شناسایی جهش‌های جدید در بیماران لبر آموروزیس مادرزادی نوع یک با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹

نصرالله صالح گوهری[۱]، هوشنگ امیری[۲]، کلثوم سعیدی[۳]*

۱. دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۲. استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۳. استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: بیماری لبر آموروزیس مادرزادی، نوعی اختلال کاهش بینایی است که از نوزادی شروع می‌شود. این بیماری اغلب به‌صورت اتوزمال مغلوب به ارث می‌رسد و ژن‌های مختلفی با آن در ارتباط هستند. در این مطالعه، بیماران مبتلا به این بیماری مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفته اند.

روش کار: از روش تعیین توالی نسل جدید برای یافتن جهش‌ها و از توالی‌یابی به‌روش سنگر برای تأیید جهش‌های بیماری‌زای شناسایی‌شده، استفاده شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر، برای اولین بار دو جهش جدید یکی به‌صورت تغییر چهارچوب توالی و دیگری به‌صورت کدون خاتمه در بیماران مبتلا به لبر آموروزیس مادرزادی گزارش شده‌اند. جهش حذف نوکلئوتیدی c.1264delC و جهش نقطه‌ای c.2116C>T هر دو به‌صورت هموزیگوت در ژن GUCY2D در بیماران شناسایی و هر دو جهش به روش توالی‌یابی سنگر تأیید شدند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، دو جهش جدید و بیماری‌زا در بیماری لبر آموروزیس مادرزادی گزارش شده‌است. این یافته در تشخیص ژنتیکی و مشاوره بیماران مبتلا به این بیماری اهمیت ویژه خواهد داشت.

کلیدواژه‌ها: توالی‌یابی نسل جدید، جهش، ژن، لبر آموروزیس مادرزادی، گوانیل سیکلاز

* **نویسنده مسئول:** استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
ایمیل: k_saeidi@kmu.ac.ir **تلفن:** ۰۹۱۳۳۴۰۰۱۱۸ **نمابر:** ۰۳۴۳۳۲۵۷۶۷۱

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]

مقدمه

بیماری لبر آموروزیس مادرزادی (LCA) شامل گروهی از دیستروفی‌های ارثی شبکیه است که باعث اختلال بینایی مادرزادی در نوزادان و کودکان می‌شود. LCA اولین بار توسط تئودور لبر در قرن نوزدهم ثبت شد (۱). این بیماری معمولاً با الگوی اتوزومال مغلوب و به ندرت با توراث اتوزمال غالب به ارث می‌رسد. شیوع این بیماری ۲–۳ در هر ۱۰۰۰۰۰ تولد زنده است و بیش از ۵٪ از کل دیستروفی‌های شبکیه را تشکیل می‌دهد. این بیماری یکی از علل شایع نابینایی در کودکان است و به‌نظر می‌رسد در جمعیت‌هایی که ازدواج فامیلی دارند شیوع بیشتری داشته است (۲، ۳).

برخی از ژن‌ها برای عملکرد طبیعی سلول‌های گیرنده نور و مسیر انتقال نور که در آن نور به سیگنال‌های الکتریکی در شبکیه چشم تبدیل می‌شود، ضروری هستند. جهش بیماری‌زا در حداقل ۲۳ ژن با این عملکرد می‌تواند منجر به بیماری LCA شود (https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm).

اخیراً Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)، ۱۸ نوع LCA (LCA1-18) را توصیف کرده‌است. این طبقه‌بندی بر اساس علت ژنتیکی آنها، الگوهای کاهش بینایی و ناهنجاری‌های مربوط به چشم است. همچنین دیستروفی شبکیه شدید زودرس (EOSRD) با شدت کمتری نسبت به LCA رخ می‌دهد و قبل از ۵ سالگی شروع می‌شود. این دو شکل از بیماری ارثی شبکیه از نظر ژنتیکی و بالینی با هم هم‌پوشانی دارند (۴). نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که شایع‌ترین علت EOSRD، جهش ژن‌های RPE65 و RDH12 است، در حالیکه نقایص ژنتیکی ژن‌های GUCY2D، CEP290، NMNAT1 و AIPL1 به احتمال زیاد با LCA مرتبط هستند (۵).

