تقييم اضطرابات الجين الواحد على مستوى الخلية الواحدة، لأمراض فقر دم حوض البحر الابيض المتوسط

وفقر الدم المنجلي

وسام علي وصفي الوزني

اسم المشرفين على الرسالة
أ.د جلال الدين أعظم خان
أ.د. عادل محمد أبو زنادة

المستخلص

تعد البحوث المتعلقة بالدراسات وحيدة الخلية ذات أهمية كبيرة، كما وتشهد هذه البحوث نموا مستمرا في مجال الفحوصات البيولوجية الجزيئية وايضا في المجالات التشخيصية.تعتبر تقنية الكشف عن الطفرات الوراثية من الخلايا المفردة تقنية بالغة الدقة والحساسية ولديها تطبيقات متنوعة في مجال الأبحاث الطبية إلى جانب إجراءات التشخيص السريري. تهدف هذه الدراسة بشكل اساسي لتطوير نوع معين من الفحوصات المخبرية ذو كفاءة عالية ولديه القدرة على الكشف عن الطفرات الوراثية في الخلية الاحادية المفردة، والذي من الممكن استخدامه كخطوة اولية اساسية لأجراء هذا النوع من التحاليل الدقيقة. كما انه تم فحص وتحليل انواع مختلفة من الخلايا من مصادر متنوعة باستخدام هذه التقنية، بما في ذلك الخلايا الليمفاوية، خلايا الشدق(باطن الخد)، الخلايا الليفية المستخرجة من الجلد وخلايا سرطان الدم من نوع K562 و من الخلايا الجنينة المستخلصة من اجنة الانسان. تمت دراسة كل نوع من هذه الخلايا على حدة باستخدام عدة طرق واساليب للفحص المخبري (بروتكولات) وذلك لايجاد واستنباط تقنيات ذات نتائج عالية الدقة والفعالية.

سعيا منا لتحقيق هذا الهدف قمنا بعمل دراسة وراثية مستفيضة للعامل الوراثي المسؤول عن انتاج خضاب الدم (الهيموجلوبين) كنموذج اولي للدراسة و توثيق الطفرات الوراثية فيه والمسببة لمرضي فقر دم البحر المتوسط (بيتا ثلاسيميا) وفقر الدم المنجلي. وقد وضعت خطة منهجية لالية البحث بدأ من تحديد مواقع الطفرات الوراثية الاكثر شيوعا في المنطقة الغربية من المملكة العربية السعودية وذلك باستخدام تقنية تسلسل الحمض النووي. تم اختيارالعامل الوراثي المسؤول عن انتاج خضاب الدم(الهيموجلوبين) كنموذج اولي للدراسة، بناءا على حقيقة ارتفاع معدلات الاصابة بامراض الدم الوراثية (مرض فقر دم البحر المتوسط وفقر الدم المنجلي) في المملكة العربية السعودية، وطبيعة الامراض الناجمة عن هذه الطفرات الوراثية والتي تعد من الامراض الوراثية احادية الجين التي يمكن تحديد الطفره الوراثية المسببة لها بسهولة ودقة متناهية.

وقد قمنا بتصميم وتطوير نوع معين من الفحوصات المخبرية الوراثية وذلك للتحقق والكشف السريع عن وجود اي طفرات وراثية و ذلك باستخدام تقنية التنميط الجيني(TaqMan® SNP genotyping assay) والتي تعتمد اساسا على البلمرة الكمية (qPCR) للحمض النووي المنقوص الاكسجين(DNA). كما وقد تم فحص ٢٥٧ مريضا من مراجعين وحدة نقل الدم وعيادة امراض الدم للاطفال في مستشفى الملك عبد العزيز الجامعي، و تم تحديد الطفرات الوراثية الاكثر شيوعا في العامل الوراثي المسبب لانتاج الهيموجلوبين والتي تؤدي الى الاصابة بمرض فقر دم البحر المتوسط ومرض فقر الدم المنجلي. اعتمادا على نتائج الفحوصات ا المخبرية لدينا قمنا بتحديد الطفرة الوراثية من نوع rs33915217 كواحدة من اكثر الطفرات الوراثية شيوعا في مجتمع الدراسة بنسبة تكرار ٢٦%. وأظهرت النتائج ان تقنية التنميط الجيني (TaqMan® SNP genotyping assay) هي، طريقة سريعة دقيقة وفعالة من حيث التكلفة لفحص الأولي مرض فقر دم البحر المتوسط والتي من شأنها أن تقلل الحاجة إلى التسلسل المباشر لهذا المورث المسؤول عن انتاج الهيموجلوبين. سعيا لتطبيق فحوصات التنميط الجيني TaqMan® SNP genotyping

assayعلى مستوى خلية واحدة، تم اختبار ستة ‘طرق للفحص الوراثي للخلية الواحدة باستخدام عدة انواع من الخلايا من مصادر مختلفة . وقد تم استخلاص تقنية تعد هي الانسب لتحليل الحمض النووي المنقوص الاكسجين(DNA) في الخلية المفردة ، الا وهو الجمع بين استخدام طريقة التحليل القلوي (ALB) مع dithiothreitol (DTT) كمادة مضافة. وقد تبين لنا ان الحمض النووي المعزول بهذه الطريقة كان من الممكن استخدامه التنميط الجيني TaqMan® SNP genotyping assay فضلا عن تقنية مضاعفة الجينوم الكلي (WGA). كما انه من الضروري توضيح اننا قد قمنا بعزل الخلايا الجنينية من اجنة الانسان وتحليلها باستخدام طريقة التحليل المشار اليها مسبقا ومن ثم مضاعفة الحمض النووي المستخلص من هذه الاخلايا باستخدام تقنية التضاعف الكلي للماده الوراثيـــة.

(WGA). كما انه قد جرى استخدام الحمض النووي المستخلص من الخلايا الجنينية و الذي تمت مضاعفته مسبقا في تقنية التهجين المقارن وذلك لفحص اي اختلالات في الصبغيات وكذلك في التنميط الجيني.

وفي الختام، فإن نتائج هذه الدراسة تضع الأسس الاولية لأبحاث الخلايا المفردة في جامعة الملك عبد العزيز، ونقل هذه التقنية لدينا. فضلا عن ان الابحاث المستقبلية في هذا المجال ستكون قادره على الاستفادة من هذه التجارب والفحوصات التي طورت في هذه الدراسة ،وذلك في محاولة لمعالجة المعضلات البحثية المتعلقة بالتنوع الخلوي و التزيق الوراثي.

Evaluation of Single Gene Disorders at the Single Cell level; Application to β thalassemia and Sickle Cell Disease

By

Wissam Ali Wasfi Alwazani

Supervised By
Prof. Dr. Jalaludden Azam.Awlia
Prof. Dr. Adel Mohammad Abuzenadah

Abstract

Single cell research is an exciting and rapidly expanding field in the molecular biology research and diagnostics. Sensitive, rapid and accurate mutation detection from one single cell has a diverse application in medical research along with clinical diagnostic procedures. Our main objective in this study is to develop a single cell analysis protocol can be utilized in mutation detection at the level of individual cells and to demonstrate whether this protocol can be used as a universal step prior to molecular analysis of a single cell. Cells from different sources, including lymphocytes, buccal cell, skin fibroblast, leukemia cell line K562 and human blastomeres were tested. Several lysis buffers and protocols were used to examine each type of cells aimed to conclude the best accurate and sensitive result. In order to achieve our aim, we deployed the detection of HBB mutations in β-thalassemia as a model.

Aimed to perform this goal, an experimental plan was laid out, that begins with mapping the mutational landscape of the HBB gene in sickle cell disease and β thalassemia samples from the western region of the kingdom of Saudi Arabia. The decision to choose HBB as model is driven by the fact that there is a high prevalence of Hemoglobinopathies (blood disorders caused primarily by HBB mutations) in Saudi Arabia. as well as the diseases caused by HBB mutations are monogenic diseases that can be easily determined by simple method in a short time. Sanger sequencing of the HBB gene from genomic DNA was first utilized to identify the most common mutations and setup a validation tool for the qPCR approach we adopted as the primary assay for

mutation detection. Custom-made TaqMan® SNP genotyping assays were designed and validated for the rapid detection of IVS-I-1 (G>A), IVS-I-5 (G>C), codon 39 (C>T), and IVS-I-110 (G>A) mutations in 257 transfusion-dependent β-thalassemia patients and patients attending pediatric hematology clinic in King Abdulaziz University Hospital(KAUH). We illustrate that IVS-I-5 (rs33915217) is the most common single nucleotide variant in our cohort with the variant allele constituted 26% of the total alleles investigated. The results showed that TaqMan® SNP genotyping assays are rapid, accurate and cost-effective method for the initial screening of β-thalassemia cases which will minimize the need for direct sequencing of the HBB gene. In order to apply the SNP genotyping assays at the single cell level, six different single cell preparations and sources were tested. The most suitable single cell protocol was found to be the combined use of the alkaline lysis buffer (ALB) with dithiothreitol (DTT) as an additive. DNA isolated in this manner was demonstrated to be useable in TaqMan® SNP genotyping as well as whole-genome amplification (WGA). A demonstration of the application of this single cell isolation and analysis protocol on human blastomeres, where DNA isolated was subjected to WGA, followed by array comparative genomic hybridization (a-CGH) to test for aneuploidy as well as SNP genotyping was illustrated.

In conclusion, the outcomes of this study will lay the foundations for single cell research at King Abdulaziz University and transfer this important technology to our locality. Future work in this area will be able to benefit from the experiences and protocols refined in this study to attempt to tackle difficult scientific questions related to cellular heterogeneity and mosaicism.