد. نوع اول دارای قطعه‌ای به طول ۴۸۲ جفت‌باز و نوع دوم دارای قطعه‌ای به طول ۵۲۸ جفت‌باز بود. با توجه به نتایج به دست آمده، پلاسمیدها پس از تکثیر از باکتری‌ها جدا شده و تعیین توالی شدند. بررسی توالی‌های حاصل نشان داد که واریانت ۴۸۲ جفت‌بازی دارای حذف کامل آگزون ۲ و ۳ از cDNA ژن *ITPA* است که طولی برابر با ۱۲۳ نوکلئوتید دارد و واریانت نوع ۴ (V4) نام‌گذاری شد. همچنین واریانت ۵۲۸ جفت‌بازی دارای حذف کامل آگزون ۷ است که ۷۷ نوکلئوتید را شامل می‌شود و واریانت نوع ۳ (V3) نام‌گذاری شد (شکل ۶).

آنالیز مولکولی برای وجود واریانت‌های حاصل از جابه‌جایی کروموزومی ۹-۲۲ و افراد کنترل برای عدم وجود این جابه‌جایی تأیید شدند (شکل‌های ۱ و ۲). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است نمونه‌های دارای جابه‌جایی کروموزومی دارای باندی با اندازه ۳۸۵ جفت‌باز و یا ۳۱۰ جفت‌باز در سلول‌های خود هستند. نتایج بررسی بیان ژن *ITPA* و ژن *GAPDH* به‌منظور ارزیابی نیمه‌کمی (Semi-quantitative RT-PCR) در افراد سالم و بیمار در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصل بیان ژن *ITPA* در افراد سالم، بیانی متوسط را نشان می‌دهد در حالی که بیان ژن در افراد بیمار دارای تنوع بیان بوده و در مجموع میزان پایین‌تری را نشان می‌دهد. به‌منظور مطالعه آماری، از آزمون من‌ویتنی برای مقایسه میانگین بیان ژن در دو گروه بیمار و کنترل استفاده شد (نمودار ۱) براساس نتایج این آزمون، میانگین بیان ژن در گروه بیماران در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان می‌دهد. در بررسی نتایج بیان ژن، باندهای دیگری علاوه بر باند



نمودار ۱ نمایش هیستوگرام میانگین بیان ژن *ITPA* در دو گروه بیمار و کنترل.



پاک‌سازی مخزن نوکلئوتیدی از نوکلئوتیدهای پورینی غیرعادی است به‌عنوان یک عامل محتمل مستعدکننده در ایجاد یا افزایش فراوانی ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های سرطانی CML که ویژگی بارز آن ناپایداری ژنتیکی گسترده است، بررسی شد. برای این منظور ابتدا بیماران CML با استفاده از روش مولکولی برای وجود جابه‌جایی کروموزومی ۹-۲۲ بررسی شدند و پس از تأیید وجود جابه‌جایی، برای بررسی بیان ژن *ITPA* استفاده شدند. بیان ژن توسط آغازگرهای اختصاصی و با استفاده از روش RT-PCR و در مقایسه با بیان ژن کنترل داخلی *GAPDH* بررسی شد. مطالعات قبلی نشان‌دهنده بیان این ژن در تمامی بافت‌های انسانی و در مقادیر متفاوت است. بیان این ژن در سلول‌های سفید خون محیطی در افراد سالم، مقداری متوسط در مقایسه با کنترل داخلی دارد، اما بیان آن در

پیشگویی ترجمه توالی cDNA واریانت نوع ۴ به پروتئین نشان می‌دهد که حذف آگزون ۲ و ۳ باعث جهش تغییر چارچوب (Frameshift) نمی‌شود و تنها ۲۰ اسیدآمین (۲۴-۶۴) حذف شده است. از طرفی بررسی توالی اسیدآمین‌های واریانت نوع ۳ مشخص کرد که در این واریانت حذف آگزون ۷ یک جهش تغییر چارچوب را به‌همراه دارد که باعث ایجاد یک پروتئین کوتاه شده (Truncated) به‌طول ۱۴۴ اسیدآمین می‌شود.