بیماری LCA-1 حاصل جهش در ژن guanylate cyclase (GUCY2D; 600179) در موقعیت کروموزومی 17p13 است. ژنGUCY2D که به عنوان گوانیل سیکلاز ۱ شبیکه نیز شناخته می‌شود، اولین ژنی است که باعث ایجاد بیماری LCA شده‌است که ۱۰–۲۰٪ موارد LCA را تشکیل می‌دهد (۶). همچنین گزارش شده‌است که تاکنون، حدود ۱۲۷ نوع جهش از ژن GUCY2D با LCA-1 مرتبط هستند (۷).

ژن GUCY2D (NM_00018) یک پروتئین غشایی دارای ۱۱۰۳ اسید آمینه را کد می‌کند. این پروتئین به‌عنوان آنزیم گوانیل سیکلاز ۱ دارای نقش کلیدی در فرایند انتقال نوری است که GTP را به cGMP تبدیل می‌کند. در این مطالعه، از روش NGS-Whole Exome Sequencing (NGS-WES) و توالی‌یابی سنگر (Sanger sequencing) برای بررسی ژنتیکی این بیماران استفاده شده‌است و برای اولین بار دو جهش بیماری‌زای جدید را در دو خانواده غیر وابسته گزارش شده که به‌خوبی اساس بیماری را توضیح می‌دهد.

روش کار

دو خانواده با مشکل بینایی فرزندشان، برای بررسی ژنتیک مولکولی به مجتمع تخصصی–درمانی جواد الائمه (ع) بخش ژنتیک شهرستان کرمان ارجاع شدند. معاینه بالینی و تشخیص اولیه بیماران مبتلا توسط چشم پزشک انجام شد. فرم رضایت آگاهانه توسط بیماران امضا شد. به‌منظور بررسی ژنوم، ۵ میلی-لیتر خون وریدی افراد در لوله‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (اتیلن دیامین تترا استیک اسید) جمع‌آوری شد. DNA ژنومی با استفاده از روش نمک اشباع (۸) از لکوسیت‌های خون جدا شد. DNA استخراج‌شده برای تشخیص مولکولی با استفاده از روش WES مورد استفاده قرار گرفت.

WES در سیستم Illumina HiSeq NGS (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) انجام شد. کیفیت توالی‌های خوانده‌شده در فایل FASTQ توسط ASTQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) کنترل شد. برای ایجاد BAM file از Burrows-Wheeler Aligner (BWA) algorithm استفاده شد. در این مطالعه از hg19 به‌عنوان ژنوم رفرنس استفاده شده‌است. Picard Tools جهت حذف duplications و base quality score recalibration (BQSR) استفاده شد. جهت ایجاد فایلVCF از GATK Haplotype caller استفاده شد. جهت variant annotation از ANNOVAR و دیتابیس‌های dbSNP، Exac Browser، GnomAD، ClinVar و InterVar استفاده شده‌است. برای یافتن جهش بیماری‌زا، ابتدا جهش‌های منطقه اینترونی، جهش‌های synonymous و خارج از منطقه splicing حذف و بقیه جهش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت از ابزارهای بیوانفورماتیک مانند Mutation Taster، GERP، FATHMM-MKL، DANN و SIFT جهت تجزیه و تحلیل و پیش‌بینی جهش‌های کاندید بیماری‌زایی استفاده شد (۹–۱۵).

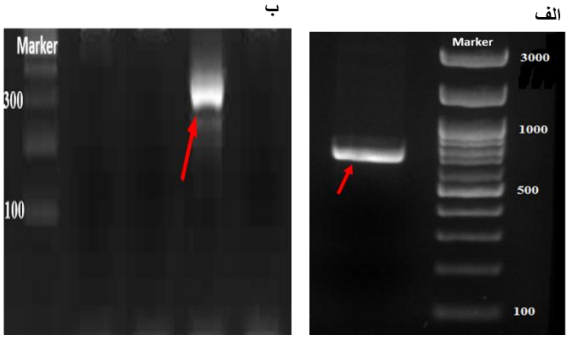
[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]

جهت تأیید جهش شناسایی‌شده در WES، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز–توالی‌یابی سنگر (PCR-Sanger sequencing) مورد استفاده قرار گرفت.

جهت جهش c.1264delC در اگزون ۴ از پرایمرهای پیشرو F1 (5'-TTGACAGGCAGTGAAAGAAT-3') و همچنین از پرایمر معکوس R1 (5'-GGGACAGTGACAGGAGGTAT-3') و جهت جهش c.2116C>T در اگزون ۱۱ از پرایمرهای پیشرو F2 (5'- TTCAAGTCCTCCCTCCTGCT-3') و همچنین از پرایمر معکوس R2 (5'- GTGAGCTCCAGCATGGCATA-3') استفاده شد.

در این مطالعه، PCR (polymerase chain reaction) در حجم کلی ۳۰ میکرو لیتر انجام شد. این مخلوط از ۱۵ میکرو لیتر Master Mix RED (Ampliqon) با ۰/۲ میکرو مولار از هر پرایمر و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی تشکیل شده‌بود. جهت تکثیر رشته الگو، برنامه دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر بود: جداسازی رشته‌های مولکول DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به‌دنبال آن اتصال پرایمرها به DNA تک رشته‌ای در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد جهت جهش c.1264delC و دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد جهت جهش c.2116C>T برای ۲۰ ثانیه و طویل‌شدن رشته ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و طویل‌شدن نهایی جهت اطمینان در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه (شکل ۱). سپس، محصول PCR به روش سنگر توالی‌یابی شد. علاوه بر این، پتانسیل برانگیخته بصری (VEP) جهت بیماران انجام شد.

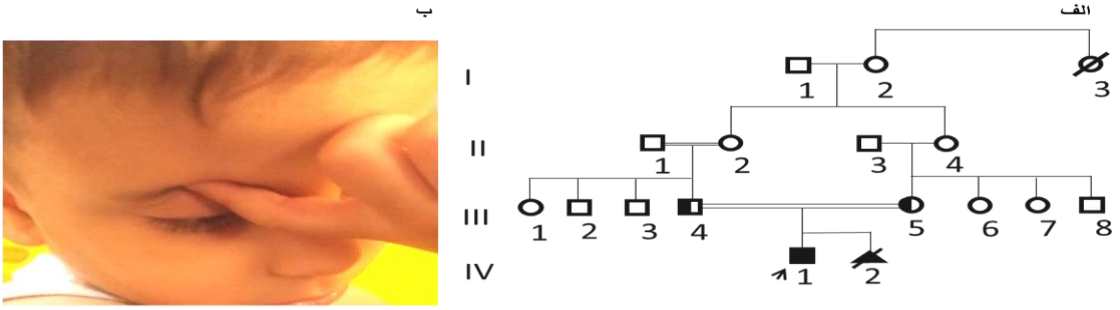


شکل ۱. تصاویر PCR مربوط به جهش c.1264delC (الف) و c.2116C>T (ب)

نتایج

بیمار اول

بیمار پسر ۷ ساله حاصل ازدواج فامیلی (پسر خاله و دختر خاله) و بدون مشکلات قبل از تولد به روش زایمان طبیعی متولد شده‌است (شکل ۲–الف). بیماری وی با حرکات غیرارادی چشم (نیستاگموس) در چند ماه اول زندگی‌اش شروع شد. بیمار Franceschetti's oculo-digital sign را (شکل ۲–ب) که از ویژگی‌های بیماری LCA است و به‌صورت مالش و فشار بر چشم می‌باشد، را داشته‌است (۱۷–۱۶) و منجر به انوفتالموس (گود افتادگی) در ایشان شده‌است. وی در معاینه فیزیکی دارای نیستاگموس، درک نور و فوندوس طبیعی بود. در تصویربرداری تشدید مغناطیسی مغز (ام آر آی) در سن ۱/۵ سالگی، هیچ شواهدی مبنی بر وجود ضایعات مغزی در ام آر آی دیده نشد. همچنین غده هیپوفیز، کیاسما و حدقه چشم نرمال بودند. آزمون VEP دو طرفه بیمار با نوروپاتی بینایی مادرزادی شدید مطابقت داشت. بیمار از لحاظ قرنیه و عدسی نرمال بود و از هوش طبیعی برخوردار بود.



شکل ۲. الف) شجره نامه بیمار اول ب) علامت Franceschetti's oculo-digital sign در بیمار اول

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]

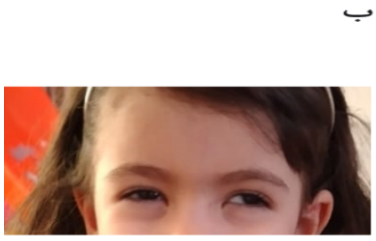
[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]

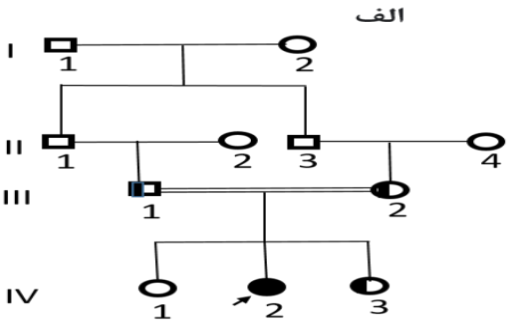
نتیجه آزمایش NGS-WES، حذف یک نوکلئوتید به‌صورت هموزیگوت را در اگزون ۴ ژن GUCY2D (c.1264delC, p. Pro422LeufsX66) این بیمار نشان داد. تعیین توالی سنگر به ترتیب جهش‌های هموزیگوت و هتروزیگوت در بیمار و والدینش را تأیید کرد. الگوی وراثت اتوزومی مغلوب با توجه به ژنوتیپ اعضای خانواده تأیید شد. با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی پیش‌بینی می‌شود که حذف c.1264delC با اطمینان بالا آسیب‌رسان است. MutaionTaster با نمره ۰/۹۹۹ نشان داد که این نقص ژنی جدید یک جهش بیماری‌زا است و با نمره ۵/۱۵ در دیتابیس GERP محل حفاظت شده‌است و همچنین این تغییر ژنتیکی در منابع ExAC و 1000Genome یافت نشد.

بیمار دوم

بیمار دختر ۳/۵ ساله حاصل ازدواج فامیلی (پسر عمو و دختر عمو) بدون مشکلات قبل از تولد، به روش زایمان طبیعی متولد شده‌است (شکل ۳- الف). بیماری وی با حرکات غیر ارادی چشم (نیستاگموس) در چند ماه اول زندگی و عدم دنبال‌کردن اشیاء مورد توجه قرار گرفته‌است. این بیمار همچنین Franceschetti's oculo-digital sign را نشان داده که منجر به انوفتالموس (گود افتادگی) شده‌است (شکل ۳-ب). وی در معاینه فیزیکی دارای نیستاگموس، درک نور و شبکیه طبیعی بود. در ام ار ای انجام‌شده در ۲ سالگی هیچ‌گونه ضایعات مغزی دیده نشد.

همچنین غده هیپوفیز، کیاسما و حدقه چشم نرمال بودند. آزمون VEP دوطرفه بیمار با نوروپاتی بینایی مادرزادی شدید مطابقت داشت. بیمار از لحاظ قرنیه و عدسی نرمال بود. او از هوش و یادگیری طبیعی برخوردار بود. آزمایش NGS-WES حذف یک نوکلئوتید (c.2116C>T-p.Gln706*) به‌صورت هموزیگوت را در اگزون ۴ ژنGUCY2D نشان داد. تعیین توالی سنگر به ترتیب جهش‌های هموزیگوت و هتروزیگوت در بیمار و والدینش را تأیید کرد. الگوی وراثت اتوزومی مغلوب با توجه به ژنوتیپ اعضای خانواده تأیید شد (شکل ۲-الف). این جهش با کمک ابزارهای FATHMM-MKL با نمره ۰/۵۳، Mutation Taster با نمره ۱، BayesDel addAF با نمره ۰/۹۹۴۱ DANN با نمره ۰/۹۹۸۱ و با ابزار FATHMM-MKL با نمره ۰/۵۳۲۹ بیماری‌زا محسوب می‌شود و با نمره ۹در دیتابیس GERP یک محل حفاظت شده‌است. همان‌طور که انتظار می‌رفت همه ابزارهای مورد استفاده فرضیه بیماری‌زا بودن این جهش را تقویت کردند (۹-۱۵).





شکل۳. الف) شجره نامه بیمار دوم ب) انوفتالموس (گود افتادگی) در بیمار دوم

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]

بحث

ازدواج فامیلی، رایج‌ترین دلیل اصلی اختلال ارثی اتوزومال مغلوب مکرر در ایران است. در این مطالعه دو بیمار با سن ۳/۵ و ۷ سال با مشکل شدید بینایی توصیف شدند که بیماری ایشان با حرکت غیر ارادی چشم، علامت Franceschetti مثبت و عدم دنبال‌کردن اشیاء، مورد توجه و بررسی قرار گرفت. این بیماران در بینایی سنجی درک نور داشته و فوندوسکوپی طبیعی داشتند، همان‌طور که در بیماران LCA انتظار می‌رفت (۱۸).

در این مطالعه دو جهش جدید در ژن GUCY2D مورد بررسی قرار گرفت. اولین جهش حذف هموزیگوت یک نوکلئوتید را در اگزون ۴ (c.1264delC, p.Pro422LeufsX66) را نشان می‌دهد. موقعیت این جهش در chr17:7909918 قرار دارد و جهش بعدی در خانواده دوم در اگزون ۱۱ (c.2116C>T-p.Gln706*) و در موقعیت chr17: 7916423 قرار دارد. الگوی توارث اتوزومال مغلوب، فنوتیپ و ژنوتیپ بیماران با بیماری LCA1 مطابقت داشت. ابزارهای بیوانفورماتیکی نشان داد حذف تک نوکلئوتیدی باعث یک جهش تغییر چهارچوب و رسیدن به کدون توقف زودرس در اسیدآمینه ۴۸۶ و در نهایت موجب تولید پروتئین غیرطبیعی می‌شود. این پروتئین، توالی اسیدآمینه نادرستی را از محل ایجاد جهش تغییر چهارچوب به موقعیت (p.Pro422LeufsX66) دارد. همچنین این جهش تغییر چهارچوب منجر به خاتمه زود هنگام کدگذاری اسیدآمینه می‌شود. اسیدهای آمینه باقیمانده از ۴۸۷ تا ۱۱۰۳ از بین می‌روند که انتظار می‌رود پروتئین کوتاه شود و بر عملکرد پروتئینی تأثیر مخرب بگذارد و باعث بیماری LCA1 شود. پروتئین GUCY2D شامل ۳ دومین است: دومین‌های کیناز، دیمریزاسیون و کاتالیزوری که در سیتوپلاسم سلولی قرار دارند (۱۹). جهش تغییر چهارچوب (c.1264delC) باعث از بین رفتن هر ۳ دومین می‌شود.

این تغییر ژنتیکی تا به حال گزارش نشده‌است. علاوه بر این شش نوع حذف GUCY2D در دیتابیس ژنوم ایران گزارش شده که هیچ‌یک از آنها اثر تغییر چهارچوب را نداشته است.
(http://www.iranome.com)(http://www.iranome.com/gene/ENSG00000132518)

کدون توقف زودرس ناشی از جهش تغییر چهارچوب، طبق گایدلاین کالج پزشکی ژنتیک و ژنومیک آمریکا (ACMG)، یک معیار بسیار قوی PVS1 (جهش‌هایی که قادرند به‌طور کامل، تولید محصول ژنی یا محصولی که عملکرد خوبی نداشته باشد را موجب گردند) برای بیماری‌زایی است. علاوه بر این، معیارهای PP3 (ابزارهای بیوانفورماتیک و معیارهای محاسباتی نشان‌دهنده بیماری‌زایی جهش مورد بررسی است) و PP4 (فنوتیپ بیمار با بیماری مطابقت دارد) و همچنین معیارهای PM1 (قرار گرفتن جهش در دومین عملکردی شناخته‌شده پروتئین مورد نظر) و PM2 (عدم وجود این جهش در دیتابیس‌های جمعیت کنترل) نیز از همین گایدلاین معیارهای حمایتی دیگری برای قرار دادن این جهش در دسته بیماری‌زا هستند (۲۰).

جهش c.2116C>T-p.Gln706* در بیمار دوم، یک جهش نقطه‌ای از نوع missense می‌باشد که باعث رسیدن زودرس به کدون خاتمه می‌شود. این جهش در دومین کینازی رخ می‌دهد. این دومین یک دومین حفاظت شده در پروتئین گوانیل سیکلاز ۱ می‌باشد. جهت بررسی تکامل پروتئین، ما با استفاده از ابزار ClustalW2 multiple alignment با Homosapiens، Mus musculus، Macaca mulatta، Pan troglodyte، Bos taurus، Drosophila melanogaster تطابق را انجام داده و متوجه شدیم که جهش در منطقه کاملا حفاظت‌شده قرار دارد. همچنین رسیدن به کدون خاتمه بر طبق گایدلاین ACMG یک معیار بسیار قوی PVS1 (جهش‌هایی که قادرند به‌طور کامل، تولید محصول ژنی یا محصولی که عملکرد خوبی نداشته باشد را موجب گردند) برای بیماری‌زایی است. علاوه بر این، معیارهای PP3 (ابزارهای بیوانفورماتیک و معیارهای محاسباتی نشان‌دهنده بیماری‌زایی جهش مورد بررسی است) و PP4 (فنوتیپ بیمار با بیماری مطابقت دارد) و همچنین معیارهای PM1 (قرار گرفتن جهش در دومین عملکردی شناخته‌شده پروتئین مورد نظر) و PM2 (عدم وجود این جهش در دیتابیس‌های جمعیت کنترل) نیز از همین گایدلاین معیارهای حمایتی دیگری برای قرار دادن این جهش در دسته بیماری‌زا هستند (۲۰). همچنین، خاصیت بیماری‌زایی این جهش توسط ابزارهای بیوانفورماتیک Mutation Taster disease و SIFT تأیید شده‌است.

تا به امروز، حدود ۱۲۷ مورد (۸۸٪) از ۱۴۴ جهش در سراسر جهان در ژن GUCY2D گزارش شده که با LCA اتوزوم مغلوب همراه است؛ در حالی‌که ۱۳ جهش باعث اتوزومال غالب می‌شود (۲۱). اکثریت قریب به اتفاق جهش‌های ژنی که باعث

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]

ایجاد LCA می‌شوند، جهش‌های تغییر چهارچوب، بی‌معنی و جهش‌های پیرایش هستند که می‌توانند بر تمام دومین‌های پروتئین تأثیر بگذارند (۷، ۲۱-۲۳). تا به امروز، ۲۷ مورد حذف کوچک در ژن GUCY2D مرتبط با این بیماری گزارش شده‌است.

http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GUCY2D).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه دو جهش جدید در ژن GUCY2D در دو خانواده ایرانی گزارش شده که ابزارهای بیوانفورماتیک متعدد نشان‌دهنده بیماری‌زا بودن این جهش‌ها و تولد بیماران با LCA1 شده‌است. این مطالعه، طیف جهش ژنی GUCY2D را گسترش می‌دهد که می‌تواند به مشاوره ژنتیکی کارآمدتر بیماری کمک کند. مطالعات بیشتر در جهت بررسی نقش عملکردی و تأثیر بالینی این جهش‌های جدید پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد اخلاق IR.KMU.REC.1398.723 در دانشگاه علوم پزشکی کرمان به ثبت رسیده‌است.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

References

1. Leber T. Über Retinitis Pigmentosa und angeborene amaurose. Araefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 1869;15(3):1–25.
2. Koenekoop RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. Survey of Ophthalmology. 2004;49(4):379-98.
3. Stone EM. Leber congenital amaurosis - a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture. American Journal of Ophthalmology. 2007;144(6):791-811.
4. Chung DC, Traboulsi EI. Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions. Journal of AAPOS. 2009;13(6):587-92.
5. Kumaran N, Pennesi ME, Yang P, Trzupek KM, Schlechter C, Moore AT, et al. Leber congenital amaurosis /early-onset severe retinal dystrophy overview. [2018 October 4]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531510/
6. Rozet JM, Perrault I, Gerber S, Hanein S, Barbet F, Ducroq D, et al. Complete abolition of the retinal specific guanylyl cyclase (retGC-1) catalytic ability consistently leads to leber congenital amaurosis (LCA). Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2001;42(6):1190-2.
7. Sharon D, Wimberg H, Kinarty Y, Koch KW. Genotype-functional-phenotype correlations in photoreceptor guanylate cyclase (GC-E) encoded by GUCY2D. Progress in Retinal Research. 2018;63:69-91.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 1988;16(3):1215.
9. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 2009;25(14):1754-60.
10. De Summa S, Malerba G, Pinto R, Mori A, Mijatovic V, Tommasi S. GATK hard filtering: tunable parameters to improve variant calling for next generation sequencing targeted gene panel data. BMC Bioinformatics. 2017;18(S5):119.
11. Yang H, Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. Nature Protocols. 2015;10(10):1556-66.
12. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. PLoS Computational Biology. 2010;6(12):e1001025.
13. Rogers MF, Shihab HA, Mort M, Cooper DN, Gaunt TR, Campbell C. FATHMM-XF: accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. Bioinformatics. 2018;34(3):511-3.
14. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. Bioinformatics. 2015;31(5):761-3.
15. Sim N, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic Acids Research. 2012;40:452-7.
16. Franceschetti A, Dieterle P. Diagnostic and prognostic importance of the electroretinogram in

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]
[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]

tapetoretinal degeneration with reduction of the visual field and hemeralopia. Confinia Neurologica. 1954;14(2-3):184-6.
17. Fazzi E, Signorini SG, Scelsa B, Bova SM, Lanzi G. Leber's congenital amaurosis: an update. European Journal of Paediatric Neurology. 2003;7(1):13-22.
18. Kumaran N, Moore AT, Weleber RG, Michaelides M. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. The British Journal of Ophthalmology. 2017;101(9):1147-54.
19. Potter LR. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. Frontiers in Molecular Biosciences. 2005;10:1205-20.
20. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine. 2015;17(5):405-24.
21. Sharon D, Wimberg H, Kinarty Y, Koch KW. Genotype-functional-phenotype correlations in photoreceptor guanylate cyclase (GC-E) encoded by GUCY2D. Progress in Retin Eye Research. 2018;63:69-91.
22. Kitiratschky VBD, Wilke R, Renner AB, Kellner U, Vadalà M, Birch DG, et al. Mutation analysis identifies GUCY2D as the major gene responsible for autosomal dominant progressive cone degeneration. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2008;49(11):5015–23.
23. Wilkie SE, Newbold R J, Deery E, Walker CE, Stinton I, Ramamurthy V, et al. Functional characterization of missense mutations at codon 838 in retinal guanylate cyclase correlates with disease severity in patients with autosomal dominant cone-rod dystrophy. Human Molecular Genetics. 2000; 9(20):3065-73.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]

Identification of novel mutations in leber congenital amaurosis 1 using next generation sequencing

Received: 9 Jul 2021 Accepted: 31 Aug 2021

Nasrollah Saleh-Gohari[1], Houshang Amiri[2], Kolsoum Saeidi[3*]

1. Associate professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 2. Assistant professor, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 3. Assistant professor, Physiology Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

.

Abstract

Introduction: Leber congenital amaurosis (LCA) is a vision loss disorder that begins in infancy. Different genes are associated with LCA. They usually have autosomal recessive inheritance. In the present study, the genetic basis of congenital blindness in two Iranian families was examined.

Materials and Methods: Next generation sequencing technique was used for investigation of the underlying mutations in patients with LCA. The Sanger sequencing was employed to validate the identified potential pathogenic mutations.

Results: In the present study, two novel mutations in GUCY2D gene were detected in probands. First mutation was a frameshift mutation caused by single base deletion (c.1264delC), and the second one was a nonsense mutation (c.2116C>T) resulting in stop codon. It was found that the carrier members were unaffected while the affected ones were homozygotes. Both mutations were confirmed using Sanger sequencing.

Conclusion: Herein, two novel pathogenic mutations were reported in Leber congenital amaurosis. This would be of importance in genetic diagnosis and consultation of patients affected with LCA.

Keywords: Next generation sequencing, Mutation, Gene, Leber congenital amaurosis, GUCY2D

***Corresponding Author:** Assistant professor, Physiology Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Email: k_saeidi@kmu.ac.ir **Tel:** +989133400118 **Fax:** +983433257671

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.3.4]