Archive of SID

SJRM
SAREM JOURNAL OF REPRODUCTIVE MEDICINE

Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2018;2(4):13-18

Anewmutationof FRMD7gene in X-linkedcongenitalnystagmusinan Iranian family

ARTICLE INFO

Article Type
Original research

Authors
Ahmadvand M.1 PhD,
Mashhadikhan M.2 PhD,
Shafeghati Y.3 MD,
Noruzinia M.* MD, PhD

How to cite this article
Ahmadvand M, Mashhadikhan M, Shafeghati Y, Noruzinia M. X-linkedcongenitalnystagmusinan Iranian family. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2018;2(1) :18-13.

ABSTRACT

Aims Congenital nystagmus is one of the most common eye diseases characterized by involuntary eye movements. A large family from West Azerbaijan province (mostly living in the city of Khoy) was referred to medical genetics department of Sarem hospital which congenital nystagmus has been detected in 12 of them with X-linked dominant inheritance pattern. Two X-linked genes on the short and long arms of the X chromosome had been reported that linkage analysis had been performed on them at the medical genetics department of Sarem hospital and no positive results were found. X-linked mutations in a third gene which is called FRMD7 have been reported recently that its related characteristics were same as what has been observed in the family members of this family. Therefore, we decided to investigate the FRMD7 gene in this family.

Materials & Methods Methods of indirect (linkage) and direct sequencing (sequencing) were used to assess gene mutations of FRMD7.

Results This study led to the identification of mutations c.37C>T. The observed variation has not previously been reported in patients with congenital nystagmus. Mutation of cytosine to thymine base and deletion of glutamine amino acid, that results in premature truncation of the protein

Conclusion The results of this study emphasize on the heterogeneity of the disease. Therefore, study of this gene as a cause of congenital nystagmus in the Iranian society should be considered.

Keywords Nystagmus; FRMD7; X-Linked Gene; DNA Mutation Analysis; Direct DNA Sequencing

*"Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR)" and "Medical Genetics Department, medical Sciences Faculty", Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[1]Genetics Department, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran
[2]Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran
[3]Medical Genetics Department, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Sarem Women's Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111
Phone: +98 (21) 44670888
Fax: +98 (21) 44670432
mehrdad.noruzinia@modares.ac.ir

Article History
Received: September 23, 2017
Accepted: January 5, 2017
ePublished: February 15, 2018

CITATION LINKS

[1] Computer recreations [2] The science of fractal images [3] The beauty of fractals [4] Computer recreations: Leaping into Lyapunov space [5] Characterization of bifurcating structure of blood vessels using fractal dimension [6] Physical mechanisms underlying neurite outgrowth: A quantitative analysis of neuronal shape [7] Fractal and integer-dimensional geometric analysis of pigmented skin lesions [8] Fractal analysis of interstitial lung abnormalities in chest radiography [9] Malignancy associated changes in Cervical Smears: Systematic changes in cytometric features with the grade of dysplasia [10] Morphogenesis of the bone marrow: Fractal structures and diffusion limited growth [11] Hematopoietic growth factors: Understanding functional diversity and structural terms [12] Anderson's pathology [13] Robbins & Cotran pathologic basis of disease [14] Morphogenesis of the bone marrow: Fractal structures and diffusion limited growth [15] Fractal dimension of the bone marrow in metastatic lesions [16] Application of Fractal analysis in hyperparathyroidism [17] X-linked idiopathic infantile nystagmus associated with a missense mutation in FRMD7 [18] A novel GPR143 splicing mutation in a Chinese family with X-linked congenital nystagmus [19] A novel interaction between FRMD7 and CASK: Evidence for a causal role in idiopathic infantile nystagmus [20] FRMD7-Related infantile nystagmus [21] Novel FRMD7 Mutations and Genomic Rearrangement Expand the Molecular Pathogenesis of X-Linked Idiopathic Infantile Nystagmus

Copyright© 2018, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش یک جهش جدید در ژن FRMD7 در نیستاگموس مادرزادی وابسته به کروموزوم X در جمعیت یک خانواده ایرانی

محمد احمدوند MD
دپارتمان ژنتیک مولکولی، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
مائده مشهدی‌خان PhD
پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
یوسف شفقتی MD
"مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم" و "پژوهشکده تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم"، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
مهرداد نوروزی‌نیا* MD, PhD
"گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس" و "دپارتمان ژنتیک مولکولی و پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول های بنیادی صارم، بیمارستان صارم"، تهران، ایران

چکیده
اهداف: نیستاگموس مادرزادی یکی از بیماری‌های نسبتاً شایع چشمی است که با نوسانات غیرارادی چشم مشخص می‌شود. هدف این مطالعه بررسی جهش‌های ژن FRMD7 در بیماری نیستاگموس مادرزادی وابسته به کروموزوم X در جمعیت یک خانواده ایرانی بود.
مواد و روش‌ها: خانواده بزرگی از آذربایجان غربی به مرکز ژنتیک بیمارستان صارم شهر تهران مراجعه کرده بودند که ۱۲ نفر آنها مبتلا به نیستاگموس مادرزادی با الگوی وراثتی غالب وابسته به X بودند. دو ژن وابسته به X در بازوی کوتاه و بلند کروموزوم X گزارش شده بود که با روش آنالیز پیوستگی مطالعه شد و یافته مثبتی به‌دست نیامد. ویژگی بیماران در این خانواده با مشخصات خانواده‌هایی که دارای جهش در یک ژن وابسته به X دیگر موسوم به FRMD7 بودند، تطابق داشت. بنابراین ژن FRMD7 در این خانواده مطالعه شد. از روش غیرمستقیم (linkage) و مستقیم توالی‌یابی (Sequencing) برای بررسی موتاسیون ژن FRMD7 استفاده شد.
یافته‌ها: این مطالعه منجر به شناسایی موتاسیون c.37C>T شد که تا به حال گزارش نشده است. جهش منجر به تغییر بازآلی سیتوزین به تیمین می‌شود که موجب عدم ترجمه آمینواسید گلوتامین می‌شود که تولید پروتئین ناقصی را به‌دنبال خواهد داشت که به آسانی از بین می‌رود.
نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه تاکیدی بر هتروژن‌بودن این بیماری است. لذا اهمیت هرچه بیشتر روی بررسی این ژن به‌عنوان عامل ایجاد نیستاگموس مادرزادی در بین افراد جامعه ایرانی را نشان می‌دهد.
کلیدواژه‌ها: نیستاگموس، FRMD7، ژن وابسته به X، روش سانگر، تعیین توالی مستقیم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵
*نویسنده مسئول: mehrdad.noruzinia@modares.ac.ir

مقدمه

نیستاگموس یک اختلال چشمی است که در آن چشم حرکات نوسانی تکراری و کنترل‌نشده دارد. به‌طور کلی، این حرکات دارای جهت جانبی (نیستاگموس افقی) و در موارد نادر عمودی (نیستاگموس عمودی) یا حتی چرخشی (نیستاگموس دوار) هستند. این اختلال معمولاً در هر دو چشم وجود دارد و سرعت آن از آهسته تا سریع است و اغلب منجر به کاهش بینایی می‌شوند[1]. احتمال مادرزادی‌بودن این بیماری وجود دارد، ولی اغلب اکتسابی است. هنگامی که نیستاگموس در اوایل دوران کودکی ایجاد شود، امکان داشتن دلایل پاتولوژیک چشمی را دارد که بینایی چشم را تحت تاثیر قرار می‌دهد مانند آب‌مروارید، گلوکوم، آلبینیسم و همچنین امکان ایجاد این اختلال ناشی از سندروم داون یا مشکل ایجادشده در مسیرهای بصری است که چشم را به قشر بینایی متصل می‌کنند. به‌نظر می‌رسد در این قسمت‌های مغز، تنظیم حرکات چشم لوکالیزه شده است. نیستاگموس اکتسابی که در مراحل بعدی زندگی به‌ویژه در بزرگسالی رخ می‌دهد، احتمالاً نشانه وضعیتی دیگر مانند سکته مغزی، مالتیپل اسکلروزیس، تومور مغزی، اختلالات متابولیک و اثر جانبی یک دارو یا ضربه به سر است. با این حال، برخی از کودکان یک نوع نیستاگموس به نام "نیستاگموس مادرزادی خودبه‌خودی" را بروز می‌دهند، به این معنی که این اختلال در اوایل دوره زندگی شروع می‌شود و اتیولوژی آن ناشناخته است[2-4].

نیستاگموس مادرزادی یکی از بیماری‌های نسبتاً شایع چشمی است که الگوهای توارثی متفاوتی شامل وابسته به X غالب، وابسته به X مغلوب، اتوزوم غالب و اتوزوم مغلوب برای آن توصیف شده است. شایع‌ترین الگوی توارث نیستاگموس مادرزادی وابسته به X غالب است. با این حال، توارث اتوزوم مغلوب یا وابسته به کروموزوم X به‌ندرت مشاهده شده است[5, 6]. شیوع نیستاگموس مادرزادی در بعضی جمعیت‌ها یک در ۱۵۰۰ تولد زنده است. احتمالاً توارث وابسته به X با نفوذ ناکامل و بیان متغیر، فراوان‌ترین نوع توارث این بیماری است. بیماران در ۶ماه اول عمر و اغلب تا ۲ماهگی نیستاگموس دارند. دید، دوچشمی و دید رنگ، طبیعی است. دقت بینایی بهتر از ۶/۱۲ و ساختمان چشم‌ها، از نظر الکتروفیزیولوژیک مثل VEP و الکترورتینوگرافی (ERG) طبیعی است. از نظر شدت و دامنه حرکات چشم تفاوتی بین مرد و زن مبتلا در یک خانواده وجود ندارد. با این حال، دقت بینایی احتمالاً در زنان بهتر است.

از نظر ژنتیکی حداقل ۴ لوکوس برای این بیماری پیشنهاد شده است[7]. ۲ لوکوس آن روی کروموزوم X، یکی در جایگاه Xq26-q27 و دیگری در Xp11.4-p11.3 قرار دارند[6, 8]. نقشه‌یابی اولیه لوکوس مربوط به این بیماری در اکثر خانواده‌های بیمار، ناحیه‌ای به اندازه 12Mb را بین مارکرهای DXS9909 و DXS12115,6 نشان داده است[6, 9]. البته، *ژانگ* و همکاران این ناحیه را محدود کردند و جایگاه ژن مربوطه را در فاصله بین دو مارکر DXS8033 و DXS8043 تعیین کرده‌اند[10]. *تارپی* و همکاران با مطالعه ۱۶ خانواده مبتلا به نیستاگموس مادرزادی ایدیوپاتیک وابسته به X (XLICN)، این ناحیه را به ناحیه‌ای 7/5Mb بین دو مارکر DXS1047 و DXS1041 که بیش از ۸۰ ژن دارد، محدودتر کردند و توالی‌یابی همه اگزون‌های ژن‌های موجود در این فاصله نشان دادند که در ۱۵ خانواده از ۱۶ خانواده مورد بررسی، ژن FRMD7 که در ناحیه Xq26-q27 قرار دارد، حامل جهش هستند[11].

