مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۷۰/هفته سوم اسفند ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۰

مروری بر اسید نوکلئیک پپتیدی: ساختار، خصوصیات و کاربردها

عارف فرخی فرد[۱]، دکتر مجید خیراللهی[۲]

مقاله مروری

چکیده

چندین دهه است که موضوع آنالوگ‌های اسیدهای نوکلئیک توجه برخی دانشمندان علم بیولوژی را به خود معطوف نموده است. برخی از این مولکول‌های صناعی به عنوان ابزارهای قدرتمندی در بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی، مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. چهار دسته‌ی عمده‌ی این آنالوگ‌های صناعی عبارت از زنونوکلئیک اسید (XNA یا Xeno nucleic acid)، مورفولینو (Morpholino) و اسید نوکلئیک قفل شده (LNA یا Locked nucleic acid) و نوکلئیک اسید پپتیدی (PNA یاPeptide nucleic acid) که دسته‌ی چهارم این آنالوگ‌ها بود و در این میان، جایگاه برجسته‌ای دارد. PNA، پلیمری است از واحدهای ان-آمینو اتیل گلایسین که به هر یک از این واحدها بازهای پورین/ پیریمیدین اتصال یافته است. این پلیمر، خصوصیات پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک را توأمان دارد و قادر است به طور اختصاصی به نوکلئیک اسیدهای طبیعی یا PNAهای دیگر، هیبرید شود که این ویژگی و دیگر خصوصیات ویژه‌ی این مولکول باعث به کارگیری آن در بسیاری از روش‌های بیولوژی مولکولی در زمینه‌ی تشخیص و درمان بیماری‌ها شده است. در این مقاله، ساختار، خصوصیات بیوشیمیایی و کاربردهای زیست پزشکی PNA شرح داده می‌شود.

واژگان کلیدی: اسید نوکلئیک پپتیدی، ساختار، خصوصیات بیوشیمیایی، کاربرد زیست پزشکی

ارجاع: فرخی عارف، خیراللهی مجید. **مروری بر اسید نوکلئیک پپتیدی: ساختار، خصوصیات و کاربردها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۷۰): ۲۴۰۲-۲۳۹۰

مقدمه

چندین دهه است که موضوع آنالوگ‌های اسیدهای نوکلئیک توجه برخی دانشمندان علم بیولوژی را به خود معطوف نموده و در حال حاضر به علت پتانسیل بالای این مولکول‌های صناعی، به عنوان ابزارهای قدرتمندی در بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی، این زمینه از علم مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است.

چهار دسته‌ی عمده‌ی این آنالوگ‌های صناعی عبارت از زنونوکلئیک اسید (Xenonucleic acid یا XNA) که خود دارای زیر مجموعه‌هایی چون GNA یا Glycol nucleic acid، TNA یا Threose nucleic acid و HNA یا hexitol nucleic acid می‌باشد)، مورفولینو (Morpholino) و اسید نوکلئیک قفل شده (LAN) با ساختاری مشابه RNA می‌باشد؛ با این تفاوت که یک پل متیلنی، کربن شماره‌ی ۲ و ۴ قند ریبوز را به هم متصل کرده است. مولکول PNA یا نوکلئیک اسید پپتیدی، دسته‌ی چهارم این آنالوگ‌ها است که در این میان جایگاه برجسته‌ای دارد و یکی از توانمندترین مولکول‌های صناعی است که رفتار و خصوصیات نوکلئیک اسیدهای طبیعی را تقلید

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه بیولوژی مولکولی و علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه بیولوژی مولکولی و علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیراللهی
Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

می‌کند. در واقع، PNA پلیمری است از واحدهای ان-آمینو اتیل گلایسین که به هریک از این واحدها بازهای پورین/ پیریمیدین از طریق یک رابط متیل کربونیل اتصال یافته است.

این پلیمر که در سال ۱۹۹۱ توسط Nielsen و همکاران ساخته شد، خصوصیات پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک را توأمان دارد و قادر است به طور اختصاصی به نوکلئیک اسیدهای طبیعی یا PNAهای دیگر، هیبرید شود که این ویژگی و دیگر خصوصیات ویژه‌ی این مولکول باعث به کارگیری آن در بسیاری از روش‌های بیولوژی مولکولی در زمینه‌ی تشخیص و درمان بیماری‌ها شده است (۲-۱).

تاریخچه

تلاش‌هایی که در دهه‌ی ۱۹۸۰ میلادی توسط تیم تحقیقاتی به سرپرستی Nielsen و در آزمایشگاه شیمی آلی پروفسور Ole Buchardt در کوپنهاگ دانمارک صورت گرفت، در نهایت منجر به تولد مولکول PNA در سال ۱۹۹۱ گردید. در حقیقت افتخار اختراع PNA متعلق به Nielsen، Egholm، Berg و Buchardt می‌باشد (۱). PNA در سال ۱۹۹۳ تجاری‌سازی شد و هم اکنون شرکت پانازن واقع در کره‌ی جنوبی، در صدر شرکت‌های تولید کننده‌ی محصولات مبتنی بر PNA می‌باشد (۱).

ساختار مولکول PNA

مانند اسیدهای نوکلئیک طبیعی، PNA نیز پلیمری از واحدهای تکرار شونده است، اما بر خلاف نوکلئیک اسیدهای طبیعی که از منومرهای نوکلئوتیدی تشکیل شده‌اند، منومرهای PNA، واحدهایی تحت عنوان ان-۲ آمینو اتیل گلایسین می‌باشد که به هریک از این واحدها بازهای پورین یا پیریمیدین طبیعی متصل شده است. اتصال بازها از طریق یک لینکر متیل کربونیل صورت می‌پذیرد. این لینکر، خود از یک پل متیلنی ($-CH_2-$) و یک گروه کربونیل($-(C=O)-$) تشکیل شده است. اتصال هر کدام از منومرهای PNA به منومر دیگر نیز با پیوند آمیدی صورت می‌گیرد، که این مسأله باعث شباهت بسیار زیاد PNA به پپتیدها شده است؛ چرا که ستون فقرات پپتیدها نیز پلی آمیدی می‌باشد و در واقع، پیوند پپتیدی نوعی پیوند آمیدی محسوب می‌شود. بنابراین PNA از نظر ساختمانی شبیه پپتیدها است، اما از نظر رفتاری بیشتر شبیه اسیدهای نوکلئیک است. همچون پپتیدها PNA هم یک انتهای آمینی و یک انتهای کربوکسیلی دارد که آن را طبق همان قاعده‌ی پپتیدها از راست به چپ یعنی از انتهای N به انتهای C نشان می‌دهند. مولکول PNA تا کنون در طبیعت یافت نشده است اما N-۲ آمینو اتیل گلایسین (N-2-aminoethylglycine یا AEG) توسط سیانو باکتری‌ها هم تولید می‌شود (۲) (شکل ۱).

