مقاله پژوهشی

بررسی عامل ارثی در یک خانواده با سندرم شیوگرن-لارسون با روش توالی‌یابی کامل اگزوم

عاطفه حسن‌زاده[۱]، علی‌اکبر جنت‌آبادی*[۲]، ابوالفضل راد*[۳]

۱. کارشناسی‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
۳. کارشناسی‌ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: سندرم شیوگرن-لارسون (SLS) یک اختلال اتوزومال مغلوب می‌باشد که دارای سه مشخصه شامل ایکتیوز شدید، عقب‌ماندگی ذهنی، دی پلژی یا تتراپلژی اسپاستیک می‌باشد. با این وجود علایم دیگر؛ شامل اختلالات گفتاری و شناختی و همچنین صرع باعث شده است که متخصصان به‌راحتی این سندرم را شناسایی نکنند. امروزه با کمک تکنیک whole exome sequencing می‌توان درصد بالایی از این سندروم‌های هم‌پوشان را شناسایی کرد. در این مطالعه با به‌کارگیری این تکنیک سندروم SLS در یک خانواده ساکن سبزوار با سابقه ازدواج خویشاوندی شناسایی شد.

مواد و روش‌ها: با استفاده از تکنیک Whole exome sequencing کل اگزون‌ها بررسی شد و پس از فیلترینگ و آنالیز، ژن‌های کاندید انتخاب و با تکنیک PCR و توالی‌یابی سنگر در اعضای دیگر خانواده تأیید گردید.

یافته‌ها: بررسی ژنتیکی مطالعه نشان داد که جهش در ژن ALDH3A2 با واریانت پاتوژنیک c.943C>T باعث این سندروم شده است.

نتیجه‌گیری: توالی‌یابی اگزوم، کمک بسیار بزرگی به خانواده‌ها در شناسایی علت بیماری کرده است. با این وجود بسیاری از این سندروم‌ها درمان اختصاصی ندارند و تنها کمک می‌کند که خانواده‌ها از تولد فرزندان با واریانت موردنظر جلوگیری کنند.

کلیدواژه‌ها:
سندرم شیوگرن-لارسون، توالی‌یابی اگزوم، ALDH3A2

۱. مقدمه

بیماری‌های سندرومیک عصبی، بسیار پیچیده و در بیشتر مواقع با علائم هم‌پوشان هستند. با وجود این با ظهور تکنیک‌های تشخیصی ژنتیکی در دهه اخیر، تشخیص علت بیماری و پیشگیری از بروز در نسل‌های اخیر و همچنین در برخی موارد اندک، تجویز داروی مناسب بسیار تسهیل شده است. سندرم شیوگرن- لارسون[۱] (SLS) با سه

1 Sjogren – Larsson syndrome

* **نویسنده مسئول: علی‌اکبر جنت‌آبادی**
نشانی: گروه زیست‌شناسی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی،، سبزوار، ایران

تلفن: ۰۹۱۵۳۱۸۹۹۵۷
رایانامه: jannatabadi@iaus.ac.ir
شناسه ORCID: 0000_0001_7964_4455

* **نویسنده مسئول دوم: ابوالفضل راد**
نشانی: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، بلوار شهدای هسته‌ای، سبزوار، ایران

تلفن: ۰۵۱۴۴۰۱۸۳۶۳
رایانامه: rada@medsab.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0001-8627-8828
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-4881-5191