FRMD7 در ناحیه Xq26.2 قرار دارد و حاوی ۱۲ اگزون است. *تارپی* و همکاران در مطالعه‌ای دیگر با بررسی چندین خانواده دیگر و یافتن جهش‌های مختلف این ژن در افراد مبتلا، بیان کرده‌اند که جهش در ژن FRMD7، علت عمده XLICN است. از طرفی آنها با بررسی جهش در بیماران بدون سابقه خانوادگی نشان داده‌اند که آنالیز جهش‌های این ژن حتی در موارد تک‌گیر این بیماری در هر دو جنس ارزش تشخیصی دارد. عملکرد ژن FRMD7 مشخص نیست اما آنالیز بیان ژن FMRD7 در رویان‌های اولیه نشان می‌دهد که بیان این ژن به مغز میانی و عقبی به‌عنوان نواحی درگیر در کنترل حرکتی چشم، محدود است[12].

مطالعات دیگر روی این ژن در خانواده‌های مبتلا به نیستاگموس موجب یافتن جهش‌های دیگری در این ژن شده است که تاییدکننده نقش جهش ژن FRMD7 در بیماری XLICN است. در این مطالعات،

www.SID.ir

Archive of SID

ابتدا با بررسی آنالیز پیوستگی و به‌کارگیری مارکرهای میکروساتلایت که با ژن FRMD7 پیوسته هستند، پیوستگی بیماری در خانواده با آلل جهش‌یافته مشخص شد و پس از آن توالی‌یابی DNA برای تعیین جهش در این ژن انجام شد. در سال ۲۰۰۸ جهش‌های جدیدی گزارش شد که از میان آنها یافتن ۵ جهش جدید در ژن FRMD7 در یک خانواده مبتلا به نیستاگموس وابسته به کروموزوم X در چین قابل ذکر است. این جهش‌ها به‌ترتیب شامل 70G>T(p.G24W) در اگزون شماره ۲ و c.689–690delAG (p.Ser232del) در اگزون شماره ۸، همچنین دو جهش c.782G>A (p.R260Q) و c.812G>T (p. C271F) در اگزون شماره ۹ و در نهایت جهش c.910C>T (R303X) در اگزون شماره ۱۰ بودند[13, 8]. در مطالعه‌ای که توسط *ژانگ* و همکاران روی نیستاگموس وابسته به کروموزوم X در چهار خانواده انجام شد، ۳ جهش جدید در ژن FRMD7 شناسایی شد که شامل p.Q487X، p.S260R و p.V549Y fsX554 بودند[14].

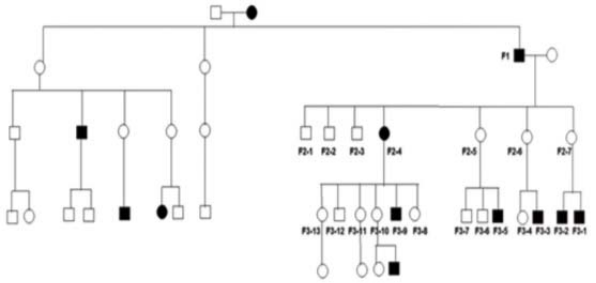
پروتئین FRMD7 (ENSP00000298542) از یک دومین FERM در پایانه N و یک دومین مجاور FERM و یک ناحیه فاقد هر نوع مشابهت معنی‌دار با سایر پروتئین‌ها، تشکیل شده است. دومین FERM در بین آمینواسید شماره ۲ تا ۲۸۲ واقع شده است و دومین FERM-C(F3) در قسمت باقیمانده آمینواسید ۱۸۶ تا ۲۷۹ از پروتئین FRMD7 قرار گرفته است[15, 14]. موتاسیون شناخته‌شده در این خانواده بزرگ ایرانی در دومین FERM بوده و عامل ایجاد پروتئین ناقص بدون دومین‌های FERM و FERM-C بود.

تا به امروز، سه نوع نیستاگموس مادرزادی وابسته به کروموزوم X (NYS 1، NYS 5 و NYS 6) شناخته شده است، که رایج‌ترین نوع آن NYS 1 حاصل از جهش ژن FERM در دومین، شامل ۷ ژن FRMD7 است. علاوه بر این، سه نوع نیستاگموس اتوزومی مادرزادی غالب شامل NYS 2، NYS 3 و NYS 4 نیز گزارش شده است[16, 17].

در اینجا ما یک خانواده بزرگ ایرانی با نیستاگموس مادرزادی ایدیوپاتیک مغلوب را معرفی کردیم. از آنجا که نیستاگموس مادرزادی ناهمگونی وسیع را در لوکوس ژنی نشان می‌دهد و از آنجا که الگوی وراثتی دقیق در این خانواده مشخص نیست، برای تمامی افراد این خانواده توالی ژنی بررسی شد تا تمامی بخش‌های شناخته‌شده در ژنوم یک عضو مبتلا، برای یافتن جهش مولد فنوتیپ بیماری بررسی شود. هدف این مطالعه بررسی جهش‌های ژن FRMD7 در بیماری نیستاگموس مادرزادی وابسته به کروموزوم X در جمعیت یک خانواده ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

شناسایی خانواده: یک پسر ۱۵ساله متعلق به یک خانواده بزرگ از استان آذربایجان غربی به بخش ژنتیک بیمارستان فوق تخصصی صارم در تهران مراجعه کرد و تشخیص داده شد که بیماری نیستاگموس ایدیوپاتیک مادرزادی دارد. او دارای حدت دید عادی بود و یافته‌های بالینی دیگری در مورد او تشخیص داده نشد. پسر دوم مبتلا به این بیماری، از یک ازدواج ظاهراً غیرفامیلی بود. هر دو والدین از لحاظ بالینی بدون علامت بودند. ترسیم شجره‌نامه خانواده، سابقه اختلال در پنج نسل از این خانواده را نشان داد (شکل ۱). علاوه بر بیمار مذکور، ۱۱ فرد مبتلای دیگر در شجره‌نامه وجود داشتند که دارای وضعیت ذهنی عادی بودند و همگی حرکات غیرارادی و جنبش‌های آونگ‌مانند چشم را بروز می‌دادند و میزان بینایی آنها بدون هیچ اختلال عصبی و مورفولوژیک کاهش یافته بود. هم مردان و هم زنان در خانواده بدون هیچ تفاوت آشکار فنوتیپی وابسته به جنس، مبتلا بودند.



شکل ۱) شجره خانواده فرد مبتلا به نیستاگموس

نفوذ ژن بیماری در زنان ۳۰% بود (سه نفر از ۱۰ ناقل، نیستاگموس داشتند). بنابراین، تصمیم گرفته شد که در مرحله اول، ژن FRMD7 در این خانواده با روش غیرمستقیم (Linkage) و مستقیم توالی‌یابی (Sequencing) بررسی شود. با توجه به الگوی وراثتی بیماری و ویژگی‌های بالینی نیستاگموس در این خانواده، نیستاگموس‌های وابسته به X نیز از نظر ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. این خانواده بزرگ دارای حدود ۵۰ عضو بود که ۱۲ بیمار بین آنها وجود داشتند. بیماران و تعدادی افراد سالم این خانواده (۹ بیمار، ۳ حامل و ۵ نرمال) پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی از طریق یک مشاوره ژنتیک استاندارد مطالعه شدند.

استخراج DNA: ۵سی‌سی خون از افراد این خانواده گرفته و در لوله حاوی EDTA نگهداری شد. استخراج DNA با روش ستونی و با استفاده از کیت کیاژن با استفاده از روش نمک اشباع صورت گرفت.

ابتدا، ۲میلی‌لیتر خون بیمار درون یک فالکون ۱۵میلی‌لیتری ریخته و ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر سرد به آن افزوده شد تا به حجم ۱۲میلی‌لیتر برسد و به‌مدت ۱۵دقیقه در ۶۰۰۰rpm در دمای ۸درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس ۱۰میلی‌لیتر از مایع سطح رویی دور ریخته شد و با استفاده از پیپت پاستور رسوب پیپتاژ شد و مجدداً ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر سرد به نمونه افزوده و خوب تکان داده شد تا تمام رسوب در آب حل شود. در ادامه، به‌مدت ۱۵دقیقه در ۶۰۰۰rpm در دمای ۸درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ صورت گرفت. مرحله دوم دو بار دیگر تکرار شد و با همان برنامه سانتریفوژ انجام شد. در مرحله بعد، رسوب به‌خوبی پیپتاژ و ۱۰میلی‌لیتر محلول A روی آن ریخته شد، تا حجم کل به ۱۲میلی‌لیتر برسد. نمونه‌ها سپس در ۶۰۰۰rpm در دمای ۸درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سفیدرنگ باقی ماند و مقدار ۱/۵میلی‌لیتر محلول B به هر نمونه اضافه شد. سپس ۳۰میکرولیتر SDS ۱۰% و ۲۵میکرولیتر پروتئیناز k به غلظت ۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر نمونه افزوده شد و پس از اینکه نمونه‌ها خوب تکان داده شدند، در دستگاه بنماری با دمای ۶۵درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰دقیقه قرار گرفتند. سپس ۵۰۰میکرولیتر NaCl ۵مولار به آنها اضافه و ۲۰دقیقه در یخچال با دمای ۴درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در این مرحله، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵دقیقه در ۴۰۰۰rpm در دمای ۴درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند که اندکی رسوب سفیدرنگ و یک مایع بی‌رنگ تشکیل شد.

یک‌سری فالکون ۱۵میلی‌لیتری جدید به تعداد فالکون‌های قبلی، آماده و اسامی بیماران روی درب و دیواره آنها یادداشت شد. سپس به مقدار ۲میلی‌لیتر الکل ۹۶% سرد در فالکون‌های حاوی نمونه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

ریخته و سطح رویی مایع به یک تیوب ۱۵میلی‌لیتری تمیز دیگر منتقل شد. سپس فالکون‌ها به حالت هشتِ انگلیسی چندبار تکان داده شدند تا کلاف DNA در این مرحله مشاهده شود. در یک میکروتیوب ۱/۵ که از قبل نام بیمار، کد مربوطه، عنوان آزمون و تاریخ استخراج روی درب و دیواره آن نوشته شده بود، ۱۰۰۰میلی‌لیتر الکل ۷۰% ریخته و با سر سمپلر همراه با پیپتاژ آرام، کلاف DNA گرفته و به میکروتیوپ ۱/۵ منتقل شد. نمونه‌ها سپس به‌مدت ۳دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند که باعث ته‌نشینی کلافی به‌صورت رسوب سفیدرنگ در ته میکروتیوپ شد. در این مرحله برای حذف الکل از نمونه، روی آن به‌طور کامل با سمپلر کشیده شد. این نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ تا ۲۰دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند. در نهایت، به نمونه‌ها ۱۰۰ تا ۲۰۰میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند و روز بعد به فریزر منفی ۲۰درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

بررسی کیفیت و کمیت DNA: پس از استخراج DNA لازم است کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده تعیین شود تا غلظت تقریبی DNA به‌دست آید و مقدار DNA مورد نیاز برای انجام آزمایشات بعدی مشخص شود. برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراجی معمولاً از دو روش اسپکتروفتومتری یا الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده می‌شود.

آنالیز جذب UV توسط نوکلئوتیدها تخمین صحیح و ساده‌ای از غلظت اسیدنوکلئیک‌های موجود در یک نمونه را فراهم می‌آورد. زمانی که نمونه DNA، خالص و فاقد مقدار قابل توجهی آلودگی از جمله پروتئین یا حلال‌های آلی است؛ پورین‌ها و پیریمیدین‌ها در اسیدنوکلئیک، حداکثر جذب را در طول موج حدود ۲۶۰نانومتر نشان می‌دهند (برای مثال dATP: ۲۵۹نانومتر؛ dCTP: ۲۷۲ نانومتر؛ dTTP: ۲۴۷نانومتر). برای تعیین خلوص نمونه باید نسبت OD260/OD280 تعیین شود. وجود ناخالصی‌ها یا کم‌بودن بیش از حد DNA در نمونه از انجام آنالیز صحیح می‌شود. برای مثال وجود RNA در نمونه تخمین صحیح مقدار DNA ژنومیک موجود در نمونه را با مشکل مواجه می‌کند.

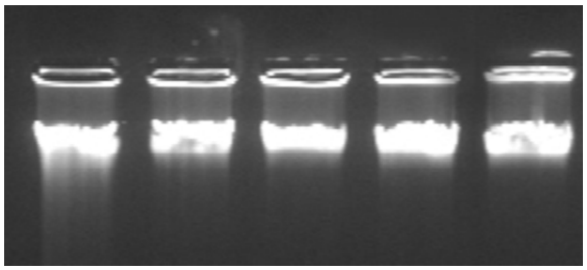
۵۰۰میکرولیتر آب مقطر دوبارتقطیر در کووت ریخته و سپس دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۲۶۰نانومتر و ۲۸۰نانومتر کالیبره شد. ۵میکرولیتر از هر نمونه DNA با آب مقطر دوبارتقطیر به حجم ۵۰۰میکرولیتر رسانده شد و علاوه بر آن، از آب مقطر دوبارتقطیر به‌عنوان نمونه بلانک استفاده شد. مقادیر OD260 و OD280 از روی اسپکتروفوتومتر خوانده شد و نسبت OD260/OD280 محاسبه شد. برای RNA خالص نسبت OD260/OD280، برابر ۲/۲ تا ۲/۳ و برای DNA خالص این نسبت نزدیک ۱/۸ است. افزایش این نسبت معمولاً نشان‌دهنده وجود RNA است که می‌تواند به‌وسیله بررسی نمونه روی ژل آگارز آزمایش صورت گیرد. در این حالت RNA به‌صورت اسمیر مشاهده شده و جلوتر از DNA حرکت می‌کند. نسبت زیر ۱/۸ معمولاً حاکی از وجود آلودگی فنولی یا پروتئینی است. آلودگی فنولی یا پروتئینی همچنین به‌وسیله نسبت OD230/OD260 بزرگ‌تر از ۰/۵ نشان داده می‌شود. هنگامی که اطمینان حاصل شد که نمونه حاوی DNA خالص است، غلظتDNA آن توسط فرمول ۱ محاسبه شد:

فرمول ۱:

$$DNA\ Concentration\ \left(\frac{\mu g}{ml}\right) = OD_{260} \times \frac{100\ (dilution\ factor) \times 50\ \mu g/ml}{1000}$$

به‌وسیله الکتروفورز نمونه روی ژل آگارز کیفیت DNA استخراج‌شده تعیین و مقدار DNA هر نمونه از طریق مقایسه شدت رنگ نمونه با باندهای DNA استاندارد محاسبه و همچنین، وجود یا عدم وجود RNA نیز بدین وسیله تعیین شد. RNA به‌صورت اسمیر و جلوتر از DNA حرکت می‌کند.

نتیجه استخراج DNA: خون بیماران و افراد دارای فنوتیپ طبیعی به روش نمک‌زدن (Salting out) و کیت کیاژن استخراج و برای بررسی کیفیت نمونه‌های استخراج‌شده، ۳میکرولیتر DNA که با روش نمک اشباع استخراج شده بود، روی ژل آگارز ۱/۵% الکتروفورز شد (شکل ۲).



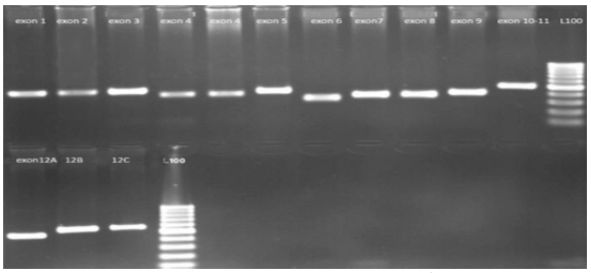
شکل ۲) کیفیت DNA استخراج‌شده از خون: جهت بررسی کیفیت DNA نمونه‌های استخراج‌شده

آنالیز جهش: بررسی جهش با استفاده از توالی‌یابی مستقیم ژن FMRD7 به روش سانگر انجام شد، به‌طوری که ۱۲ اگزون و نواحی اینترونی مجاور بعد از تکثیر با واکنش PCR توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی، تغییرات نوکلئوتیدی را در ژن مورد نظر مشخص کرد. در مواردی که تغییر توالی پیداشده از نوع de novo است، بررسی مارکرها بسیار کمک‌کننده هستند. به عبارت دیگر در صورت پیداشدن یک جهش جدید، پیوستگی بیماری در خانواده با ژن FRMD7، در کنار عدم وجود جهش مورد نظر در یک گروه ۱۰۰نفری کنترل سالم می‌تواند به نفع بیماری‌زابودن جهش باشد. در مواردی که جهش از نوع بیماری‌زا شناخته‌شده باشد نیز به‌راحتی می‌توان علت بیماری را در خانواده تایید کرد. نتایج تعیین توالی مستقیم روی دستگاه ABI 3130x بررسی شد. برای رد این احتمال که جهش شناسایی‌شده در ژن FRMD7 یک پلی‌مورفیسم مختص جامعه است، ما ۱۰۰ کروموزوم از افراد سالم را که از لحاظ قومی همسان با این خانواده بودند به‌وسیله روش محدودکردن بررسی در طول قطعه پلی‌مورفیسم (RFLP) بررسی کردیم که آلل جهش‌یافته در میان این گروه کنترل مشاهده نشد.

یافته‌ها

PCR اگزون‌های ژن FMRD7

کیفیت و اندازه یکایک اگزون‌های ژن FRMD7 روی ژل الکتروفورز ارزیابی شد (شکل ۳).



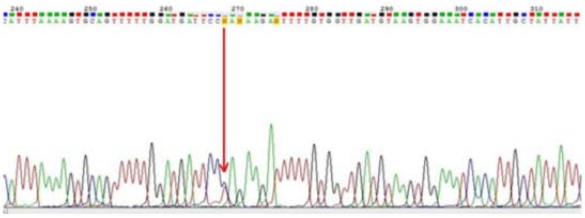
شکل ۳) دیده‌شدن اگزون‌های ژن FMRD 7 به‌عنوان محصول PCR روی ژل آگارز

www.SID.ir

Archive of SID

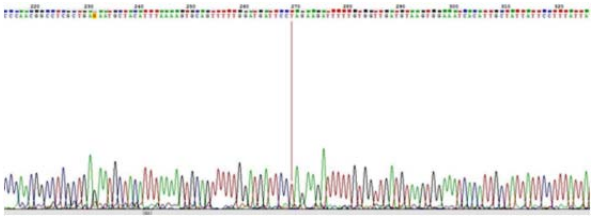
تعیین توالی مستقیم

اگزون شماره ۱ که در بیماران زن حاوی جهش، به‌صورت هتروزیگوت بود و باز آلی سیتوزین در یک آلل به تیمین تبدیل شده است (شکل ٤).



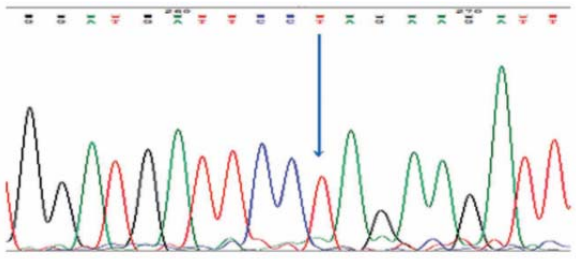
شکل ٤) تغییر سیتوزین به تیمین در جهش ایجادشده در زن مبتلا به نیستاگموس

همچنین اگزون شماره ۱ در بیماران مرد که حاوی جهش (تبدیل سیتوزین به تیمین) بودند (شکل ٥).



شکل ٥) جهش و تغییر اسیدآمینه سیتوزین به تیمین در مرد مبتلا به نیستاگموس

بررسی تمام اگزون‌های کدکننده و نواحی اینترونی غیرکدکننده حاکی از وجود یک تغییر نوکلئوتیدی در نوکلئوتید شماره ۳۷ ژن FRMD7 بود. این موتاسیون در اگزون شماره یک واقع است. بررسی بیوانفورماتیک این موتاسیون حاکی از پاتوژن‌بودن این موتاسیون بود. این تغییر نوکلئوتید پیش از این گزارش نشده بود (شکل ٦).



شکل ٦) موتاسیون و تغییر توالی اسیدآمینه

تغییر سیتوزین به تیمین در نوکلئوتید شماره ۳۷ (c.37C→T) منجر به عدم ترجمه آمینواسید گلوتامین شده که منجر به تبدیل‌شدن به کردن پایان (Amb) در موقعیت ۱۳ می‌شود (Q13X) و نوعی تغییر بی‌معنی بود. این تغییر موجب ایجاد نوعی پروتئین ناقص می‌شود که به‌سرعت از بین می‌رود. بقیه مناطق کدکننده ژن FRMD7 در این خانواده، دارای موتاسیون نبود.

بحث

نیستاگموس مادرزادی ایدیوپاتیک شایع‌ترین بیماری چشم است و بیماران مبتلا به‌طور معمول دارای مشکلات بینایی نیز هستند. در این نوع توارث نیستاگموس خانوادگی، تاکنون دو ژن FRMD7 و GPR143 بررسی شده است که احتمالا هر دو بیماری‌زا هستند[18]. این دو ژن روی کروموزوم X واقع شده‌اند. علاوه بر این، بررسی‌های جدید نقش ژن‌های دیگر را در موارد نیستاگموس مادرزادی همراه با علایم دیگر نشان داده است. به‌تازگی *واتکینز* و همکاران نشان داده‌اند که موتاسیون در ژن CASK می‌تواند منجر به نیستاگموس مادرزادی همراه با عقب‌افتادگی ذهنی در پسران مبتلا شود[19].

خانواده مورد بررسی در این مطالعه مبتلا به نوع وابسته به جنس یا XLICN بودند، هر چند در این خانواده بعضی از زنان نیز مبتلا به بیماری بودند. اگرچه شدت بیماری در زنان کمتر از افراد مردان است اما با توجه به شیوع و فنوتیپ شدیدتر در مردان توارث وابسته به کروموزوم X مغلوب بیشتر مورد توجه قرار گرفت. در این خانواده نشان داده شد که ژن FRMD7 دارای موتاسیون بود. این بررسی تاکید مجددی بر نقش این ژن در بیماری‌زایی نیستاگموس مادرزادی در جامعه ایرانی بود. همچنین این نتایج تاکید مکرری بر هتروژن‌بودن بیماری نیستاگموس مادرزادی دارد.

تعیین توالی نسل دوم و سوم روش‌هایی هستند که احتمالاً در شناسایی موتاسیون در بیماری‌های هتروژن بسیار کمک‌کننده هستند و این بررسی‌ها تاکنون در مطالعات متعددی روی نیستاگموس مادرزادی انجام شده است. محققان نشان داده‌اند که با استفاده از NGS می‌توان با سهولت بیشتر به شناسایی موتاسیون پرداخت. باید توجه داشت که در مواردی که بیماری هتروژن است و فنوتیپ ژنوتیپ‌های مختلف کمک‌کننده نیست، بررسی‌ها و غربالگری‌های موتاسیون‌ها با استفاده از تکنیک‌های جدید بسیار کمک‌کننده است.

در این بررسی سکانس توالی تعیین‌شده در ژن مادر سالم و عمه بیمار فرد مذکور نشان داد که هر دو برای این جهش هتروزیگوت بودند. با فرض اینکه تحریف اثر X-inactivation بروز کروموزوم‌های جهش‌یافته در مورد عمه را تقویت می‌کند، نحوه وراثت در این خانواده با الگوی وراثتی وابسته به جنس مغلوب سازگار خواهد بود. آنالیز توالی با سکانس مستقیم ژن FMRD7 می‌تواند یک جهش بیماری‌زا در ۹٤-۸۳% نیستاگموس مربوط به کودکی را در ژن FRMD7 (FIN) شناسایی کند. آنالیز جهش‌های حذفی و دابل، یک جهش بیماری‌زا در یک بخش کاملا شناخته‌نشده از ژن بیماران را شناسایی می‌کند[20]. پنجاه و دو جهش بیماری‌زا تا به حال در بیماران مبتلا به FIN یافت شده است[21].

مطالعه‌ای در بیماران ایرانی مبتلا به نیستاگموس مادرزادی وجود ندارد و ما جهش c.37C>T nonsense را که می‌تواند به‌عنوان یک جهش بیماری‌زا در نظر گرفته شود، در این خانواده شناسایی کردیم که این جهش تا به حال در مقالات گزارش نشده است. از آنجا که ما موفق به شناسایی یک جهش جدید (c.37C>T) در حجم نمونه شامل فقط یک خانواده ایرانی شدیم؛ بر این اساس، جمعیت ایران ممکن است یک منبع غنی برای تشخیص جهش‌های بیشتر و حتی ژن‌های مربوط به بیماری نیستاگموس مادرزادی باشد. مطالعات با حجم نمونه بیشتر در بیماران ایرانی مبتلا به نیستاگموس مادرزادی برای ارزیابی شیوع این جهش و دیگر جهش‌های ژن FRMD7 یا حتی سایر ژن‌های مربوط به نیستاگموس مادرزادی و به‌منظور بهبود کیفیت مشاوره ژنتیک نیاز است. انجام این پروژه تحقیقاتی منجر به راه‌اندازی بررسی ژنتیکی ژن FRMD7 در ایران شده است. شایان ذکر است که بیماری

www.SID.ir

Archive of SID

نیستاگموس فامیلی ناشی از جهش در ژنFRMD7 بیماری است که با تشخیص قبل از تولد نمی‌توان اقدام به سقط درمانی جنین کرد. روش PGD روش مناسبی برای جلوگیری از این بیماری است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه منجر به شناسایی موتاسیون c.37C>T شد که تا به حال گزارش نشده است. جهش، منجر به تغییر باز آلی سیتوزین به تیمین می‌شود که موجب عدم ترجمه آمینواسید گلوتامین می شود که تولید پروتئین ناقصی را به دنبال خواهد داشت و به آسانی از بین می رود.

تشکر و قدردانی: از همکاران دپارتمان ژنتیک بیمارستان فوق تخصصی صارم کمال تشکر را داریم.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع مالی: پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم و مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم منابع مالی این تحقیق را تامین کرده است.