فرایند سنتز PNA

سنتز PNA همانند روش‌های به کار رفته برای ساخت پپتیدهای مصنوعی (آن دسته پپتیدهایی که به دلایلی مانند دارا بودن آمینو اسیدهای فرم D، قابلیت تولید توسط سلول‌ها را ندارند)، انجام می‌گیرد. روش مرسوم سنتز PNA، روش استاندارد سنتز فاز جامد (SPPS یا Solid phase peptide synthesis) می‌باشد که متشکل از چرخه‌های مکرر «جفت شدن- شستشو- حفاظت‌زدایی- شستشو» می‌باشد و در آن،

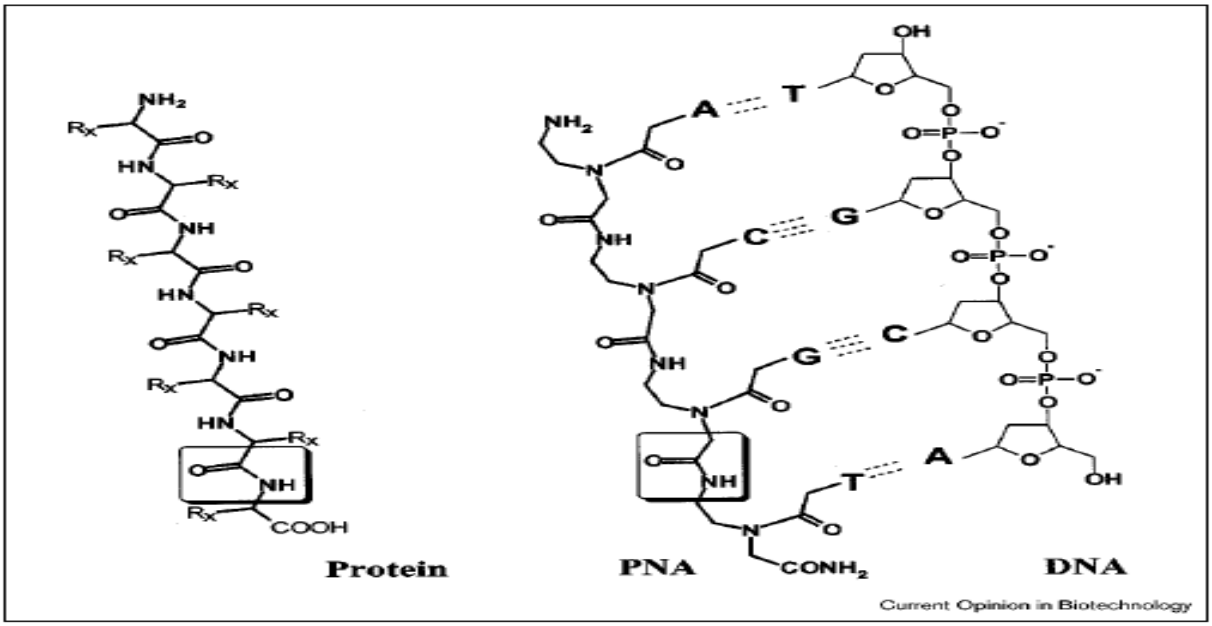
هر واحد ازطریق گروه کربوکسیل خود به انتهای آمین واحد اتصال یافته‌ی قبلی متصل می‌شود و بنابراین، بر خلاف روش طبیعی ساخته شدن پپتیدها توسط ریبوزوم‌ها که جهت کلی آن از انتهای N به انتهای C است، انجام می‌پذیرد. روش SPPS (Solid-phase peptide synthesis) توسط Merrifield ابداع شد. برای اطلاع از جزییات این پروتکل، می‌توان به مقالات مربوط مراجعه نمود (۴).

تغییرات و اصلاحات

بسته به کاربرد PNA، ممکن است نیاز به اعمال اصلاحات خاصی باشد، برای مثال ممکن است نیاز باشد آن را با بیوتین یا فلوروفورها برچسب زد. همچنین برای افزایش حلالیت آن ممکن است نیاز به افزودن آمینو اسیدهای باردار باشد یا لازم باشد PNAهای کایمر (کنجوگه شده با DNA یا پپتید) ساخته شود. به طور کلی، در این گونه موارد یا از منومرهای تغیر یافته در حین روند سنتز استفاده می‌شود (مانند پرولین به جای گلایسین)، و یا این تغییرات، پس از سنتز اولیه صورت می‌گیرد؛ برای مثال، دو مولکول PNA را جهت ساخت Bis-PNA به هم متصل می‌نمایند.

انواع مولکول‌های PNA

- *نوکلئیک اسیدهای پپتیدی تغییر نیافته یا ان-۲ آمینو اتیل گلایسین* که همان PNA ساخته شده‌ی اولیه است و هیچ گونه تغییراتی بر آن اعمال نشده است.
- *هترو الیگومرهای PNA* که در برخی از واحدهای آن به جای آمینو اتیل گلایسین، از آمینو اسیدهای دیگر (مانند آمینو پرولین) استفاده شده است (۶-۵).
- Bis-PNA که از دو عدد PNA تشکیل شده است که توسط یک لینکر انعطاف پذیر از جنس‌های گوناگون (مانند لینکرهای پلی اتیلن گلیکولی) به هم متصل شده‌اند (۹-۷).



شکل ۱. مقایسه‌ی ساختار PNA با DNA و پپتیدها و نحوه‌ی هیبرید شدن آن با DNA (۳)

Chimeric PNA که در آن PNA به مولکول‌های دیگری همچون DNA یا پپتیدها اتصال یافته است. این مولکول‌ها استفاده‌ی خاصی دارند، برای مثال، کنجوگاسیون PNA با DNA، جهت شناسایی کایمر به دست آمده توسط آنزیم‌های سلولی در روش‌های خاص تشخیصی، تحقیقاتی و یا روش‌های درمانی صورت می‌گیرد؛ در حالی که کایمر Peptide-PNA برای نفوذ پذیری این مولکول و بالا بردن میزان Cell delivery انجام می پذیرد.