۴- بحث

نظر به این‌که ژن *ITPA* و آنزیم حاصل از آن در محافظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از اکسیداتیو دامیناسیون، جلوگیری از جهش‌های بازی و ناپایداری ژنتیکی نقش دارد، در این تحقیق بیان و عملکرد ژن *ITPA* را که عهده‌دار

۱ واریانت	ATGGCGGCCT	CATTGGTGGG	GAAGAAGATC	GTGTTTGTAA	CGGGGAACGC	CAAGAAGCTG	GAGGAGGTCT	TTCAGATTCT	AGGAGATAAG	TTTCCATGCA	۱۰۰																								
۳ واریانت	ATGGCGGCCT	CATTGGTGGG	GAAGAAGATC	GTGTTTGTAA	CGGGGAACGC	CAAGAAGCTG	GAGGAGGTCT	TTCAGATTCT	AGGAGATAAG	TTTCCATGCA																									
۴ واریانت	ATGGCGGCCT	CATTGGTGGG	GAAGAAGATC	GTGTTTGTAA	CGGGGAACGC	CAAGAAGCTG	GAGGAG----	-----	-----	-----																									
پروتئین	M	A	A	S	L	U	G	K	K	I	V	F	V	T	G	N	A	K	K	L	E	E	V	V	Q	I	L	G	D	K	F	P	C	۳۳	
۱ واریانت	CTTTGGTGGC	ACAGAAATT	GACCTGCCGG	AGTACCAGGG	GGAGCCGGAT	GAGATTCCA	TACAGAAATG	TCAGAGGCCA	GTTCGCCAGG	TACAGGGGCC	۲۰۰																								
۳ واریانت	CTTTGGTGGC	ACAGAAATT	GACCTGCCGG	AGTACCAGGG	GGAGCCGGAT	GAGATTCCA	TACAGAAATG	TCAGAGGCCA	GTTCGCCAGG	TACAGGGGCC																									
۴ واریانت	CTTTGGTGGC	ACAGAAATT	GACCTGCCGG	AGTACCAGGG	GGAGCCGGAT	GAGATTCCA	TACAGAAATG	TCAGAGGCCA	GTTCGCCAGG	TACAGGGGCC																									
پروتئین	T	L	U	A	Q	K	I	D	L	P	E	V	Q	G	E	P	D	E	I	S	I	Q	K	C	Q	E	A	V	R	Q	V	Q	G	P	۶۶
۱ واریانت	CGTGTGGTT	GAGGACACTT	GTCTGTGCTT	CAATGCCCTT	GGAGGGCTCC	CCGGCCCTA	CATAAAGTGG	TTTCTGAGA	AGTTAAAGCC	TGAGGCTCTC	۳۰۰																								
۳ واریانت	CGTGTGGTT	GAGGACACTT	GTCTGTGCTT	CAATGCCCTT	GGAGGGCTCC	CCGGCCCTA	CATAAAGTGG	TTTCTGAGA	AGTTAAAGCC	TGAGGCTCTC																									
۴ واریانت	CGTGTGGTT	GAGGACACTT	GTCTGTGCTT	CAATGCCCTT	GGAGGGCTCC	CCGGCCCTA	CATAAAGTGG	TTTCTGAGA	AGTTAAAGCC	TGAGGCTCTC																									
پروتئین	V	L	U	E	D	T	C	L	C	F	N	A	L	G	G	L	P	G	P	Y	I	K	W	F	L	E	K	L	K	P	E	G	L	۱۰۰	
۱ واریانت	CACCAGCTCC	TGGCCGGGTT	CGAGGACAAG	TCAGCCTATG	CGCTCTGCAC	GTTTGCACCT	AGCACCCGGG	ACCCAAGCCA	GCCCCTGCGC	CTGTTCCAGG	۴۰۰																								
۳ واریانت	CACCAGCTCC	TGGCCGGGTT	CGAGGACAAG	TCAGCCTATG	CGCTCTGCAC	GTTTGCACCT	AGCACCCGGG	ACCCAAGCCA	GCCCCTGCGC	CTGTTCCAGG																									
۴ واریانت	CACCAGCTCC	TGGCCGGGTT	CGAGGACAAG	TCAGCCTATG	CGCTCTGCAC	GTTTGCACCT	AGCACCCGGG	ACCCAAGCCA	GCCCCTGCGC	CTGTTCCAGG																									
پروتئین	H	Q	L	L	A	G	F	E	D	K	S	A	Y	A	L	C	T	F	A	L	S	T	G	D	P	S	Q	P	U	R	L	F	R	۱۳۳	
۱ واریانت	GCCGACCTC	GGGCGGATC	GTGGCACCCA	GAGGCTGCCA	GGACTTTGGC	TGGGACCCCT	GCTTTCAGCC	TGATGGATAT	GAGCAGACGT	ACGCAGAGAT	۵۰۰																								
۳ واریانت	GCCGACCTC	G-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GT	ACGCAGAGAT																									
۴ واریانت	GCCGACCTC	GGGCGGATC	GTGGCACCCA	GAGGCTGCCA	GGACTTTGGC	TGGGACCCCT	GCTTTCAGCC	TGATGGATAT	GAGCAGACGT	ACGCAGAGAT																									
پروتئین	G	R	T	S	G	R	I	V	A	P	R	G	C	Q	D	F	G	W	D	P	C	F	Q	P	D	G	Y	E	Q	T	Y	A	E	H	۱۶۶
۱ واریانت	GCCTAAGGCG	GAGAAGACG	CTGTCTCCCA	TGGCTTCCGG	GCCCTGCTGG	AGCTGCAGGA	GTACTTTGGC	AGTTTGGCAG	CTTGA	۵۸۵																									
۳ واریانت	GCCTAAGGCG	GAGAAGACG	CTGTCTCCCA	TGGCTTCCGG	GCCCTGCTGG	AGCTGCAGGA	GTACTTTGGC	AGTTTGGCAG	CTTGA																										
۴ واریانت	GCCTAAGGCG	GAGAAGACG	CTGTCTCCCA	TGGCTTCCGG	GCCCTGCTGG	AGCTGCAGGA	GTACTTTGGC	AGTTTGGCAG	CTTGA																										
پروتئین	P	K	A	E	K	N	A	V	S	H	R	F	R	A	L	L	E	L	Q	E	Y	F	G	S	L	A	A	&						۱۹۴	

