

شناسایی جهش های ژن سیستاتین B در بیماران مبتلا به صرع منتشر ایدیوپاتیک در استان چهارمحال و بختیاری

زینب امینی فارسانی^۱، دکتر علی محمد احدی^۲، دکتر حسین تیموری^{۳*}، دکتر علی حائری روحانی^۴، ثریا حیدری^۲
^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران؛ ^۲گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛
^۳مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۴گروه زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲ اصلاح نهایی: ۹۱/۴/۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: ژن سیستاتین B (*cstB*) کد کننده پروتئینی است که مهار کننده فعالیت پروتئاز آیزیم های کاتپسین می باشد. جهش در این ژن یکی از علل بروز صرع منتشر ایدیوپاتیک است. این مطالعه با هدف غربالگری تمام جهش های شناخته شده و همچنین جهش های جدید در ژن *cstB* در بیماران مبتلا به صرع منتشر ایدیوپاتیک در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی به بررسی جهش ها در آگزون های ۱ تا ۳ و ناحیه پروموتوری ژن *cstB* در ۳۵ بیمار مبتلا به صرع منتشر ایدیوپاتیک پرداخته است. DNA با روش استاندارد فنل-کلروفورم استخراج شد، سپس با استفاده از تکنیک PCR-SSCP تمام جهش های این ژن غربالگری و موارد مشکوک تعیین توالی شدند.

یافته ها: در یکی از نمونه ها جهش نقطه ای $c.48C > T$ مشاهده شد که تاکنون شناخته نشده بود. انجام بررسی های بیوانفورماتیکی بر روی این نمونه مشخص نمود که این تغییر در ناحیه ایترونی ژن *cstB* و دور از جایگاه پیرایش رخ داده است.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نقش ژن سیستاتین B در ایجاد صرع منتشر ایدیوپاتیک در جمعیت مورد مطالعه ضعیف است.

واژه های کلیدی: جهش، صرع، ژن سیستاتین B.

مقدمه:

نورون ها در تمامی کورتکس مغز می باشند. در این عارضه تشنجات سراسری با فعالیت الکتریکی غیر طبیعی در هر دو نیم کره مغز شروع می شود و در اکثر موارد هوشیاری از بین می رود (۴). هنوز علت این نوع صرع ها مشخص نشده است و احتمالاً در بروز آن ها عوامل ژنتیکی دخالت دارند (۵،۴). یکی از ژن هایی که در بروز IGE دخیل می باشد ژن سیستاتین B (*Cystatin B*) است. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۲۱ (21 q 22.3) قرار داشته و

صرع یکی از شناخته شده ترین و شایع ترین اختلالات دستگاه عصبی است که بعد از انواع سکنه مغزی و قلبی، بیشترین فراوانی را در جوامع انسانی دارد. بیش از ۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به بیماری صرع هستند (۲،۱). البته این میزان در جوامع مختلف انسانی یکسان نیست و به نوعی بیانگر و تأیید کننده نقش عوامل ژنتیکی در بروز صرع می باشد (۳). صرع های منتشر ایدیوپاتیک (*Idiopathic Generalized Epilepsy =IGE*) گروهی از صرع ها هستند که حاصل فعال شدن

*نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۹۲

در استان چهارمحال و بختیاری پرداخته است.

روش بررسی:

این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی یک عملیات غربالگری در مورد جهش های ژن *cstB* در بیماران مبتلا به IGE در سال ۱۳۹۰ بود. پس از بررسی ها و مطالعات اولیه از تعداد زیادی خانواده در استان چهارمحال و بختیاری که در آن ها نوع خاصی از صرع مشاهده شده بود، ۳۵ فرد مبتلا به IGE انتخاب شدند. شاخصه اصلی انتخاب بیماران وجود سابقه فامیلی مثبت و نفی هر عامل فیزیکی یا عامل مشخص دیگر در بروز صرع آن ها بوده است. در این بررسی علاوه بر پیشینه ی فامیلی، سابقه تب و ابتلا به برخی بیماری ها نظیر عفونت های ویروسی و باکتریایی، سوانح مختلف، نحوه تولد و مشکلات احتمالی زمان تولد، داروهای مصرفی و رفتار بیمار در پاسخ به دارو، سن شروع بیماری، تناوب حملات و نظر متخصص مربوطه در مورد (Electro Encephalo Gram=EEG) و (Magnetic Resonance Image = MRI) در نظر گرفته شد (۱۸). از افراد خون گیری به عمل آمد و نمونه های خون در شرایط سرما و EDTA با غلظت ۰/۵ مولار به عنوان ماده ضد انعقاد به آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد منتقل شدند. با به کارگیری روش فنل- کلروفورم، DNA ژنومی از گلبول های سفید نمونه ها استخراج شد (۱۹).

در مرحله بعد جهت تکثیر اگزون های ۱ تا ۳ و ناحیه پروموتوری ژن *cstB* چهار جفت پرایمر طراحی گردید (جدول شماره ۱) و کیفیت آن ها به وسیله ی نرم افزار Gene Runner تایید شد و جهت سنتز به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد.

مواد و مقادیر مورد نیاز برای هر نمونه واکنش PCR شامل $2/5 \mu\text{l}$ MgCl_2 (50mM)، $2/5 \mu\text{l}$ بافر PCR (10X)، 10 mM ، $\text{PH}=7.5$ dNTP، $0/5 \mu\text{l}$ R Primer (10 PM)، $0/5 \mu\text{l}$ F Primer (10 PM)

از ۳ اگزون کوتاه و ۲ اینترون تشکیل شده است. پروموتور این ژن در موقعیت ۲۱۰-۱۷۴- قرار داشته و غنی از بازهای گواین (G) و سیتوزین (C) است (۶). پروتئین کد شده توسط ژن *cstB*، ۹۸ اسید آمینه دارد و وزن مولکولی آن حدوداً ۱۱ کیلو دالتون است. این پروتئین به طور گسترده در اکثر انواع سلول ها و بافت های بدن توزیع شده است و مهار کننده سیستمین پروتئازهای خانواده کاتپسین ۳ است (۷-۹).

مطالعات گوناگونی در نقاط مختلف دنیا در ارتباط با نقش *cstB* در بروز صرع IGE انجام شده است و تاکنون ۱۰ جهش مختلف مانند حذف، گسترش و جهش های نقطه ای در *cstB* شناسایی شده است (۱۰-۱۲). اثر جهش های ذکر شده بر روی پروتئین *cstB* متفاوت است. در ناحیه پروموتوری ژن *cstB* افراد سالم ۲ تا ۳ نسخه از توالی تکراری 5'-GCG CCC CGC CCC-3' در فاصله ۱۷۵ bp بالا دست کدون آغاز وجود دارد اما در افراد بیمار این توالی ۳۰ تا ۱۵۰ بار گسترش یافته است که موجب از بین رفتن فاصله اجزای پروموتور از مکان شروع رونویسی و مهار رونویسی ژن *cstB* می شود (۱۳، ۱۴). جهش های حذفی و نقطه ای نیز موجب حذف یا تغییر اسیدهای آمینه ای می شوند که در اتصال پروتئین *cstB* به کاتپسین B دخالت دارند، لذا باعث کاهش گرایش اتصال *cstB* به کاتپسین B می شود که در پی آن فعالیت پروتئازی کاتپسین B توسط *cstB* مهار نخواهد شد و بیماری صرع ایجاد می شود (۱۷-۱۵).

بیماری صرع در ایران بسیار شایع است. در ایران مطالعات اندکی بر روی زمینه ژنتیکی بیماری صرع انجام شده است و در مورد نقش ژن *cstB* تاکنون مطالعه ای صورت نگرفته است، لذا این مطالعه به بررسی تمام جهش های شناخته شده و همچنین جهش های جدید ژن *cstB* به روش PCR - SSCP در تعدادی از بیماران مبتلا به صرع منتشر ایدیوپاتیکی

59-66°C انجام شد (جدول شماره ۲). سپس محصولات PCR بدست آمده بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (Merck – Germany) تحت جریان ۵۰ میلی آمپر به مدت یک ساعت الکتروفورز و با استفاده از روش نیترا نقره رنگ آمیزی شدند.

Taq DNA Polymerase 0/1 µl (5 u/µl) و 1 µl از DNA (100 ng) بودند که با ddH₂O به حجم 25 µl رسانده شدند. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (ASTEPC PC 818-Japan) در شرایط دمایی بهینه شامل ۳۳ سیکل، دمای واسرشت شدن 94-96°C، دمای ساخت 72°C و دمای اتصال

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده برای انجام واکنش های زنجیره ای پلی مرز ژن *cstB*

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه هدف
EF1	5' – GCAGGGGACTCCGAAGCC – 3'	212bp
ER1	5' – ACCTGGTCGGCGATGTGC – 3'	
EF2	5' – TGCGTGCAAGTTACTCTAGC – 3'	180bp
ER2	5' – CCCACACTCTACCTTGATG – 3'	
EF3	5' – ACTCCGCTCTCTTCCCAG – 3'	208bp
ER3	5' – CTGGTAGACGGAGGATGAC – 3'	
PF	5' – CCCGAAAGACGATACCAG – 3'	195bp
PR	5' – GGGAGGAGGCACTTTGGC – 3'	

F: پرایمر Forward . R: پرایمر Reverse . E: اگزون . P: پرموتور . *cstB*: (ژن سیتاتین B)

Bromophenol Blue 1mg ،Ylen Cyanol 1 mg/ml مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 96°C حرارت داده تا دو رشته ای های DNA به صورت تک رشته تبدیل شوند برای جلوگیری از بازگشت تک رشته های DNA و دو رشته ای شدن آن ها، بلافاصله نمونه ها با استفاده از یخ سرد گردید (۲۰).

محصولات PCR با روش SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) بررسی شدند. ناحیه پرموتوری فقط از نظر تفاوت اندازه محصولات PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام SSCP ابتدا ۵ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه را با ۴ میکرولیتر محلول حاوی Loading Buffer 1X (حاوی 90% Formamid، EDTA 10µl (PH=8)،

جدول شماره ۲: برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش های زنجیره ای پلی مرز ژن *cstB*

طویل شدن		چسبیدن		واسرشت		مراحل نام قطعه
زمان	دما	زمان	دما	زمان	دما	
20sec	72°C	30sec	60°C	30sec	94°C	اگزون ۱
30sec	72°C	25sec	59°C	30sec	94°C	اگزون ۲
50sec	72°C	45sec	66°C	30sec	94°C	اگزون ۳
30sec	72°C	1 min	65°C	1 min	95°C	پرموتور

cstB: (ژن سیتاتین B)

جدول شماره ۳: شرایط بهینه برای الکتروفورز SSCP محصولات واکنش زنجیره ای پلی مرز ژن *cstB*

اگزون	دما (°C)	ولتاژ v زمان	زمان (min)	غلظت ژن (درصد)
۱	۱۰	۲۲۰	۱۲	۱۰
۲	۱۰	۲۸۰	۹	۱۲
۳	۱۰	۲۵۰	۸	۱۰

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism، *cstB*: (ژن سیستاتین B)

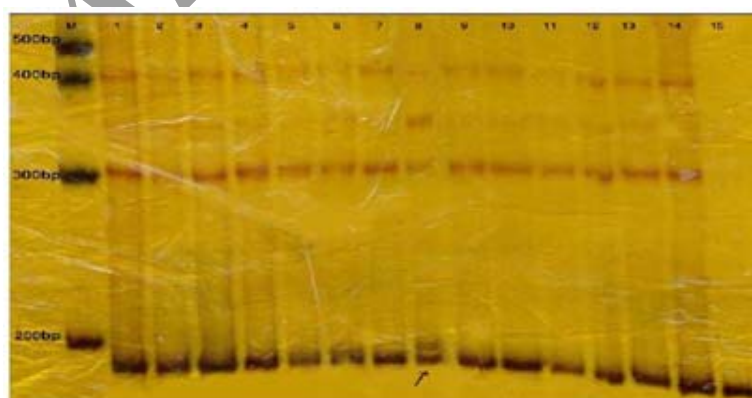
جدیدی رویت و این نمونه مشکوک به وجود جهش تشخیص داده شد (تصویر شماره ۱).

بررسی نتیجه تعیین توالی در نمونه ای که اگزون شماره ۲ درگیر شده بود، جهش نقطه ای $c.48C > T$ را نشان داد که پس از انجام بررسی های بیوانفورماتیکی با استفاده از نرم افزار Chromas و سرور BLAST بر روی این نمونه، مشخص شد که این تغییر در ناحیه ایترونی ژن *cstB* رخ داده است (تصویر شماره ۲). در مورد بقیه اگزون ها هیچ گونه شیفت و اختلاف الگو بر روی ژل های پلی آکریل آمید مشاهده نشد. محصولات PCR ناحیه پروموتوری نیز که از نظر اندازه مقایسه شدند هیچ گونه تغییر محسوسی را نشان ندادند.

سپس نمونه ها را بر روی ژل بارگذاری شدند (جدول شماره ۳) پس از پایان الکتروفورز باندهای DNA با استفاده از روش نیتراٹ نقره رنگ آمیزی شدند. جهت اطمینان از نتایج، آزمایش های SSCP در شرایط دمایی و غلظت های بافری مختلف تکرار شد. نمونه هایی که روی ژل SSCP مشکوک به وجود جهش تشخیص داده شدند، جهت بررسی توالی DNA به شرکت ژن فن آوران فرستاده شدند.

یافته ها:

محصولات PCR در شرایط واسرشتگی و بافر (TBE) (Tris/Borate/EDTA) با قدرت های مختلف یونی مورد بررسی SSCP قرار گرفتند که در یکی از نمونه های اگزون ۲، روی ژل SSCP شکل فضایی

**تصویر شماره ۱: نمونه ای از ژل SSCP مربوط به اگزون ۲ ژن *cstB*.**

ژل آکریل آمید ۱۲٪، M مارکر اندازه DNA، ستون های ۱ تا ۱۴ نمونه های مربوط به بیماران می باشند. نمونه ۸ که با نوک پیکان نشان داده شده است نمونه ای است که در آن تغییر مشاهده شده و الگوی کنفورمرها و هترو دوپلکس متفاوتی با سایر نمونه ها دارد. نمونه ۱۵ کنترل منفی است.

الف

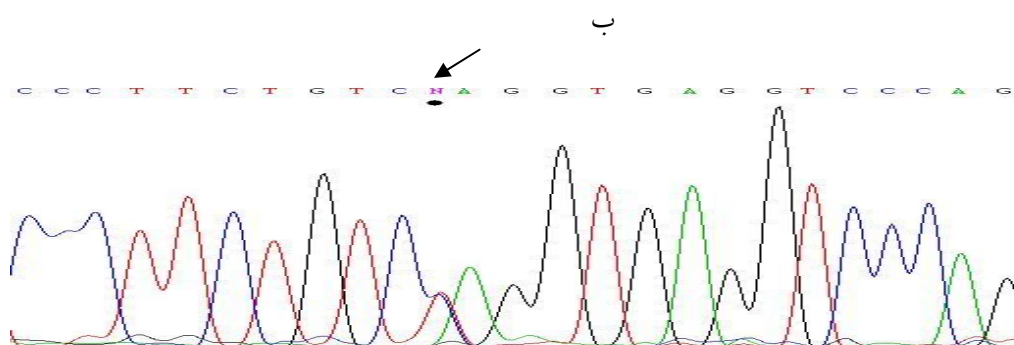
↓

```

16      ACTGAGACATCCTCATTCTGTGCCCTTCTGTCTAGGTTGAGGTCCCAGCTTGAAGAGAAAGA 75
      |||
2189115 ACTGAGACATCCTCATTCTGTGCCCTTCTGTCTAGGTTGAGGTCCCAGCTTGAAGAGAAAGA 2189056

76      AAACAAGAAGTTCCTGTGTTTAAAGGCCGTGTCATTCAAGAGCCAGGTGGTCGCGGGGAC 135
      |||
2189055 AAACAAGAAGTTCCTGTGTTTAAAGGCCGTGTCATTCAAGAGCCAGGTGGTCGCGGGGAC 2188996

136     AACTACTTTCATCAA 150
      |||
2188995 AACTACTTTCATCAA 2188981
    
```



تصویر شماره ۲: الف: BLAST انجام شده بین توالی نرمال و جهش یافته در اگزون ۲، ژن *cstB*، ب: کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه مشکوک. نوک پیکان جایگاه جهش را نشان می دهد. ژن *cstB* (ژن سیستاتین B).

بحث:

صرع در نقاط مختلف دنیا به ویژه در کشورهای فنلاند و آمریکا انجام شده است، اما بر اساس بررسی های محققین این مقاله در کشور ایران تاکنون هیچ گونه بررسی بر روی نقش ژن *cstB* در ایجاد صرع انجام نشده است. مطالعه بر روی ۱۰ بیمار (۵ پسر و ۵ دختر) مبتلا به EPM1 نشان داد که در همه بیماران جهش گسترش توالی تکراری در ژن *cstB* وجود دارد و بین شدت علائم بیماری و سن شروع بیماری با اندازه توالی تکراری رابطه ای وجود ندارد (۱۳). در دیگر مطالعه نشان داده شده است که گسترش ناپایدار مینی ساتیلایت در ناحیه پروموتوری ژن *cstB* شایع ترین جهش در بیماران EPM1 است و منجر به کاهش سطح mRNA می شود (۱۶). Pataskar و همکارانش نشان دادند که توالی های تکراری در ناحیه پروموتوری ژن *CstB*، ساختارهای ثانویه

صرع یکی از شایع ترین اختلالات دستگاه عصبی در ایران است. بعد از انواع سکنه مغزی و قلبی بیشترین فراوانی را در جامعه دارد. عوامل محیطی و ژنتیکی هر دو در بروز صرع دخیل می باشند. یکی از تغییرات ژنتیکی مسبب صرع، جهش در ژن *cstB* است و در این تحقیق غربالگری جهش های ژن *cstB* در اگزون های ۱ تا ۳ و ناحیه پروموتوری در ۳۵ بیمار مبتلا به صرع منتشر ایدیوپاتییک در شهر شهرکرد در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که یک تغییر نقطه ای در ناحیه اینترونی ژن *cstB* در کل نمونه های مورد مطالعه رخ داده است که پس از انجام بررسی های بیوانفورماتیکی مشخص شد که این تغییر در ناحیه اینترونی ژن *cstB* رخ داده است.

مطالعات گوناگونی بر روی نقش ژن *cstB* در بروز

پایداری تحت شرایط فیزیولوژیکی تشکیل می دهند که باعث تسهیل سرخوردن آنزیم DNA پلی مرز در هنگام همانند سازی و گسترش توالی تکراری می شوند (۲۱).

Joensuu و همکاران در کشور فنلاند دو جهش جدید $c.149-G > A$ و $c.168+1-18 del$ را که به ترتیب منجر به جایگزینی و حذف اسیدهای آمینه مهم در اتصال سیستاتین B به کاپتسین B می شود را در بیماران مبتلا به صرع ایدیوپاتیک منتشر گزارش کردند (۱۲). همچنین در مطالعه ای که de Haan و همکاران انجام دادند جهش نقطه ای $c.212 A > C$ را در اگزون ۳ ژن *cstB* گزارش کردند که منجر به جایگزینی گلوتامین با پرولین و کاهش اتصال سیستاتین B به کاپتسین B می شود (۱۵). همه این مطالعات به وضوح نقش ژن *cstB* را در ایجاد بیماری صرع نشان می دهند در مطالعه حاضر جهش نقطه ای $c.48C > T$ در ناحیه اینترونی و دور از جایگاه پیرایش ژن *cstB* یافت شد که به نوعی بیانگر نقش ضعیف جهش های ژن *cstB* در ایجاد صرع منتشر ایدیوپاتیک در استان چهارمحال و بختیاری می باشد. با این وجود نوع روش آزمایش و تکنیک شناسایی جهش نیز دارای اهمیت زیادی است. روش SSCP برای بررسی جهش در اگزون های این ژن تنظیم شده است و با توجه به هزینه مناسب و حساسیت بالای آن، روشی مناسب برای بررسی جهش های احتمالی در این ژن می باشد (۲۲). این روش بسیار حساس و دقیق است و در شرایط آزمایشگاهی بین ۷۰ تا ۹۰ درصد کارآیی دارد. این

روش تحت تاثیر شرایط آزمایشگاهی متغیر است و البته مهارت و روش کار محقق در نتیجه و دقت آن بی تاثیر نیست (۲۳). همچنین کارآیی روش با تکرار آزمایش برای نمونه های مشکوک تحت شرایط آزمایشی مختلف (تغییر ولتاژ و شرایط یونی) قابل افزایش است و حتی الامکان تعیین جهش حتی در حد ۱۰۰ درصد را نیز فراهم می سازد. در این مطالعه در نمونه هایی که به عنوان موارد مشکوک به جهش یا پلی مورفیسم در نظر گرفته شد، SSCP دوباره تکرار شد و تکرار دوباره SSCP برای هر نمونه اطمینان ما را از صحت نتایج تا حد زیادی بالا برد و از طرفی تعیین توالی نمونه های فوق صحت نتایج را تایید کرد.

نتیجه گیری:

نتایج این تحقیق نشان داد که در ۳۵ بیمار مبتلا به صرع منتشر ایدیوپاتیک در شهر شهرکرد در استان چهارمحال و بختیاری ارتباط بین صرع منتشر ایدیوپاتیک با جهش های ژن *cstB* ضعیف می باشد و تنها جهش نقطه ای $c.48C > T$ در ناحیه اینترونی ژن *cstB* یافت شد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کلیه اساتید و کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی - مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و هم چنین گروه ژنتیک دانشگاه شهرکرد و جناب آقای دکتر جعفر مهدی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع:

1. Seyferied T. Review of mouse mutant as models of epilepsy. *Epilepsia*. 1985; 26(11): 143-5.
2. Neligan A, Sander JW. The incidence and prevalence of epilepsy. *J Curr Opin Neurol*. 2011; 1-7.
3. Gardiner RM. Impact of our understanding of the genetic aetiology of epilepsy. *J Neurol*. 2000 May; 247(5): 327-34.

4. Manford M, Cock H. Assessment and investigation of possible epileptic seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 70: 3-8.
5. Parton M, Cockerell C. Epilepsy-the aetiology and pathogenesis. *Am J Hosp Pharm*. 2003; 10: 288-95.
6. Lalioti MD, Mirotsoy M, Buresi C, Peitsch MC, Rossier C, Ouazzani R, et al. Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the unverricht-lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Am J Hum Genet*. 1997; 60(2): 342-51.
7. Barret AJ, Kirschke H. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *J Methods Enzymol*. 1981; 80: 771-8.
8. Rabzelj S, Turk V, Zerovnik E. In vitro study of stability and amyloid- fibril formation of two mutants of human stefin B (cystatin B) occurring in patients with EPM1. *Protein Sci*. 2005 Oct; 14(10): 2713-22.
9. Lalioti MD. The epilepsy, the protease inhibitor and the dodecamer: progressive myoclonus epilepsy, cystatin B and a 12-mer repeat expansion. *Cytogenet Genome Res*. 2003; 100(1-4): 213-23.
10. Polajnar M, Ceru S, Kopitar-Jerala N, Zerovnik E. Human stefin B normal and pathophysiological role: molecular and cellular aspects of amyloid-type aggregation of certain EPM1 mutants. *Front Mol Neurosci*. 2012; 5(88): 1-7.
11. Joensuu T, Lehesjoki A. Molecular background of EPM1- unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia*. 2008; 49(4): 557-63.
12. Joensuu T, Kuronen M, Alakurtti K, Tegelberg S. Cystatin B: mutation deletion, alternative splicing and expression in progressive myoclonus epilepsy of unverricht-lundborg type (EPM1) patients. *Eur J Hum Genet*. 2007 Feb; 15(2): 185-93.
13. Santoshkomar B, Turnbull J. Unverricht-lundborg progressive myoclonus epilepsy in Oman. *Pediatr Neurol*. 2008 Apr; 38(4): 252-5.
14. Polajnar M, Zerovnik E. Impaired autophagy: a link between neurodegenerative disease and progressive myoclonus epilepsies. *Trends Mol Med*. 2011 Jun; 17(6): 293-300.
15. De Haan G, Doelman J, Geesink H, Augustijn P, Jager-Jongkind A. Unverricht-Lundborg Disease: Underdiagnosed in the Netherlands. *Epilepsia*. 2004; 45(9): 1061-3.
16. Alakurtti K, Weber E, Rinne R, Theil G. Loss of lysosomal association of cystatin B proteins representing progressive myoclonus epilepsy, EPM1, mutations. *Eur J Hum Genet*. 2005 Feb; 13(2): 208-15.
17. Ramachandran N, Girard JM, Turnbull J, Minassian BA. The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes. *Epilepsia*. 2009 May; 50(Suppl 5): 29-36.
18. This document is available on-line at www.ivis.Org. Document number B0230.0302.
19. Dale JW, Schants MV. Purification and separation of nucleic acid in: from Genes to genomes. Surrey: John Wiley; 2002.
20. Bepalova IN, Adkins S, Pranzatelli M, Burmeister M. Novel cystatin B mutation and diagnostic PCR assay in unverricht-lundborg progressive myoclonus epilepsy patient. *Am J Med Genet*. 1997; 74(5): 467-71.
21. Pataskar SS, Dash D, Brahmachari SK. Progressive myoclonus epilepsy [EPM1] repeat d (CCCCGCCCGCG) forms folded hairpin structures at physiological pH. *J Biomol Struct Dyn*. 2001 Oct; 19(2): 293-305.

22. Orita M, Iwahana H, Kanazawa. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 Apr; 86(8): 2766-70.
23. Glavac D, Dean M. Optimization of the single- strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. J Hume mutant. 1993; 2(5): 404-14.

Archive of SID

Investigation of mutation in cystatin B gene in patients affected by idiopathic generalized epilepsy in Chaharmahal and Bakhtiari province

Amini-Farsani Z (MSc)¹, Ahadi AM (PhD)², Teimori H (PhD)^{3*}, Haeri-Ruhani A (PhD)⁴,
Heidari S (MSc)²

¹Biology Dept., Islamic Azad University, Science and Research Campus, Tehran, I.R. Iran; ²Genetics Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; ³Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Science, Shahrekord, I.R. Iran; ⁴Biology Dept., Tehran University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 22/May/2012 Revised: 24/Jul/2012 Accepted: 30/Jun/2012

Background and aims: Cystatin B gene encodes a protein that inhibits proteolytic activity of cathepsin enzymes. Mutation in this gene has been stated as one of the causes of idiopathic generalized epilepsy. This study aimed at screening the *cstB* gene mutations in 35 patients affected by idiopathic generalized epilepsy in the Chaharmahal and Bakhtiari province.

Methods: In this descriptive-lab study, the researchers examined mutations in exons 1 to 3 and uncovered the *cstB* gene promoter region in 35 patients with Idiopathic Generalized Epilepsy. Using standard phenol-chloroform procedure. The researchers extracted DNA and then they utilized PCR-SSCP analysis for screening mutations in this gene. Finally suspected cases were sequenced.

Results: In one of the samples, point mutation c.48C> T was found which was unknown. Investigating the bioinformatic examinations on this sample, it can be concluded that this shift has been occurred in the *cstB* gene intronic region.

Conclusion: The results obtained from the samples of this study reveals that there is a slight relationship between idiopathic generalized epilepsy and the *cstB* gene mutations.

Keywords: Cystatin B gene, Epilepsy, Mutation.

Cite this article as: Amini-Farsani Z, Ahadi AM, Teimori H, Haeri-Ruhani A, Heidari S. Investigation of mutation in cystatin B gene in patients affected by idiopathic generalized epilepsy in Chaharmahal and Bakhtiari province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Apr, May; 15(1): 74-82.

***Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Science,
Rahmatieh, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983813346692, E-mail:hosseintimm@yahoo.com