سهم نویسندگان: محمد احمدوند (نویسنده اول)، نگارنده مقاله/پژوهشگر اصلی/ نگارنده بحث (۲۰%)؛ مائده مشهدی‌خان (نویسنده دوم)، نگارنده مقاله/پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ یوسف شفقتی (نویسنده سوم)، نگارنده مقاله/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/ نگارنده بحث (۳۰%)؛ مهرداد نوروزی نیا (نویسنده چهارم)، نگارنده مقاله/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/ تحلیل‌گر آماری/ نگارنده بحث (٤٠%)

منابع

1- Gomez CM, Thompson RM, Gammack JT, Perlman SL, Dobyns WB, Truwit CL, et al. Spinocerebellar ataxia type 6: Gaze-evoked and vertical nystagmus, Purkinje cell degeneration, and variable age of onset. Ann Neurol. 1997;42(6):933-50.

2- Takemori S, Cohen B. Loss of visual suppression of vestibular nystagmus after flocculus lesions. Brain Res. 1974;72(2):213-24.

3- Naegele JR, Held R. The postnatal development of monocular optokinetic nystagmus in infants. Vision Res. 1982;22(3):341-6.

4- Norn M. Congenital idiopathic nystagmus. Acta Ophthalmol. 1964;42(4):889-96.

5- Cabot A, Rozet JM, Gerber S, Perrault I, Ducroq D, Smahi A, et al. A gene for X-linked idiopathic congenital nystagmus (NYS1) maps to chromosome Xp11.4-p11.3. Am J Hum Genet. 1999;64(4):1141-6.

6- Kerrison JB, Vagefi MR, Barmada MM, Maumenee IH. Congenital motor nystagmus linked to Xq26-q27. Am J Hum Genet. 1999;64(2):600-7.

7- Ragge N, Hartley C, Dearlove A, Walker J, Russell-Eggitt I, Harris C. Familial vestibulocerebellar disorder maps to chromosome 13q31-q33: A new nystagmus locus. J Med Genet. 2003;40(1):37-41.

8- He X, Gu F, Wang Y, Yan J, Zhang M, Huang S, et al. A novel mutation in FRMD7 causing X-linked idiopathic congenital nystagmus in a large family. Mol Vis. 2008;14:56-60.

9- Kerrison JB, Giorda R, Lenart TD, Drack AV, Maumenee IH. Clinical and genetic analysis of a family with X-linked congenital nystagmus (NYS1). Ophthalmic Genet. 2001;22(4):241-8.

10- Zhang B, Xia K, Ding M, Liang D, Liu Z, Pan Q, et al. Confirmation and refinement of a genetic locus of congenital motor nystagmus in Xq26.3-q27.1 in a Chinese family. Hum Genet. 2005;116(1-2):128-31.

11- Tarpey P, Parnau J, Blow M, Woffendin H, Bignell G, Cox C, et al. Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. Am J Hum Genet. 2004;75(2):318-24.

12- Tarpey P, Thomas S, Sarvananthan N, Mallya U, Lisgo S, Talbot CJ, et al. Mutations in FRMD7, a newly identified member of the FERM family, cause X-linked idiopathic congenital nystagmus. Nat Genet. 2006;38(11):1242-4.

13- Li N, Wang L, Cui L, Zhang L, Dai S, Li H, et al. Five novel mutationsof the FRMD7 gene in Chinese families with X-linked infantile nystagmus. Mol Vis. 2008;14:733-8.

14- Zhang X, Ge X, Yu Y, Zhang Y, Wu Y, Luan Y, et al. Identification of three novel mutations in the FRMD7 gene for X-linked idiopathic congenital nystagmus. Sci Rep. 2014;4:3745.

15- Song FW, Chen BB, Sun ZH, Wu LP, Zhao SJ, Miao Q, et al. Novel mutation c.980_983delATTA compound with c.986C>A mutation of the FRMD7 gene in a Chinese family with X-linked idiopathic congenital nystagmus. J Zhejiang Univ Sci B. 2013;14(6):479-86.

16- Hackett A, Tarpey PS, Licata A, Cox J, Whibley A, Boyle J, et al. CASK mutations are frequent in males and cause X-linked nystagmus and variable XLMR phenotypes. Eur J Hum Genet. 2010;18(5):544-52.

17- Shiels A, Bennett TM, Prince JB, Tychsen L. X-linked idiopathic infantile nystagmus associated with a missense mutation in FRMD7. Mol Vis. 2007;13:2233-41.

18- Hu J, Liang D, Xue J, Liu J, Wu L. A novel GPR143 splicing mutation in a Chinese family with X-linked congenital nystagmus. Mol Vis. 2011;17:715-22.

19- Watkins RJ, Patil R, Goult BT, Thomas MG, Gottlob I, Shackleton S. A novel interaction between FRMD7 and CASK: Evidence for a causal role in idiopathic infantile nystagmus. Hum Mol Genet. 2013;22(10):2105-18.

20- Thomas MG, Thomas S, Kumar A, Proudlock F, Gottlob I. FRMD7-Related infantile nystagmus [Internet]. GeneReviews [Updated 2011 September 29; Cited 2015 December 11]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3822/.

21- AlMoallem B, Bauwens M, Walraedt S, Delbeke P, De Zaeytijd J, Kestelyn P, et al. Novel FRMD7 Mutations and Genomic Rearrangement Expand the Molecular Pathogenesis of X-Linked Idiopathic Infantile Nystagmus. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56(3):1701-10

www.SID.ir