شکل ۶ هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی واریانت‌های ۳ و ۴ جدا شده از نمونه‌های خون مورد مطالعه با واریانت اصلی ۱. قسمت نقطه‌چین بیانگر بخش حذف شده در توالی‌های cDNA واریانت ۳ و ۴ است.

افراد بیمار به میزان کمتری و با تنوع بیشتری دیده می‌شود. آنالیزهای آماری با استفاده از آزمون من‌ویتنی نشان می‌دهد که میانگین بیان این ژن در افراد بیمار در مقایسه با افراد کنترل و سالم به میزان قابل توجهی ($P \leq 0/05$) پایین‌تر است.

در مطالعات اخیر نشان داده شده که دو واریانت جدید mRNA علاوه بر mRNA اصلی در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) وجود دارد؛ اما در این مطالعه دو واریته جدید شناسایی و جداسازی شد که یکی از این واریانت‌ها (V4) دارای حذفی به طول ۱۲۳ نوکلئوتید است. واریانت دیگر (V3) نیز حذفی به طول ۷۷ نوکلئوتید دارد. بررسی توالی اسیدآمینه‌ای این دو واریانت نشان داد که در واریانت نوع ۳، حذف ۷ اگزون باعث تغییر چارچوب خواندن و ایجاد یک کدون پایان می‌شود و پروتئینی کوتاه شده ایجاد می‌کند. حذف ۲ و ۳ در واریانت نوع ۴ موجب تغییر چارچوب خواندن نمی‌شود و در صورت ترجمه تنها پروتئینی ایجاد می‌کند که ۲۰ اسیدآمینه از نواحی ابتدایی پروتئین آن حذف شده است. بررسی اطلاعات موجود در بانک ژن نشان داد که بیش از ۴۰ پروتئین و توالی ژنی مشهور در بانک ژنی وجود دارد که با hITPase شباهت دارند و ارتولوگ آن در تمامی موجودات اعم از پروکاریوت و یوکاریوت‌ها شناسایی شده است. تمامی این پروتئین‌ها حدود ۲۰۰ اسیدآمینه طول دارند و ساختار دوم نسبتاً مشابهی دارند و همگی جزء خانواده ژن *Ham1* محسوب می‌شوند [۱۰-۱۳]. هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه‌ای این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که جایگاه‌های اتصال به سوستر در این پروتئین‌ها در طول تکامل از حفظ شدگی بالایی برخوردارند. مطالعات کریستالوگرافی اسیدآمینه‌های کلیدی شامل *Arg178*, *His177*, *Lys172*, *Asn16*, *Glu27* و *Lys19* که در اتصال سوستر و فعالیت کاتالیتیک آنزیم hITPase نقش دارند را به‌عنوان اسیدآمینه‌های ضروری برای فعالیت آنزیم معرفی کرده است. همچنین بررسی‌ها نشان داده است که آنزیم در حضور یون منیزیم دارای فعالیت بهینه بوده و محل اتصال یون منیزیم به آنزیم، اسیدآمینه *Glu44* است [۲۴]. نتایج بررسی پیشگویی‌های توالی‌های