خصوصیات ناشی از ساختار PNA

به واسطه‌ی ساختار منحصر به فردی که PNA دارد، این مولکول واجد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاصی است که در ادامه شرح داده می‌شود. ستون فقرات پلی آمیدی، غیر حلقوی و غیر کایرال PNA باعث شده است که هیچ دافعه‌ی الکترواستاتیکی میان دو رشته‌ی PNA یا میان هیبریدهای PNA و اهداف آن در هنگام دورگه شدن به وجود نیاید. این درست بر خلاف اسیدهای نوکلئیک طبیعی است که دافعه‌ی بین بارهای منفی گروه‌های فسفات دو رشته، باعث کاهش استحکام هیبرید می‌شود. این خصوصیت PNA نتایج مهمی در پی دارد. افزایش پایداری هیبریدهای PNA (که شاخص آن Tm می‌باشد) دیده می‌شود؛ برای مثال Tm یک دوپلکس ۶ واحدی DNA/DNA که یکی از رشته‌های آن Poly T و رشته‌ی دیگر Poly A است، برابر با ۱۰ °C می‌باشد، اما همین دوپلکس اگر از جنس PNA/DNA باشد، Tm آن برابر با ۳۱ °C خواهد بود که این دما استحکام سه برابری آن را نشان می‌دهد. دمای Tm میانگین یک PNAی ۱۰ واحدی و ۱۵ واحدی به ترتیب ۵۰ °C و ۷۰ است. دمای Tm دوپلکس‌های PNA/RNA اندکی بالاتر از دوپلکس‌های PNA/DNA با همان تعداد واحد است. برای مثال، Tm اندازه‌گیری شده برای دو رشته‌ای‌های ۱۵ واحدی از جنس RNA/DNA، DNA/DNA، PNA/DNA و PNA/RNA به ترتیب برابر با ۵۰ °C، ۵۴، ۶۹ و ۷۲ است.

نتیجه‌ی دیگری که ستون فقرات بدون بار PNA دارد، دو رگه شدن بدون وابستگی به قدرت یونی محیط است. مولکول‌های DNA دو رشته‌ای طبیعی، در محیط‌های با قدرت یونی بیشتر، اتصال محکم‌تری پیدا می‌کنند و هر اندازه قدرت یونی یا غلظت نمکی محیط کمتر شود، دو رشته سست‌تر می‌شوند و حتی ممکن است رشته‌ها از هم جدا گردند (پدیده‌ی ذوب یا واسرشتگی). اما در هیبریدهای PNA این اتفاق هرگز رخ نمی‌دهد. این خصوصیت PNA در بسیاری از تکنیک‌های بیوتکنولوژی یک مزیت به حساب می‌آید.

به علت ساختمان مصنوعی PNA، این مولکول به طور معمول توسط آنزیم‌های زیستی شناسایی نمی‌شود. این ویژگی پیامدهای مهمی دارد. اول این که رشته‌های PNA نمی‌توانند به عنوان سوبسترای DNA پلیمراز یعنی به عنوان پرایمر مورد استفاده قرار گیرند (که خود این مسأله، گاهی یک حسن به حساب می‌آید (برای مثال در Allele specific PCR). دوم این که نیمه‌ی عمر PNA در محیط‌های آزمایشگاهی بسیار بالاتر از همتایان طبیعی آن یعنی DNA و RNA می‌باشد. برای مثال نیمه‌ی عمر درون سلولی اغلب الیگو نوکلئوتیدهای DNA یا RNA تغییر نیافته یا کمتر است؛ اما همین زمان برای PNAهایی با طول مشابه، حداقل ۴۸ ساعت

می‌باشد. از طرفی، مولکول های PNA نسبت به گرما مقاومت دارند و بر خلاف DNA که در PHهای اسیدی دپورینه می‌شوند، به اسید مقاومند (هر چند در قلیا دچار بازآرایی می گردند). این ویژگی‌های بی‌نظیر PNA، هم ذخیره‌سازی و نگهداری طولانی مدت و خارج از یخچال محصولات بر پایه‌ی PNA را در آزمایشگاه مقدور ساخته است و هم آن را به گزینه‌ی مناسبی برای فن‌آوری آنتی سنس و آنتی ژن تبدیل کرده است.

PNA قدرت هیبریداسیون با اسیدهای نوکلئیک طبیعی و نیز با PNAهای دیگر را دارد (۱۰). این هیبریداسیون هم می‌تواند از طریق پیوندهای هیدروژنی Watson-Crick باشد (۱۱) و هم از طریق پیوندهای هیدروژنی خارج رشته‌ای هوگستین در شیار بزرگ DNA؛ که هر دوی این الگوهای اتصال، اختصاصی هستند و بنابراین، اتصال PNA به رشته‌ی مقابل خود به شیوه‌ای وابسته به توالی (Sequence dependent manner) است. بنابراین PNA می‌تواند هم به اسید نوکلئیک تک رشته‌ای و هم به DNA دو رشته‌ای متصل شود، پس مولکولی است که برای مقاصد مختلف بسیار انعطاف پذیر است. بر خلاف DNA، اتصال PNA هم می‌تواند موازی غیر همسو باشد و هم موازی همسو (انتهای N معادل انتهای ’5 مولکول DNA است).

مولکول PNA حساسیت بالایی به ناجوری باز یا بد جفت شدگی (Mismatch) دارد؛ به طوری که میزان کاهش Tm آن به ازای وجود هر باز ناجور در دوپلکس‌های دارای PNA، به مراتب بیشتر از دوپلکس‌های طبیعی است. برای مثال القای یک بد جفت شدگی در دوپلکس ۱۵ واحدی PNA/DNA، Tm را ۵ °C کاهش می‌دهد، اما در دو رشته‌ای DNA/DNA با همین طول، Tm فقط ۱ °C کاهش می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت که ویژگی و اختصاصیت هیبریداسیون مولکول‌های PNA در مقایسه با اسید نوکلئیک‌های طبیعی به مراتب بالاتر است که این ویژگی منجر به استفاده‌ی زیاد این مولکول در واکنش‌های تشخیصی هیبریداسیون گردیده است.