نشانه مشخص شامل ایکتیوز شدید[1]، عقب‌ماندگی ذهنی و دی‌پلژی یا تتراپلژی اسپاستیک معرفی شده است (۱) ولی اغلب علائم دیگری نیز با خود دارد که شامل صرع، اختلال در گفتار و تشنج می‌باشد. این بیماری به دلیل درگیری دو ارگان مهم دستگاه عصبی مرکزی و بیماری‌های پوستی، جزو بیماری‌های پوستی- عصبی تقسیم‌بندی می‌شود (۲). از نظر پوستی ممکن است نشانه‌ها در زمان تولد یا در زمان کودکی مشخص شوند. در زمان تولد، پوست، ظاهری سرخ‌رنگ[2] و هایپرکراتینه[3] دارد (۳). اغلب، تمامی بدن درگیر می‌باشد ولی ساختارهایی مثل دندان‌ها و مو سالم هستند (۴). در این بیماری، حالت تولد زودرس[4] رایج می‌باشد؛ به‌طوری که در یک مطالعه از هلند تا ۷۳ درصد در ۳۶ هفتگی گزارش شده است (۵). نشانه‌های سیستم عصبی در طول سال اول یا سال دوم زندگی دیده می‌شوند که به‌صورت تأخیر در نشستن، خزیدن و پیاده‌روی می‌باشند. اسپاسم در این بیماران، رایج می‌باشد و به‌صورت هایپرتونیا[5]، رفلکس‌های تاندون عمیق[6] بروز می‌کند. پاها بیشتر از دست‌ها درگیر هستند و در بیشتر مواقع، نیاز به ویلچر دارند (۶). بیشتر این بیماران از نظر اختلالات شناختی[7] خفیف تا متوسط هستند. مشکلات گفتاری در بیماران مبتلا به سندرم شیوگرن لارسون، شایع است و از نظر شدت، خفیف تا متوسط می‌باشد که سن رشد شناختی متوسط ۵ تا ۸ سال و با استفاده از آزمون‌های عصبی مختلف صورت می‌گیرد و قابل تشخیص می‌باشد (۷). از سویی بین اختلالات گفتاری و شناختی ارتباط وجود دارد. همچنین تشنج‌های منفرد یا نادر در ۳۵ تا ۴۰ درصد از بیماران رخ می‌دهد و اغلب از نوع generalized tonic-clonic می‌باشد که معمولاً با داروهای ضدصرع کنترل می‌شود. همچنین MRI در این سندروم، تغییرات با نشان از سیگنال‌های ماده سفید در مغز را گزارش کرده است (۱).

این سندرم، از بیماری‌های نادر است که اولین‌بار در کشور سوئد دیده شد و چند سال بعد علت آن، جهش در ژن ALDH3A2 که به‌صورت اتوزمی مغلوب است معرفی گردید (۸). این ژن روی کروموزوم 17p11.2 قرار دارد و باعث کد نمودن آنزیم فتی‌آلدئید دهیدروژناز[8] می شود. این ژن، اندازه‌ای به طول ۳۱ کیلوباز و ۱۱ اگزون تشکیل شده است. همچنین این ژن دو رونوشت[9] دارد که پروتئین حاصل از آن در انتهای کربوکسیل با هم متفاوت می‌باشند. رونوشتی که بیشتر در سلول‌ها دیده می‌شود دارای ۴۸۵ اسیدآمینه می‌باشد. طبق آخرین اطلاعات حاصل از سایت LOVD تاکنون ۲۷۳ واریانت از این ژن ثبت شده است (https://databases.lovd.nl/shared/transcripts/00002354).

این واریانت‌ها شامل انواع جایگزینی، حذف یا اضافه شدن، اسپلایسینگ و جابه‌جایی‌های پیچیده می‌باشند.

آنزیم فتی‌آلدهید دهیدروژناز (FALDH) یک آنزیم میکروزمی[10] وابسته به نیکوتین آدنین دی‌نوکلئوتید می‌باشد که اکسیداسیون آلدئیدهای با زنجیره بلند و متوسط[11] ناشی از متابولیسم چربی‌ها و الکل چرب را کاتالیز می‌کند (۹). در این مطالعه، خانواده‌ای با سندروم پیچیده نوروماسکولار به پزشک متخصص رجوع کرده بودند که پس از معاینات مختلف بدون تشخیص سندروم خاص برای بررسی ژنتیکی ارجاع داده شدند. پس از انجام whole exome sequencing و بررسی تک‌تک اعضای خانواده مشخص شد که این خانواده دارای سندرم SLS می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. نمونه خون از افراد درگیر، والدین و یک فرد سالم از خانواده به اندازه ۵ میلی‌لیتر خون‌گیری شد و در لوله‌های ماده حاوی ضدانعقاد خون (EDTA)[12] جمع‌آوری گردید. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی با کد اخلاق IR.IAU.S.REC.1398.004 تصویب گردید و رضایت‌نامه توسط اعضای خانواده تکمیل شد. استخراج DNA با استفاده از روش سالتینگ اوت[13] انجام و غلظت و کیفیت DNA از طریق نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