اسیدآمینه‌ای یکی از دو واریانت یافت شده، بیانگر آن است که اگزون ۲ و ۳ حذف شده در آن اسیدآمینه کلیدی *Glu44* را در بر می‌گیرد که با توجه به نقش این یون در فعالیت بهینه آنزیم به نظر می‌رسد در صورت ترجمه این واریانت پروتئینی ایجاد می‌شود که فاقد فعالیت پیروفسفاتازی باشد.

بررسی توالی‌های اسیدآمینه‌ای واریانت سوم نشان داد که حذف اگزون ۷ در واریانت نوع ۳ باعث حذف اسیدآمینه‌های کلیدی *Asp152*, *Arg178*, *His177* می‌شود که برای اتصال سوستر (ITP) به جایگاه فعال آنزیم ضروری است. با توجه به اطلاعات موجود در مورد ساختمان و مکانیسم عمل آنزیم *ITPase*، می‌توان پیش‌بینی کرد که در صورت ترجمه، فعالیت آنزیم در نمونه‌های دارای واریانت نوع ۳ با توجه به حذف اسیدهای آمینه ضروری برای اتصال به سوستر کاهش می‌یابد. بررسی‌ها نشان داده است که ژن الحاقی *BCR-ABL* که ناشی از جابه‌جایی کروموزوم ۹ و ۲۲ در سلول‌های CML است، *ROS* زیادی تولید می‌کند که منجر به افزایش شکست‌های دورشته‌ای می‌شود و می‌تواند به‌نوبه خود باعث ناپایداری ژنتیکی بیشتر در سلول‌های دارای این جابه‌جایی کروموزومی شود [۲۲]. بنابراین انتظار بر این است که با پیشرفت بیماری CML میزان تولید *ROS* در سلول‌های دارای جابه‌جایی فیلادلفیا بیشتر از میزان طبیعی شود. واکنش رادیکال‌های آزاد اکسیژن با *NO*، مشتقات *RNS* خطرناک دیگری را تولید می‌کند که از عوامل آسیب‌رسان به *DNA* و مخزن نوکلئوتیدی است. یکی از انواع مهم این آسیب‌ها، دامیناسیون نوکلئوتیدها در سطح مخزن نوکلئوتیدی است [۵]. بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش میزان *ROS* در سلول‌های سرطانی CML باعث افزایش دامیناسیون اکسیداتیو بازهای پورینی در سطح مخزن نوکلئوتیدی نیز شود. مشخص شده است که این نوکلئوتیدهای تغییر یافته می‌توانند در ساختار *DNA* و *RNA* توسط پلیمرها وارد شوند و با توجه به توانایی تشکیل جفت‌بازهای غیراستاندارد با دیگر بازها می‌توانند تغییر اطلاعات ژنتیکی را در پی داشته باشند و زمینه‌ساز افزایش جهش‌ها و ناپایداری در ژنوم شوند [۶-۸]. با

ناهنجاری کروموزومی مانند CML، می‌تواند استعداد این افراد را برای کسب ناهنجاری‌ها و ناپایداری ژنتیکی بیشتر افزایش دهد. از طرفی وجود واریانت‌هایی که می‌توانند پروتئین‌هایی با فعالیت آنزیمی کاهش یافته‌ای را کد کنند نیز در میان افراد بیمار مشاهده شد که به نظر می‌رسد در صورت ترجمه احتمالی واریانت‌ها می‌تواند علاوه بر کاهش بیان در سطح mRNA، عامل فزاینده‌تری برای کاهش فعالیت این آنزیم در سطح پروتئینی در بیماران و افزایش ناپایداری ژنتیکی در آن‌ها باشد. بنابراین کاهش بیان ژن *ITPA* در این بیماران دارای اهمیت است و می‌تواند هم به‌عنوان عامل مستعدکننده و زمینه‌ساز بیماری‌های لوسمی یا عاملی در راستای افزایش ناپایداری‌های ژنتیکی در سلول‌های سرطانی CML در نظر گرفته شود و هم شاید بتواند توضیح دهنده پاسخ متفاوت افراد به درمان‌های موجود و همچنین سرعت پیشرفت بیماری باشد. تاکنون گزارشی از میزان بیان ژن *ITPA* در سرطان CML ارائه نشده است و این گزارش می‌تواند بیانگر نقش کلیدی یکی از ژن‌های درگیر در سیستم‌های ترمیم اطلاعات ژنتیکی سلول‌ها در بیماری‌زایی سرطان و ایجاد ناپایداری ژنتیکی آن‌ها باشد. تأیید این فرضیه نیازمند انجام آزمایش‌های تکمیلی در تعداد بیشتری از افراد و نمونه‌هایی از سایر سرطان‌ها خواهد بود.

۵- تشکر و قدردانی

از کلیه بیماران که نمونه‌های خون آن‌ها کلید انجام این پروژه بود، صمیمانه قدردانی می‌شود، همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که زمینه انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

توجه به نقش ژن *ITPA* در محافظت سلول‌ها از تأثیر نوکلئوتیدهای پورینی دامینه و توانایی جهش‌زایی این نوکلئوتیدها، کاهش بیان ژن *ITPA* می‌تواند باعث کاهش اثر محافظتی محصول این ژن در حذف نوکلئوتیدهای پورینی دامینه شده و در نهایت باعث افزایش سرعت وقوع جهش در ژنوم سلول‌ها شود، که این امر می‌تواند نکته‌ای تسریع‌کننده در راستای افزایش سرعت پیشرفت بیماری تلقی شود.

بررسی‌ها نشان داده است که به‌واسطه اختلال در عملکرد ژن *ITPA* فراوانی نوکلئوتیدهای غیرعادی دامینه *dITP*، *dXTP* در سلول‌ها افزایش می‌یابد و با شدت یکسانی مشابه با نوکلئوتیدهای عادی توسط پلیمرازها به ساختمان RNA، DNA وارد می‌شوند. وارد شدن اینوزین به ساختمان mRNA علاوه بر تغییر قابلیت ترجمه شدن روی ساختمان و سرعت تخریب آن نیز تأثیر جدی دارد. داکسی ریبونوکلئوتید *dITP* به‌عنوان یک آنالوگ *dGTP* عمل می‌کند و در DNA مقابل سیتوزین با کارایی حدود ۵۰ درصد قرار می‌گیرد. هر چند که هیپوگزانتین DNA گلیکوزیلاز می‌تواند *dIMP* را از DNA حذف کند [۲۵، ۲۶]، شواهد نشان می‌دهد که این آنزیم تنها هیپوگزانتین را از جفت‌باز I-T با کارایی بالا برمی‌دارد، در حالی که حذف آن از جفت‌باز I-C، ۱۵ تا ۲۰ برابر آهسته‌تر انجام می‌شود [۲۷]. به‌علت پایداری نسبی یک جفت‌باز I-C اینوزین می‌تواند تا دور بعدی همانندسازی باقی بماند و بنابراین خطر جهش‌زایی مستقیم را افزایش دهد و منجر به جهش از نوع AT به GC شود. مطالعات در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) نشان داده است که حضور *dITP* در مخلوط واکنش همانندسازی می‌تواند فراوانی بالای جهش را القاء کند [۲۶]. در مجموع با توجه به آثار احتمالی زیان‌بار اختلال در عملکرد ژن *ITPA* به‌نظر می‌رسد که کاهش بیان ژن *ITPA* در بیماران دارای

۶- منابع

- [1] Friedberg CE, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. 2nd edition, Washington DC, ASM Press, 2006; p: 9-35.
- [2] Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. Diseases-causing mutations in the human genome. Eur J Pediatr 2000; 159 Suppl 3: S173-8.

- [3] Kane JM, Shears LL, Hierholzer C, Ambs S, Billiar TR, Posner MC. Chronic hepatitis C virus infection in humans: induction of hepatic nitric oxide synthase and proposed mechanisms for carcinogenesis. *J Surg Res* 1997; 69(2): 321-4.
- [4] Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3(10): 713-20.
- [5] Shapiro R, Pohl SH; The reaction of ribonucleosides with nitrous acid. Side products and kinetics. *Biochemistry* 1968; 7(1): 448-55.
- [6] Kow YW. Repair of deaminated bases in DNA. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(7): 886-93.
- [7] Toyokuni S, Mori T, Dizdaroglu M. DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int J Cancer* 1994; 57(1):123-8.
- [8] Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Furuichi M, Sakumi K. The defense mechanisms in mammalian cells against oxidative damage in nucleic acids and their involvement in suppression of mutagenesis and cell death. *Free Radic Res* 2004; 38(5): 423-9.
- [9] Lin S, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, Wu C, Liu W, Yuan Y, Tang R, Xie Y, Mao Y. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the ITPA gene. *J Biol Chem* 2001; 276(22): 18695-701.
- [10] Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, Thein SL, Ansari A, Sanderson J, De Abreu RA, Simmonds HA, Duley JA. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet* 2002; 111(4-5): 360-7.
- [11] Chung JH, Back JH, Park YI, Han YS. Biochemical characterization of a novel hypoxanthin/xanthin dNTP pyrophosphatase from *Methanococcus jannaschii*. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(14): 3099-107.
- [12] Zheng J, Singh VK, Jia Z. Identification of an ITPase/XTPase in *Escherichia coli* by structural and biochemical analysis. *Structure* 2005; 13(10): 1511-20.
- [13] Noskov VN, Staak K, Shcherbakova PV, Kozmin SG, Negishi K, Ono BC, Hayatsu H, Pavlov YI. HAM1, the gene controlling 6-N-hydroxylaminopurine sensitivity and mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1996; 12(1): 17-29.
- [14] Auclair C, Gouyette A, Levy A, Emerit I. Clastogenic inosine nucleotide as components of the chromosome breakage factor in scleroderma patients. *Arch Biochem Biophys* 1990; 278(1): 238-44.
- [15] Chung JH, Park HY, Lee JH, Jang Y. Identification of the dITP- and XTP-hydrolyzing protein from *Escherichia coli*. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35(4): 403-8.
- [16] Yao M, Kow YW. Further characterization of *Escherichia coli* endonuclease V. Mechanism of recognition for deoxyinosine, deoxyuridine, and base mismatches in DNA. *J Biol Chem* 1997; 272(49): 30774-9.
- [17] Poppe B, Vandesompele J, Schoch C, Lindvall C, Mrozek K, Bloomfield CD, Beverloo HB, Michaux L, Dastugue N, Herens C, Yigit N, De Paepe A, Hagemeijer A, Speleman F. Expression analyses identify

- MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood* 2004; 103(1): 229–35.
- [18] Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IeM, Vogelstein B, Lengauer C. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(25): 16226–31.
- [19] Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(3): 164-72.
- [20] Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340(17): 1330-40.
- [21] Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, McCredie KB, Freireich EJ. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1988; 61(7): 1441-6.
- [22] Rassool FV. Genetic rearrangements beget genomic instability. *Blood* 2004; 104(12): 3424-5.
- [23] Cross NC, Melo JV, Feng L, Goldman JM. An optimized multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. *Luekemia* 1994; 8(1): 186-9.
- [24] Stenmark P, Kursula P, Flodin S, Gräslund S, Landry R, Nordlund P, Schüler H. Crystal Structure of human inosine triphosphatase. Substrate binding and implication of inosine triphosphatase deficiency mutation P32T. *J Biol Chem* 2007; 282(5): 3182–7.
- [25] Sapparbaev M, Laval J. Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(13): 5873–7.
- [26] Kuipers OP. Random mutagenesis by using mixtures of dNTP and dITP in PCR. *Methods Mol Biol* 1996; 57: 351–6.
- [27] Dianov G, Lindahl T. Preferential recognition of I.T base-pairs in the initiation of excision-repair by hypoxanthine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(14): 3829–33.