الگوهای هیبریداسیون PNA

- Duplex invasion که در آن رشته‌ی PNA به DNA دو رشته‌ای حمله می‌کند و یکی از رشته‌ها را کنار می‌زند. این نوع هیبریداسیون فقط با برخی از PNAهای هوموپورین دیده شده است.
- Double duplex invasion که توسط اتصال هوگستینی دو PNA مجزا با DNA دو رشته‌ای از خارج رشته‌ها حاصل می‌گردد و کمپلکس به دست آمده بسیار پایدارتر است؛ اما این شکل فقط توسط PNAهای دارای بازهای تغییر یافته (مانند جفت بازهای دی آمینوپورین–تیویوراسیل) حاصل می‌شود.
- Triplex یا ساختار مارپیچ سه رشته‌ای مرسوم که توسط PNAهای هومو پیریمیدین مانند جفت بازهای غنی از سایتوزین که به هدف خودشان بر روی DNA متصل می‌شوند، ایجاد می‌گردد.

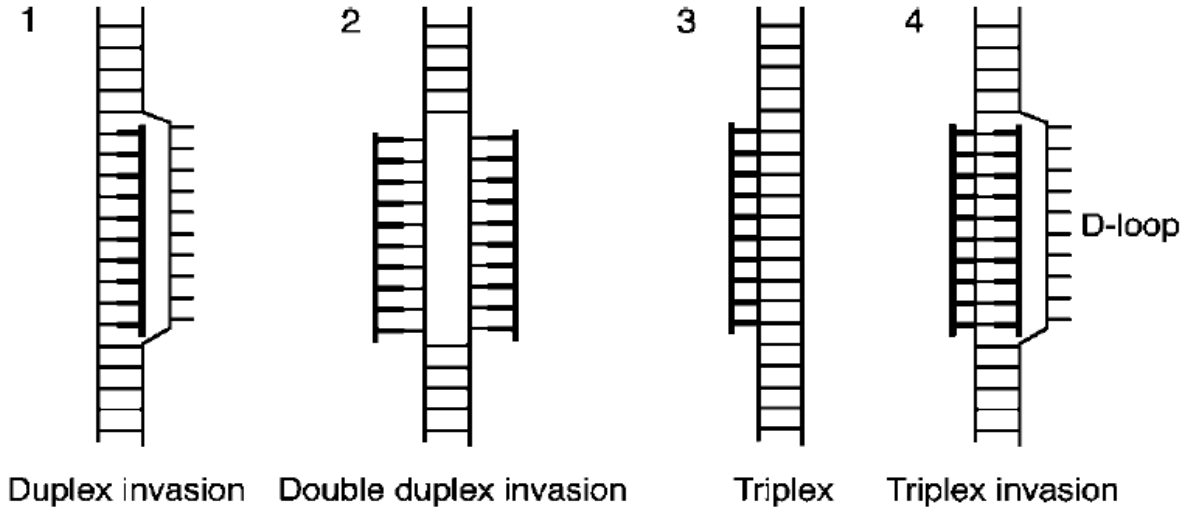
Triplex invasion (Double helix invasion) که ساختار پایداری است که حاصل تهاجم یک Bis-PNA به DNA دو رشته‌ای و کنار زدن یکی از رشته‌های DNA به شکل لوپ (لوپ P، D یا PD) می‌باشد. Tm این ساختار بسیار بالا است (برای مثال Tm یک Bis-PNAی۱۰ واحدی در حدود ۱۰۰ °C

مـی‌باشـد). ایـن پدیـده، کـاربردهـای خاصـی در بیوتکنولوژی پیدا کرده اسـت. ایـن سـاختار فقـط در غلظت پایین نمک صورت می‌گیرد (چرا کـه مسـتلزم باز شدن رشته‌ی DNA می‌باشد) (۱۳-۱۲)؛ امـا فـرم ایجاد شـده، در غلظـت‌هـای نمکـی بـالا هـم پایـدار خواهد بود (۱۴) (شکل ۲).

مولکول‌های PNA به طور معمول حلالیـت قابـل قبولی دارند (البته نه به اندازه‌ی DNA)، مگر این کـه الیگومرهـای PNA از ۱۲ واحـد تجـاوز نمایـد و یـا میزان G/C مولکول از ۶۰ درصد بالاتر رود. همچنـین برخی برچسب‌ها از قبیل فلورسـئین و بیـوتین باعـث کاهش میزان انحلال PNA می‌شود که ایـن مشـکل را می‌توان بـا افـزایش لینکرهـای اتـیلن گلیکـولی و یـا منومرهای بر پایه‌ی لایزین می‌توان بر طرف نمود.

بازده ورود به سلول (Cell delivery) مولکول‌هـای PNA، به نسبت ضعیف است که این مسأله اغلـب بـه علت خاصیت بدون بار آن می‌باشد. برای افزایش Cell delivery راهبردهای مختلفی را می‌تـوان اتخـاذ نمـود. اگر قرار باشد PNA به صورت دست نخورده و بـدون تغییر وارد سلول شود، می‌توان از روش‌هـایی همچـون شوک الکتریکی، ریز تزریق و یا افـزایش نفـوذ پـذیری غشای سلول‌ها (مانند استفاده از استرپتولایزین-O و یـا پرفورین‌ها در سلول‌های یوکاریوتی) استفاده نمود. این روش‌ها تنها کاربردهای تحقیقاتی دارند. اما اگر هـدف، بدن موجودات زنده همچون انسان باشـد، مـی‌تـوان از روش‌های زیر استفاده نمود:

- وارد کردن رزیدیوهای باردار همچون لایزین و آرژینین به مولکول‌های PNA (۱۶)
- استفاده از لیگاند جهت افزایش ورود به سلول، مانند استفاده از استروئیدها، آنتی بادی‌ها و لیگان‌هـای ریسپتور اختصاصی سلول
- کنجوگاسیون PNA به پپتیدهای نفوذ کننده بـه سلول (CPP یا Cell penetrating peptide)
- بسته‌بندی مولکول‌های PNA در لیپـوزوم‌هـا و ساختارهای مشابه
- استفاده از لیپیدهای کاتیونی (۲۲-۱۷).