توالی‌یابی کل اگزون‌ها

نمونه DNA پروباند این خانواده برای توالی‌یابی اگزوم به شرکت نوژن ارسال شد. توالی‌یابی اگزوم‌های نمونه مورد نظر با استفاده از دستگاه Hiseq2000 Illumina صورت گردید. سپس با استفاده از Bowite2 و BWA داده‌های حاصل از توالی‌یابی با ژنوم hg19 مرجع هم‌ترازی شد. برای شناسایی و تفسیر واریانت‌ها از برنامه GATK، ANNOVAR استفاده گردید. همچنین برای حذف خوانش‌های تکراری[14] از برنامه SAMtools DupRecoverMap استفاده شد.

1 Generalized Ichthyosis
2 erythematous
3 hyperkeratotic
4 Preterm
5 Hypertonia
6 Brisk deep tendon reflexes
7 Cognitive Deficits
8 Fatty Aldehyde Dehydrogenase
9 transcripts
10 Microsoma
11 Medium – Long chain Aldehydes
12 Ethylenediaminetetraacetic acid
13 Salting out
14 Remove read duplicates

فیلتراسیون و اولویت‌بندی واریانت[1] براساس جدول ۱ انجام گردید. در ادامه، واریانت‌ها براساس فراوانی اللی و تعداد افراد هموزیگوت در دیتابیس خانگی، Exac، gnomeAD و ایرانوم فیلتر شدند. سپس واریانت‌های موجود در مناطق اینترونیک و UTRها و نواحی کوچک غیررمزگذار میکروآرنا فیلتر و حذف شدند. واریانت‌های Synonymous که معمولاً تغییری روی ساختار پروتئین اثر حذفی ندارند نیز حذف شدند.

تأثیر واریانت‌های missense بر ساختار پروتئین با استفاده از فیلترینگ اسکور[2] گرانتام[3] (بیشتر از ۸۰)، اسکور فیلوپی[4] (بیشتر از ۲،۷) و اسکور کد- فرد[5] (بیشتر از ۱۵) انجام شد. از بین واریانت‌های هموزیگوت نسبت به واریانت‌های هتروزیگوت اولویت داده شد. سپس در مرحله بعد، به واریانت‌های مربوط به ژن‌های شناخته‌شده مرتبط با بیماری‌های سندرومی نوروماسکولار اولویت داده شد.

انجام PCR و توالی‌خوانی سنگر

پس از انتخاب واریانت کاندید برای منطقه مربوطه پرایمر طراحی گردید (جدول ۲) و با استفاده از تکنیک PCR با روش معمولی و استفاده از کیت شرکت امپلیکون (کشور دانمارک) و شرایط دمایی پیشنهادی در کیت منطقه ژنومی موردنظر تکثیر و در ادامه با توالی‌خوانی سنگر تأیید گردید.

جدول ۱. فیلترینگ براساس دیتابیس‌های کنترل و مناطق غیرکدکننده

Description	Field	Filter (Percentage!!)
Remove in-house database variants above 0.5 or 1% frequency	Non-causative frequency	is less than or equal to: 0.5 or 1* (for frequency use 0.005 or 0.01)
Remove dbSNP variants above 0.5 or 1% frequency	SNP frequency	is less than or equal to: 0.5 or 1* (for frequency use 0.005 or 0.01)
If available: remove Sengenics variants above 0.5 or 1% frequency	Sengenics NonCausative - Frequency	is less than or equal to: 0.5 or 1* (for frequency use 0.005 or 0.01)
If available: remove ExAC variants above 0.5 or 1% frequency	EXAC AF	is less than or equal to: 0.5 or 1* (for frequency use 0.005 or 0.01)
Optional: remove ExAC variants homozygous if too frequent to cause disease	EXAC AC HOM	Decide per case
Remove UTR, intronic regions and miRNAs	Gene components	Untick: INTRON_REGION, microRNA, UTR and (blanks)

جدول ۲. پرایمرها برای تکثیر منطقه حاوی واریانت در ژن ALDH3A2

Gene	Forward Primer	Revers Primer
ALDH3A2	AAAGACCCCGACACTGTCAC	**TTTGGGCCATGGTCTCTTAG**

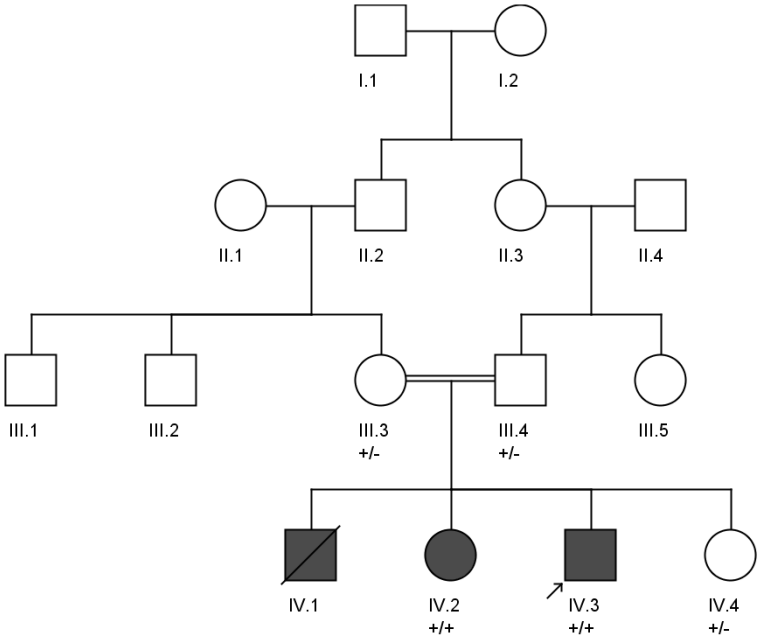
۳. یافته ها

با توجه به تشخیص پزشک متخصص نورولوژی، سندروم ناشناخته تشخیص داده شد. خانواده دارای چهار فرزند و حاصل ازدواج خویشاوندی بود (شکل ۱). یک فرزند آنها فوت شده بود و علت را بررسی نکرده بودند، فرزند بعدی با علائم شبیه به فرزند فوت‌شده به پزشک متخصص اعصاب ارجاع داده شد. صورت دیس مورفیک در هر دو دیده می‌شد. آثار عقب‌ماندگی ذهنی در آنها دیده می‌شد و طبق سنجش IQ زیر ۵۰ بودند. آخرین فرزند این خانواده، دختری سالم بود که در جستجوی علت این بیماری در این خانواده بود. از والدین و فرزندان خون گرفته شد.

توالی‌یابی کل اگزون‌ها و انتخاب واریانت پاتوژنیک

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی کل اگزون‌ها و انجام فیلترینگ، ژن ALDH3A2 در قسمت جهش‌های جایگزینی[6] با واریانت (NM_001031806.1(ALDH3A2):c. 943C>T) انتخاب شد. بررسی این واریانت با داده‌های بانکی از جمله OMIM و Clinvar نشان داد که این واریانت به‌صورت پاتوژنیک طبقه‌بندی می‌شود؛ از این رو برای تأیید کامل‌تر، روی اعضا دیگر خانواده توالی‌خوانی سنگر صورت گرفت.

1 Variant filtration and prioritzation
2 Score
3 Grantham
4 Phylop
5 CADD-PHRED
6 missense



شکل ۱. شجره خانواده با سه بیمار که بیمار اول، مذکر بود و در سن نوجوانی فوت کرد ولی دلیل اصلی فوت، مشخص نیست

٤. بحث و نتیجه‌گیری

سندرم‌های پیچیده با وجود علائم هم‌پوشان، به‌سختی شناسایی می‌شوند؛ از این رو این گونه بیماری‌ها را جزو بیماران ناشناخته و نادر نام‌گذاری می‌کنند. نام‌گذاری ناشناخته به این دلیل می‌باشد که علت اصلی آنها مشخص نیست؛ زیرا می‌تواند علت محیطی یا ژنتیکی داشته باشند و گاهی به‌صورت مولتی‌فاکتوریال اثر خواهند داشت. ظهور تکنولوژی‌های جدید و توانمندی در توالی‌خوانی کل اگزون‌ها (whole exome sequencing) و کل ژنوم (whole genome sequencing) این امکان را برای شناسایی علت این گونه بیماری‌ها به متخصصان داده است.

سندروم SLS با شماره OMIM: ۲۷۰۲۰۰ یک بیماری نوروپوستی و عامل آن جهش در ژن ALDH3A2 می‌باشد (۱۰). اگرچه جهش این بیماری، شناخته‌شده می‌باشد تشخیص این بیماری توسط متخصصان نورولوژی به‌سادگی نمی‌باشد. این سندروم دارای علایمی همچون ایکتیوز شدید، عقب‌ماندگی ذهنی، دی‌پلژی یا تتراپلژی اسپاستیک، صرع، اختلال‌شناختی و گفتار می‌باشند (۱۱). با وجود اینکه اولین‌بار این بیماری از سوئد گزارش گردید ولی تا به امروز گزارش‌های مختلفی از خاورمیانه، اروپا و برزیل به ثبت رسیده است (۱۲). همچنین تا کنون دو مطالعه جداگانه، واریانت‌هایی از ایران از این بیماری گزارش کرده‌اند (۱۳, ۱۴). کریم‌نژاد و همکاران در گزارش خود ۷ مریض که همه آنها حاصل ازدواج خویشاوندی بودند و دارای واریانت جایگزینی و حذف به‌خصوصی بودند را بررسی کردند. یکی از بیماران این کوهورت دارای چهار واریانت مختلف بود که قبلاً در خانواده‌های مختلفی از اروپایی‌ها دیده شد (۱۳). واریانتی که مطالعه ما نشان داد به‌صورت جایگزینی و قبلاً در سال ۱۹۹۹ در یک کوهورت ۲۹ نفره نشان داده شده بود (۱۵). Clinvar این واریانت را به‌صورت پاتوژنیک دسته‌بندی کرده است ولی وقتی داده‌های بانکی همچون Gnomad چک گردد ۲۸ فرد به‌صورت هتروزیگوت و حامل وجود دارند و جزو موارد دارای RS (دارای شماره SNP) می‌باشد که این نشان می‌دهد تعداد افراد حامل و داشتن RS نباید در موارد بیماری‌های اتوزومی مغلوب در اولویت باشد. این واریانت از نظر جایگاه قرارگیری بر ژن، روی کروموزم ۷ قرار دارد و جزو منطقه حفظ‌شده کامل و همچنین روی دمین‌آلدهید دهیدروژناز دومین می‌باشد.

با جهش در این ژن، آنزیم فتی‌آلدهید دهیدروژناز به‌درستی عمل نمی‌کند و باعث تجمع آلدهیدهایی می‌شوند که در اثر تولید داخلی یا مواد خارج از سلول می‌باشند (۱۶). فتی‌آلدهیدها به‌صورت بالقوه برای سلول‌ها مضرر می‌باشند؛ از این رو بهترین نوع دارو را می‌توان داروی بلوکه‌کننده تولید آلدهید نام برد. همچنین استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها، ALDH اکتیوترها، آنالوگ‌های ویتامین د و ریتینوئیدها، کاهش تولیدات فتی‌الدهید الکلی، رژیم‌های غذایی مخصوص و در نهایت ژن‌تراپی را می‌توان راهکارهای درمانی و پیشگیرانه معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1]. Staps P, Rizzo WB, Vaz FM, Bugiani M, Giera M, Heijs B, et al. Disturbed brain ether lipid metabolism and histology in Sjögren-Larsson syndrome. J Inherit Metab Dis. 2020;43(6):1265-78.

[2]. Fouzdar-Jain S, Suh DW, Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome: a complex metabolic disease with a distinctive ocular phenotype. Ophthalmic Genet. 2019;40(4):298-308.

[3]. Cho KH, Shim SH, Kim M. Clinical, biochemical, and genetic aspects of Sjögren-Larsson syndrome. Clin Genet. 2018;93(4):721-30.

[4]. Losito L, Gennaro L, De Rinaldis M, Cacudi M, Trabacca A. Sjögren–Larsson syndrome: phenotypic variability in two brothers with a neurocutaneous disorder. Acta Neurologica Belgica. 2012;112(2):205-8.

[5]. Staps P, Hogeveen M, Fuijkschot J, van Drongelen J, Willemsen MA. Understanding fetal factors that contribute to preterm birth: Sjögren-Larsson syndrome as a model. Journal of Perinatal Medicine. 2018;46(5):523-9.

[6]. Fuijkschot J, Theelen T, Seyger MM, van der Graaf M, de Groot IJ, Wevers RA, et al. Sjögren–Larsson syndrome in clinical practice. Journal of inherited metabolic disease. 2012;35(6):955-62.

[7]. Abidi KT, Kamal NM, Bakkar AA, Alotaibi M, Asseri H, Bokari KA. Sjogren-Larsson Syndrome: A case series of five members from an extended family with a novel mutation. Mol Genet Genomic Med. 2020;8(11):e1487.

[8]. Liu YD, Lin HJ, Li CY, Sun GF, Hu XB, Ma MY, et al. Compound heterozygous mutations in the ALDH3A2 gene cause Sjögren-Larsson syndrome: a case report. Int J Neurosci. 2020;130(11):1156-60.

[9]. Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2008;4(6):697-720.

[10]. Bindu PS. Sjogren-Larsson Syndrome: Mechanisms and Management. The Application of Clinical Genetics. 2020;13:13.

[11]. Rizzo WB. Sjögren–Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. Molecular genetics and metabolism. 2007;90(1):1-9.

[12]. Solcà M, Ronchi R, Bello-Ruiz J, Schmidlin T, Herbelin B, Luthi F, et al. Heartbeat-enhanced immersive virtual reality to treat complex regional pain syndrome. Neurology. 2018;91(5):e479-e89.

[13]. Kariminejad A, Barzgar M, Bozorgmehr B, Keshavarz E, Kariminejad MH, S'Aulis D, et al. Novel mutations and a severe neurological phenotype in Sjögren-Larsson syndrome patients from Iran. European journal of medical genetics. 2018;61(3):139-44.

[14]. Tavasoli A, Sayyahfar S, Behnam B. A rare case of Sjogren-Larsson syndrome with recurrent pneumonia and asthma. Korean journal of pediatrics. 2016;59(6):276.

[15]. IJlst L, Oostheim W, Van Werkhoven M, Willemsen M, Wanders R. Molecular basis of Sjogren-Larsson syndrome: Frequency of the 1297-1298 del GA and 943C [arrow right] T mutation in 29 patients. Journal of inherited metabolic disease. 1999;22(3):319.

[16]. Cho K, Shim S, Kim M. Clinical, biochemical, and genetic aspects of Sjögren-Larsson syndrome. Clinical genetics. 2018;93(4):721-30.

Investigation of Inherited Causes of Sjogren-Larsson Syndrome Using Whole Exome Sequencing Method

Atefeh Hasanzadeh[1], Aliakbar Jannatabadi[2*], Abolfazl Rad[3*]

1. Msc, Department of Biotechnology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
2. Assistant professor, Department of Biology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
3. Msc, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Abstract

Introduction: Sjogren-Larsson Syndrome (SLS) is a recurrent autosomal recessive disorder characterized by three main symptoms including ichthyosis, mental retardation, dysplasia, or spastic tetraplegia. However, other symptoms such as cognitive deficits, delayed speech and seizures were frequently observed. Because of these overlap symptoms, these syndromes are categorized as unknown and rare disease. High-through put technologies such as whole exome sequencing (WES) solved many of these unknown diseases. In this study, we used WES and introduced a family with SLS from Sabzevar – Khorasane Razavi-Iran.

Materials and Methods: Using WES, we sequenced all exons and then analyzed the annotation file. We segregated variant in other family members to confirm the candidate gene using PCR and Sanger sequencing.

Results: Our data showed that mutation in ALDH3A2 with c.943C>T pathogenic variant causes SLS syndrome in this family.

Conclusion: The advent of WES improve the ability of diagnosis in a huge number of syndromes with overlap symptoms. Nonetheless, most of syndromes do not have a specific treatment and recognizing the cause of syndromes help to families to screen during pregnancies.

Received: 2020/05/11
Accepted: 2020/05/20

Keywords: Sjogren-Larsson Syndrome, Whole exome sequencing, ALDH3A2