شکل ۲. انواع الگوهای هیبریداسیون PNA (۱۵)

کاربردهای PNA

ساختار PNA به عنوان یک عامل آنتی ژن و آنتی سنس

مولکول PNA برای اولین بار در فن‌آوری آنتی ژن و آنتی سنس به کار گرفته شد. از نظر تئوری، الیگومرهای PNA به علت افینیتی بالا، اختصاصیت زیاد و پایداری بسیار زیاد در محیط‌های زنده و نیز اتصال اندک یا عدم اتصال به پروتئین‌های سرم، نامزد مناسبی برای این فن‌آوری‌ها محسوب می‌شوند. ساختار PNA در این تکنولوژی به چند طریق می‌تواند به کار گرفته شود و می‌تواند در جهت مهار رونویسی از یک ژن خاص مورد استفاده قرار گیرد که این به شکل تهاجم به رشته یا جابه‌جایی رشته انجام می‌شود. اگر PNA، علیه ناحیه‌ی پروموتری ژن هدف طراحی شود، با ایجاد کمپلکس پایدار PNA-DNA مانع از دسترسی پلیمراز به پروموتر می‌شود (۲۳). از طرفی، PNA را می‌توان علیه عناصر CIS به کار برد که در این صورت به عنوان یک رقیب برای عناصر Trans که همان عوامل رونویسی می‌باشند، عمل می‌کند و رونویسی انجام نمی‌شود.

همچنین کمپلکس‌های تشکیل شده با PNA که در نواحی پایین دست پروموتر قرار گرفته‌اند، موجب تولید رونوشت ناقص از ژن می‌شوند؛ چرا که RNA پلیمراز در نیمه‌های کار متوقف می‌شود (۲۸-۲۳). PNA را می‌توان در جهت القای رونویسی از ژن مورد نظر هم به کار بست، به این شکل که اتصال Bis-PNA کنجوگه شده با یک دومین فعال کننده‌ی رونویسی، می‌تواند باعث فراخوانی سایر عوامل رونویسی به ناحیه‌ی اتصال یافته شود و RNA پلیمراز را به آن محل جذب کند و رونویسی انجام بگیرد (۳۰-۲۹). حتی اگر این دومین فعال کننده هم موجود نباشد، PNA قادر است به عنوان یک پروموتر مصنوعی رونویسی را آغاز نماید و از نظر تئوری به عنوان یک تقلید کننده‌ی عامل رونویسی یا یک داروی فعال کننده‌ی ژن مورد استفاده قرار گیرد (۲۹).

مولکول PNA را می‌توان پس از مرحله‌ی رونویسی نیز در این فن‌آوری به خدمت گرفت؛ یعنی می‌توان الیگومرهای PNA را علیه نواحی اختصاصی رونوشت ژن یا ژن‌های مورد نظر طراحی نمود؛ به این نحو که اگر PNA به RNA هدفش متصل شد، مانع از ترجمه‌ی آن می‌شود. در این روش PNA را می‌توان بر علیه کدون آغاز و یا ناحیه‌ی اتصال ریبوزوم طراحی نمود که نتیجه‌ی آن، عدم اتصال ریبوزوم و عدم تولید پروتئین مربوط می‌باشد (۳۱). همچنین می‌توان نواحی پایین دست این ناحیه را هدف قرار داد که در این صورت پروتئین تولید شده به علت توقف ریبوزوم، ناقص (Truncated) خواهد بود. از طرفی، PNA را می‌توان بر علیه نواحی پیرایش (Splice sites) RNA طراحی نمود. نتیجه‌ی این کار، پیرایش ناکارآمد می‌باشد. مولکول PNA متصل شده با RNA، سوبسترای RNase-H نیست و RNA مربوط توسط این آنزیم برش نمی‌یابد، اما اگر در این مورد از PNAهای کایمر با DNA استفاده شود، RNA مربوط توسط RNase-H، شناسایی و تجزیه می‌شود (۳۱، ۲۸).

کاربرد PNA در تکنیک‌های دو رگه‌سازی فاز جامد

ستون فقرات طبیعی PNA -چه زمانی که PNA به عنوان تارگت استفاده شود و چه هنگامی که به عنوان پروب مورد استفاده قرار گیرد-، به طرز قابل توجهی موجب افزایش سرعت هیبریداسیون در این تکنیک‌ها

می‌شود. PNA را می‌توان جهت به دام انداختن وابسته به توالی نوکلئیک اسیدهای تک رشته‌ای مورد استفاده قرار داد. مزیت PNA در این روش ایجاد کمپلکس‌های مستحکم در قدرت یونی پایین محیط (که باعث واسرشته شدن ساختارهای ثانویه‌ی اسید نوکلئیک‌های طبیعی می‌شود) می‌باشد.

در روش OPAC (Oligonucleotide PNA assisted affinity capture)، Bis-PNAهایی تحت عنوان ۲-DNA openers (PNA) موجب شکل‌گیری لوپ PNA تک رشته‌ای بزرگی می‌شود که در مرحله‌ی بعد می‌تواند با الیگو نوکلئوتیدهای بیوتینیله، هیبرید شود. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، دو Bis-PNA ناهمسو علیه سایت مربوط طراحی و به کار گرفته شده‌اند که نتیجه‌ی آن ایجاد لوپ PD می‌باشد. پروب متصل به بیوتین علیه لوپ PD در مرحله‌ی بعد استفاده می‌شود. سپس مجموعه‌ی به دست آمده را می‌توان با استفاده از گوی‌های مغناطیسی پوشیده شده با استرپتاویدین و سپس استفاده از میدان مغناطیسی، تخلیص نمود. این روش را می‌توان جهت خالص‌سازی و جداسازی PNA ژنومی، مانند ژنوم مخمر به کارگرفت (۳۳-۳۲، ۱۵).

استفاده از PNA در PCR

همان‌طور که گفته شد، PNA نمی‌تواند توسط DNA پلیمراز، شناسایی شود و به همین دلیل نمی تواند به عنوان پرایمر استفاده شود. اما قادر است طویل شدن پرایمرها را به واسطه‌ی اتصال به رشته‌ی الگو از طریق رقابت با پرایمر متوقف نماید. کایمرهای PNA-DNA می‌تواند توسط DNA پلیمراز شناسایی شود و بنابراین می‌تواند نقش پرایمر را ایفا نماید؛ چرا که انتهای ’3 این کایمرها از جنس DNA و سوبسترای آنزیم پلیمراز است. در روش‌های ردیابی جهش‌های تک نوکلئوتیدی با PCR (Polymerase chain reaction) می‌توان از PNA استفاده کرد. در این روش که به PNA-directed PCR clamping موسوم است، PNA را علیه DNA گونه‌ی وحشی طراحی می‌کنند. در صورتی که پرایمر از جنس DNA را برای هیبریداسیون با رشته‌ی DNA جهش یافته طراحی می‌نمایند. نتیجه‌ی این امر بر طبق شکل، ممانعت از تکثیر رشته‌ی وحشی و تکثیر رشته‌ی موتانت می‌باشد. دمای PCR باید طوری انتخاب شود که تنها گونه‌ی موتانت تکثیر شود (۳۵-۳۴).

نوعی Real time PCR خودکار جدید بر اساس PNA طراحی شده است که به Q-PNA PCR معروف است. در این روش، PNA به یک خاموش کننده (Quenchre) لیبل می‌شود و به یک پرایمر متصل به رنگ فلورسنت به عنوان گزارشگر (Reporter) هیبرید می‌گردد. طی PCR در دور دوم تکثیر (Amplification)، وقتی پلیمراز به سمت ’5 پرایمر می‌رسد، یعنی وقتی به سمت رنگ فلورسنت حرکت می‌کند، هیبرید Q-PNA از رشته جدا می‌شود و Reporter، نور خود را ساطع می‌کند (۳۲).

کاربرد PNA در فرایند هیبریداسیون قبل از ژل

در تکنیک‌های Southern blot و Northern blot، مرحله‌ی شستشوی متعاقب هیبریداسیون پروب، موجب طولانی شدن فرایند می‌شود. اگر PNA (با توجه به قدرت اتصال بالای آن و عدم حرکت الکتروفورتیک به علت خنثی بودن ستون فقرات) به عنوان پروب طراحی شده علیه توالی مورد نظر، قبل

از ران کردن نمونه‌ها روی ژل به نمونه‌ی حاوی نوکلئیک اسیدهای تک رشته‌ای اضافه گردد و این مخلوط به طور مستقیم روی ژل الکتروفورز قرار گیرد، مرحله‌ی شستشو را می‌توان حذف نمود و باند(های) دارای توالی مورد نظر را از باندهای دیگر افتراق داد. حذف مرحله‌ی شستشو از یک طرف و بالا بودن سرعت هیبریداسیون PNA و در نتیجه کوتاه شدن زمان انکوباسیون از طرف دیگر، موجب می‌شود که تکنیک‌های Southern blot و Northern blot، در زمان بسیار کمتری انجام گیرد (۳۶).

کاربرد PNA در افتراق سویه‌های میکرو ارگانیسم‌ها

مثال بارز این کاربرد، افتراق ۴۷ گونه‌ی لژیونلا در آب آشامیدنی با استفاده از هدف قرار دادن ۱۶SrRNA باکتری‌ها است. به علت ساختار ثانویه‌ی ۱۶SrRNA و بالاتر بودن اختصاصیت PNA، استفاده از آن نسبت به DNA ارجحیت دارد.

کاربرد PNA در روش FISH

مولکول‌های PNA با طیف وسیعی از مولکول‌های گزارشگر و فلوروکروم‌هایی از قبیل فلورسئین، رودامین، سیانین و رنگ‌های Alex، سازگاری دارند. مزیت دیگر استفاده از پروب‌های PNA در FISH (Fluorescent in situ hybridization)، سیگنال پس زمینه‌ی اندک، پایداری بسیار زیاد مخلوط پروب و عدم نیاز به شستشوی شدید است. پروب‌های PNA تا کنون برای آنالیز نواحی تلومری کروموزوم‌ها که حاوی صدها تکرار از توالی کوتاه 5’ TTAGGG 3’ (در انسان و سایر پریمات‌ها) می‌باشد، به کار گرفته شده‌اند. سنجش کمی این نواحی در تشخیص سرطان‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۳۷). کارایی این پروب‌ها برای سنجش اندازه‌ی توالی‌های تکراری تلومری، با روش PRINS (Primed in situ)، قابل مقایسه است. علاوه بر این، PNA در تکنیک PRINS نیز به عنوان پرایمر می‌تواند مورد استفاده واقع شود (در فرم کایمر) (۱۵).

کاربرد PNA در بیوسنسورها

پروب‌های تک رشته‌ی PNA که در ترنسدیوسرهای حساس به کدورت یا حساس به نور تثبیت شده‌اند، قادر به ردیابی و سنجش میزان رشته‌های مکمل و نیز بد جفت شدگی مربوط در محلول نمونه‌ی DNA هستند. وقایع هیبریداسیون در این بیوسنسورها، توسط Transduserها به پیام‌های الکتریکی مبدل می‌شوند. مثال بارز این بیوسنسورها PANArray می‌باشد که نوعی Microarray است که برای ژنوتایپینگ ویروس پاپیلومای انسان (HPV یا Human papillomavirus) طراحی شده و ژنوتایپ ۱۹۵ نمونه‌ی HPV Positive را در میان ۸۹۴ نمونه‌ی بالینی آزمایش شده، به درستی شناسایی کرده است (۳۹-۳۸).

استفاده از PNA در تکنیک PARC (PNA assisted rare cleavage)

مولکول PNA در ترکیب با متیلازها و اندونوکلئازهای محدود کننده، می‌تواند به عنوان یک Rare genomic cutter به کار گرفته شود. در این تکنیک از قدرت اتصال انتخابی بالای PNA، به خصوص Bis-PNA، برای اتصال به نواحی هوموپریمیدین در مولکول‌های بزرگ DNA استفاده می‌شود. در این روش، ترجیح داده می‌شود که از Bis-PNAهای با بار مثبت استفاده شود که توالی هدف آن‌ها با توالی هدف آنزیم‌های محدود کننده/متیله کننده همپوشانی دارد. پس از حذف PNA و به دنبال آن هضم آنزیمی، نواحی هدف Bis-PNA، برش

یافته‌اند؛ اما سایر نواحی به علت متیله شدن، از برش محافظت شده‌اند. به این ترتیب، امکان برش DNA ژنومی به قطعات محدود وجود خواهد داشت (۲۴).

کاربرد PNA در آنزیم‌های محدود کننده‌ی مصنوعی برای برش انتخابی DNA دو رشته‌ای

در این سیستم دو رشته‌ای از PNA مکمل برای تشکیل نقاط داغ جهت برش به دوپلکس PNA حمله می‌کنند. سپس کمپلکس Ce(IV)EDTA به عنوان یک برش دهنده‌ی مولکولی کاتالیتیک عمل می‌کند. همچنین PNA در ترکیب با نوکلئاز S1، همچون یک آنزیم محدود کننده‌ی اختصاصی مصنوعی عمل می‌کند (۴۰).

کاربردهای PNA در زیست پزشکی

همان‌طور که پیشتر گفته شد، در هر تکنیکی که در آن از الیگو نوکلئوتیدهای طبیعی –به علت اتصال اختصاصی و وابسته به توالی آن‌ها استفاده می‌شود، استفاده از PNA به جای این الیگو نوکلئوتیدها (به علت بالاتر بودن اختصاصیت و پایداری هیبرید به دست آمده و بالا رفتن حساسیت و اختصاصیت تکنیک) ارجحیت دارد. این جا است که فواید استفاده از PNA در بحث تشخیص و درمان آشکار می‌شود، به عنوان مثال امروزه در برخی از کیت‌های تشخیصی روش FISH و PCR و نیز تکنیک‌هایی نظیر میکرواری از پروب‌های PNA و یا پرایمرهای کایمر PNA استفاده می‌شود که باعث ارایه‌ی نتایج بهتر به اشخاص، ساده‌تر شدن تکنیک و صرفه‌جویی قابل توجه در زمان صرف شده برای انجام تکنیک می‌شود.

در پژوهش Galbiati و همکاران، حضور DNA جنینی در سرم مادر به عنوان یک نشانگر برای تشخیص قبل از تولد تالاسمی بتا با استفاده از PNA صورت گرفت. در این تحقیق، ۸-۷ ژن بتاگلوبین به وسیله‌ی PNA clamoing PCR بررسی شدند و ژن‌های جهش یافته ردیابی گردیدند. ایراد این روش –با وجود فواید زیاد آن– حصول غلظت بهینه‌ی PNA مورد نیاز برای بررسی هر یک از جهش‌ها است که کار را برای آزمایش‌های کلینیکی معمول مشکل می‌سازد (۴۱).

در پژوهش Wang و همکاران، از PNA به عنوان عامل القای رونویسی از ژن گاما گلوبین در جهت درمان بیماری هموگلوبین داسی شکل استفاده شد. بیان بالای گاما گلوبین می‌تواند اثرات ناشی از بتا گلوبین غیر طبیعی را کاهش دهد (۴۲).

کمپانی‌هایی همچون PANAGENE نیز محصولات تشخیص مولکولی خود را بر اساس PNA طراحی و روانه‌ی بازار نموده‌اند. برای مثال، محصولات AdvanDx s PNA FISH برای تشخیص عفونت خون، در سال ۲۰۰۶ به تأیید سازمان غذا و داروی امریکا رسیده است (۴۳). از طرفی پروب‌های PNA برای تصویربرداری مولکولی in vivo در تحقیقات سرطان مورد استفاده قرار گرفته است. در این تکنیک، PNA با عوامل حاجب MRI (Magnetic resonance imaging) و یا اتم‌های گسیل کننده‌ی پوزیترون (Positron-emitting nuclide) برای توموگرافی گسیل پوزیترون (Positron emission tomography یا PET) و همچنین پپتیدهای نفوذ کننده به سلول، کنجوگه می‌شوند. دو رگه شدن اختصاصی PNA با mRNA هدف، اجازه‌ی تصویربرداری MRI و یا PET (Positron emission tomography) از بیان ژن در موش یا رت زنده را می‌دهد (۴۳).

همان‌طور که گفته شد، روش‌های PNA در زمینه‌ی تشخیص بیمارهای عفونی و برخی بدخیمی‌ها کاربرد دارند و نتیجه‌ی بهتری نسبت به روش‌های سنتی‌تر دارند. در بحث ژن درمانی و فن‌آوری آنتی سنس نیز PNA فواید بالقوه‌ای را دارد. هر چند هنوز کاربرد آن بالفعل نشده است. برای مثال، مهار همانندسازی DNA میتوکندریایی که در حین همانندسازی به طور وسیعی تک رشته‌ای می‌شود، به وسیله‌ی PNA، که توسط Taylor و همکاران گزارش شد، روشی جدید و بالقوه برای درمان بیماری‌های میتوکندریایی می‌باشد؛ چرا که نتایج آزمایشگاهی نشان داده‌اند که PNA قادر است همانندسازی DNA جهش یافته را در شرایط فیزیولوژیک بدن، بدون اعمال اثر بر روی DNA نوع وحشی، مهار نماید (۴۴).

References

1. Ray A, Norden B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. FASEB J 2000; 14(9): 1041-60.
2. Nielsen PE, Egholm M. An introduction to peptide nucleic acid. Curr Issues Mol Biol 1999; 1(1-2): 89-104.
3. Nielsen PE. Applications of peptide nucleic acids. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(1): 71-5.
4. Kovacs G, Timar Z, Kupihar Z, Kele Z, Kovacs L. Synthesis and analysis of peptide nucleic acid oligomers using Fmoc/acyl-protected monomers. J Chem Soc Perkin Trans 1 2002; (10): 1266-70.
5. Jordan S, Schwemler C, Kosch W, Kretschmer A, Stropp U, Schwenner E, et al. New hetero-oligomeric peptide nucleic acids with improved binding properties to complementary DNA. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 1997; 7(6): 687-90.
6. Hyrup B, Egholm M, Nielsen PE, Wittung P, Norden B, Buchardt O. Structure-activity studies of the binding of modified peptide nucleic acids (PNAs) to DNA. J Am Chem Soc 1994; 116(18): 7964-70.
7. Egholm M, Christensen L, Dueholm KL, Buchardt O, Coull J, Nielsen PE. Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. Nucleic Acids Res 1995; 23(2): 217-22.
8. Edrup AB, Dahl O, Nielsen PE. A novel peptide nucleic acid monomer for recognition of thymine in triple-helix structures. J Am Chem Soc. 1997; 119(45): 11116-7.
9. Griffith MC, Risen LM, Greig MJ, Lesnik EA, Sprankle KG, Griffey RH, et al. Single and Bis peptide nucleic acids as triplexing agents: binding and stoichiometry. J Am Chem Soc 1995; 117(2): 831-2.
10. Wittung P, Nielsen PE, Buchardt O, Egholm M, Norden B. DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. Nature 1994; 368(6471): 561-3.
11. Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature 1993; 365(6446): 566-8.
12. Kurakin A, Larsen HJ, Nielsen PE. Cooperative strand displacement by peptide nucleic acid (PNA). Chem Biol 1998; 5(2): 81-9.
13. Peffer NJ, Hanvey JC, Bisi JE, Thomson SA, Hassman CF, Noble SA, et al. Strand-invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid oligomers. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(22): 10648-52.
14. Lohse J, Dahl O, Nielsen PE. Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(21): 11804-8.
15. Pellestor F, Paulasova P. The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. Eur J Hum Genet 2004; 12(9): 694-700.
16. Nielsen PE, Haaima G, Lohse A, Buchardt O. Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: hybridization and solubility properties of d-lysine pna. Angew Chem Int Ed Engl 1996; 35(17): 1939-42.
17. Hamilton SE, Simmons CG, Kathiriya IS, Corey DR. Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase. Chem Biol 1999; 6(6): 343-51.
18. Basu S, Wickstrom E. Synthesis and characterization of a peptide nucleic acid conjugated to a D-peptide analog of insulin-like growth factor 1 for increased cellular uptake. Bioconjug Chem 1997; 8(4): 481-8.
19. Faruqi AF, Egholm M, Glazer PM. Peptide

nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(4): 1398-403.
20. Pooga M, Soomets U, Hallbrink M, Valkna A, Saar K, Rezaei K, et al. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. Nat Biotechnol 1998; 16(9): 857-61.
21. Simmons CG, Pitts AE, Mayfield LD, Shay JW, Corey DR. Synthesis and membrane permeability of PNA-peptide conjugates. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 1997; 7(23): 3001-6.
22. Koppelhus U, Nielsen PE. Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). Adv Drug Deliv Rev 2003; 55(2): 267-80.
23. Nielsen PE, Egholm M, Buchardt O. Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand. Gene 1994; 149(1): 139-45.
24. Veselkov AG, Demidov VV, Nielson PE, Frank-Kamenetskii MD. A new class of genome rare cutters. Nucleic Acids Res 1996; 24(13): 2483-7.
25. Demidov VV, Yavnilovich MV, Belotserkovskii BP, Frank-Kamenetskii MD, Nielsen PE. Kinetics and mechanism of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(7): 2637-41.
26. Larsen HJ, Nielsen PE. Transcription-mediated binding of peptide nucleic acid (PNA) to double-stranded DNA: sequence-specific suicide transcription. Nucleic Acids Res 1996; 24(3): 458-63.
27. Bentin T, Nielsen PE. Enhanced peptide nucleic acid binding to supercoiled DNA: possible implications for DNA "breathing" dynamics. Biochemistry 1996; 35(27): 8863-9.
28. Hanvey JC, Peffer NJ, Bisi JE, Thomson SA, Cadilla R, Josey JA, et al. Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. Science 1992; 258(5087): 1481-5.
29. Mollegaard NE, Buchardt O, Egholm M, Nielsen PE. Peptide nucleic acid.DNA strand displacement loops as artificial transcription promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(9): 3892-5.
30. Praseuth D, Grigoriev M, Guieysse AL, Pritchard LL, Harel-Bellan A, Nielsen PE, et al. Peptide nucleic acids directed to the promoter of the alpha-chain of the interleukin-2 receptor. Biochim Biophys Acta 1996; 1309(3): 226-38.
31. Knudsen H, Nielsen PE. Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. Nucleic Acids Res 1996; 24(3): 494-500.
32. Orum H, Nielsen PE, Jorgensen M, Larsson C, Stanley C, Koch T. Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. Biotechniques 1995; 19(3): 472-80.
33. Seeger C, Batz HG, Orum H. PNA-mediated purification of PCR amplifiable human genomic DNA from whole blood. Biotechniques 1997; 23(3): 512-7.
34. Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. Nucleic Acids Res 1993; 21(23): 5332-6.
35. Thiede C, Bayerdorffer E, Blasczyk R, Wittig B, Neubauer A. Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. Nucleic Acids Res 1996; 24(5): 983-4.
36. Perry-O'Keefe H, Yao XW, Coull JM, Fuchs M, Egholm M. Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(25): 14670-5.
37. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. Hum Mol Genet 1996; 5(5): 685-91.
38. BIAcore X Instrument Handbook Preliminary ed. Uppsala, Sweden: Pharmacia Biosensor AB; 1996.
39. Wang J, Palecek E, Nielsen PE, Rivas G, Cai X, Shiraishi H, et al. Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors. J Am Chem Soc 1996; 118(33): 7667-70.
40. Demidov V, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE. Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. Nucleic Acids Res 1993; 21(9): 2103-7.
41. Galbiati S, Foglieni B, Travi M, Curcio C, Restagno G, Sbaiz L, et al. Peptide-nucleic acid-mediated enriched polymerase chain reaction as a key point for non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia. Haematologica 2008; 93(4): 610-4.
42. Wang G, Xu X, Pace B, Dean DA, Glazer PM, Chan P, et al. Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated induction of human gamma-globin gene expression. Nucleic Acids Res 1999; 27(13): 2806-13.
43. Koh W. Peptide nucleic acid (PNA) and its applications [Online]. [cited 2013]; Available from: URL: http://panagene.com/eng/bbs/ndata/pn_ref/pn_ref_1227242202.pdf
44. Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM, Lightowlers RN. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. Nat Genet 1997; 15(2): 212-5.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 31, No. 270, 3rd Week, March 2014

Received: 21.11.2013

Accepted: 09.02.2013

An Overview of Peptide Nucleic Acids: Structure, Properties, and Applications

Aref Farrokhifard[1], Majid Kheirollahi PhD[2]

ReviewArticle

Abstract

For decades, nucleic acid analogues have been emerged in molecular biology. Some of these analogues are powerful bimolecular tools in biotechnology. Among the four major classes of these synthetic molecules (XNA: xenonucleic acid, LNA: locked nucleic acid, PNA: peptide nucleic acid and morpholino), PNA is the most important. In PNA, N-aminoethyle glycine units (to which purine/pyrimidine bases have been attached), are joined together to form an achiral and peptide-like structure that mimics the behavior of DNA and can hybridize to nucleic acid and to other PNA in sequence specific manner. Because of its unique physicochemical properties, PNA in many cases prefers over natural oligonucleotide and therefore, have been exploited in some strategies and methods in the field of diagnostics and therapy. In this review, we describe the structure, biochemical properties, and biomedical applications of PNA.

Keywords: Peptide Nucleic Acids, Structure, Biochemical properties, Biomedical applications

Citation: Farrokhifard A, Kheirollahi M. **An Overview of Peptide Nucleic Acids: Structure, Properties and Applications.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(270): 2390-402

1- MSc Student, Pediatrics Inherited Diseases Research Center And Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center And Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Kheirollahi PhD, Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir