Research Paper

Genetic Assessment of Mucopolysaccharidosis Type IV and the First Pathological Mutation of c.313A>G in the Iranian Population

Seyed Mehdi Shafaat[1], Mehrdad Hashemi[2], Ahmad Majd[1], Maryam Abiri[3], *Sirous Zeinali[4,5]

1. Department of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
2. Department of Molecular Genetics, Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Tehran, Iran.
3. Department of Genetics and Molecular Biology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Department of Molecular Medical, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
5. Kosar Human Genetic Research Center, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shafaat S, Hashemi M, Majd A, Abiri M, Zeinali S. [Genetic Assessment of Two Iranian Patients With Mucopolysaccharidosis Type IV (Morquio syndrome) Using Next Generation Sequencing Technique and Observing the Pathological Mutation of c.313A>G for the First Time in the Iranian Population (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2020; 26(2):182-191. https://doi.org/10.32598/hms.26.2.3275.1

https://doi.org/10.32598/hms.26.2.3275.1

CC BY NC

Received: 20 Oct 2019
Accepted: 27 Nov 2019
Available Online: 01 Apr 2020

Key words:
Mucopolysaccharidosis, MPS, Morquio a Syndrome, NGS

ABSTRACT

Aims Morquio syndrome is a mucopolysaccharidosis (type 4) that has autosomal recessive inheritance. Moreover, it is caused by defects in the two genes; GALNS (Murcio A) and GLB1 (Murcio B). The prevalence rate of this condition is estimated to be about 1 per 200000 live births globally. Besides, Middle Eastern cases shape the greatest ratio, due to higher rates of consanguineous marriages. The most frequent clinical manifestations of the disease include skeletal abnormalities, hearing and vision problems, decreased physical growth, and cardiac malformations.

Methods & Materials This study investigated the pathogenic mutations in two Iranian individuals. Both cases were the result of consanguineous marriages with mucopolysaccharidosis type 4 (A or B types, each). Following of genomic DNA extraction, Whole Exome Sequencing was conducted for the study patients. Then, for the validation of observed pathogenic mutations, sanger sequencing was performed for the patients.

Findings Two explored patients demonstrated homozygote mutations. Mutation analysis of the GLB1 gene revealed c.443G>A mutation in one patient and GALNS gene c.313A>G in the other.

Conclusion Two pathogenic mutations in GLB1 and GALNS gene were found in 2 Iranian patients in this study. The NGS was a desirable and reliable technique for detecting these two mutations. The c.313A> G mutation in the GALNS gene was novel and had not been reported in the world.

Extended Abstract

1. Introduction

This case report article presented two patients with the same genetic disease. In both cases, the genetic mutation causing the disease was detected. Besides, for the first time in the world, a new mutation was observed.

Wang et al. (2010) studied 24 Chinese patients with Morquio A Syndrome (MPS IVA). They observed 27 pathogenic mutations in the GALNS gene of these patients; of which, 16 mutations were reported prior to their study. Approximately 63% of the mutations they observed in these

* *Corresponding Author:*
Sirous Zeinali, PhD.
Address: Molecular Medical Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
Tel: +98 (912) 1372040
E-mail: zeinali@kawsar.ir

patients were not detected elswewehre, globally. Their prediction was that some of these mutations may be specific to this population. The G340D mutation was the most common type in this population [1]. Caciotti A et al. genetically analyzed 21 MPS patients, and 4 of whom presented Morquio B syndrome. As a result of determining the GLB1 gene sequence in these 4 patients, c.443G>A mutation was observed in one of the patients for the first time [2]. The current study aimed to find the mutations that caused Morquio syndrome in two Iranian children.

2. Materials and Methods

The present study investigated two patients with Morquio syndrome. Moreover, both patinets were from consanguineous marriage and referred to Dr. Zinley's medical genetics laboratory through their specialist physician. The required blood samples were obtained from the study patients and their parents. The materials used in this project included DNA extraction kit, PCR kit, the kit required to determine the product sequence of PCRs, NGS device and its accessories, sampler, microtube, and sampler tip.

3. Results

In both patients, the disease-causing mutation was observed in the form of homozygote. One of the patients developed c.443G>A mutation in exon 4 of the GLB1 gene. Besides, the other patient generated c.313A>G mutation in exon 3 of the GALNS gene (Table 1).

4. Discussion

One of the mutations had already been reported in other studies; however, the other mutation was first reported in this study. To obtain expand the achieved results and mutations data in relation to this genetic disease, it is necessary to investigated larger sample sizes. Accordingly, the number of unreported genetic mutations could be observed in the Iranian population. A study limitation was the lack of funding for conducting the genetic research.

5. Conclusion

According to the literature on various types of mucopolysaccharidosis, we hope that the present study results be of great help in diagnosing prenatal disease of type 4 mucopolysaccharidosis. A new unreported mutation has been observed in this study for the first time; thus, it is suggested that a larger statistical population of Iranian patients with mucopolysaccharidosis be genetically studied. Such explorations could provide a more comprehensive report of pathogenic mutations in these patients.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The present study has been approved by the Ethics Committee of Kowsar Human Genetics Research Center under the attached form No. 98/6299.

Table 1. Types of MPS Disease With the Names of the Enzyme, Related Gene, Type of Inheritance, and Type of Increased GAG

Disease Type	Enzymatic Defects (genes)	Inheritance	Increased GAG
MPS I Horner's syndrome	α-L-iduronidase (IDUA)	Autosomal recessive	HS & DS
MPS II Hunter syndrome	Iduronate Sulfatase (IDS)	Dependent on the recessive sex	HS & DS
MPS III (A-D) San Filippo syndrome	A: Heparan sulfamidase (SGSH) B: N-acetylglucosaminidase (NAGLU) C: Heparan-α-glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT) D: N-acetylglucosamine 6-sulfatase (GNS)	Autosomal recessive	HS
MPS IV (A and B) Morquio syndrome	A: galatosamine-6-sulfatase (GALNS) B: β-galactosidase (GLB1)	Autosomal recessive	A: CS and KS B: KS
MPS VI Maroteaux-Lamy syndrome	Arylsulfatase B (ARSB)	Autosomal recessive	DS
MPS VII Sly syndrome	B-glucuronidase (GUSB)	Autosomal recessive	HS, DS, and CS
MPS IX Natowicz syndrome	Hyaluronidase (HYAL1)	Autosomal recessive	HA

Funding

This study has been extracted from the PhD. thesis of Seyed Mehdi Shafaat in the field of Biology, Molecular Genetics, Islamic Azad University, Tehran North Branch.

Authors' contributions

All authors contributed in designing, running, and writing all parts of the research.

Conflicts of interest

According to the authors, there is no conflicts of interest in this article.

Acknowledgements

We would like to thank all the colleagues of Kowsar Human Genetics Research Center who contributed to this research project.

بررسی ژنتیکی دو بیمار ایرانی مبتلا به موکوپلی ساکاریدوز تیپ ٤ (سندرم مورکیو) با استفاده از تکنیک NGS (Next Generation Sequencing) و مشاهده جهش بیماری‌زای c.313A>G برای اولین‌بار در جمعیت ایرانی

سید مهدی شفاعت[۱]، مهرداد هاشمی[۲]، احمد مجد[۱]، مریم عبیری[۳]، *سیروس زینلی[۴،۵]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۲. گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳. گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم‌پزشکی ایران، تهران، ایران.
۴. گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۵. مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۸ مهر ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۰۶ آذر ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۳ فروردین ۱۳۹۹

چکیده

اهداف سندرم مورکیو یکی از تیپ‌های بیماری موکوپلی ساکاریدوز (تیپ چهار) است که دارای وراثت مغلوب اتوزومی است و بر اثر نقص در دو ژن GALNS (مورکیو A) و GLB1 (مورکیو B) ایجاد می‌شود. شیوع این بیماری تقریباً یک در هر ۲۰۰ هزار تولد نوزاد زنده در جهان تخمین زده شده است که بیشترین مبتلایان تقریباً مربوط به خاورمیانه به دلیل نرخ بالاتر ازدواج خویشاوندی است. شایع‌ترین علائم بالینی این بیماری شامل اختلالات اسکلتی، مشکلات شنوایی و بینایی، کاهش رشد جسمانی و ناهنجاری قلبی است.

مواد و روش‌ها در این مطالعه دو فرد مبتلا به سندرم مورکیو (یکی نوع A و دیگری نوع B) که هر دو حاصل ازدواج خویشاوندی بودند مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند تا جهش یا جهش‌های عامل بیماری آن‌ها پیدا شود. DNA افراد تخلیص شد و سپس با استفاده از تکنیک NGS (Whole Exome Sequencing) تعیین توالی انجام شد. پس از دریافت نتایج، برای تأیید جهش‌های پیداشده، تعیین توالی سنگر انجام شد تا جهش مشاهده‌شده به این روش تأیید شود.

یافته‌ها در هر دو مبتلا جهش عامل بیماری به شکل هموزیگوت مشاهده شد که یکی از آن‌ها دارای جهش c.443G>A در اگزون ۴ ژن GLB1 بود و در مبتلای دیگر نیز جهش c.313A>G در اگزون ۳ ژن GALNS مشاهده شد.

نتیجه‌گیری دو جهش بیماری‌زای عامل بیماری سندرم مورکیو در دو فرد ایرانی در این مطالعه دیده شد که تکنیک NGS روش بسیار خوب و قابل اعتمادی برای پیدا شدن این دو جهش بود. جهش c.313A>G در ژن GALNS برای اولین بار در این مطالعه دیده شد و تا به حال این جهش در دنیا گزارش نشده بود.

کلیدواژه‌ها:
موکوپلی ساکاریدوز، MPS، سندرم مورکیو، NGS

مقدمه

بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی (LSD) حدوداً ۵۰ بیماری را شامل می‌شوند که وجه اشتراک تمامی آن‌ها تجمع یکسری از مواد زاید (ماکرومولکول‌ها) در اندامک لیزوزوم سلول‌هاست [۱]. یکی از معروف‌ترین بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی بیماری موکوپلی ساکاریدوزیس (MPS) است که نوعی بیماری متابولیکی وراثتی و ناشی از نقص در گروهی از آنزیم‌های لیزوزومی است که نقش این آنزیم‌ها شکستن و تخریب زنجیره‌های طویل کربوهیدراتی به نام گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) است که این پلی‌ساکاریدها ناشی از تکرارهای بسیار زیادی از دی‌ساکاریدها هستند. GAGهایی که سبب این بیماری می‌شوند شامل هپاران سولفات (HS)، درماتان سولفات (DS)، کراتان سولفات (KS)، کندروایتین سولفات (CS) و هیالورونان هستند [۲، ۳]. در بیماری MPS تجمع این مواد در اندامک لیزوزوم در سلول‌ها صورت می‌گیرد که سپس در جریان خون ترشح می‌شوند و درنهایت از طریق ادرار دفع می‌شوند. نقص در ۱۱ آنزیم سبب افزایش این پنج پلی‌ساکارید در بیماران می‌شود که درمجموع باعث به وجود آمدن هفت تیپ متفاوت بیماری MPS می‌شود (در جدول شماره ۱ نام آنزیم‌ها و نوع بیماری MPS به وجود آمده توضیح داده شده است).

* نویسنده مسئول:
دکتر سیروس زینلی
نشانی: تهران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، گروه پزشکی مولکولی.
تلفن: ۱۳۷۲۰۴۰ (۹۱۲) ۹۸+
پست الکترونیکی: zeinali@kawsar.ir

جدول ۱. انواع تیپ‌های بیماری MPS به همراه نام آنزیم، ژن مربوط، نوع وراثت و نوع GAG افزایش‌یافته

تیپ بیماری	نقص آنزیمی (ژن)	وراثت	افزایش یافتهGAG
MPS I سندرم هورلر	α-L-iduronidase (IDUA)	اتوزوم مغلوب	HS and DS
MPS II سندرم هانتر	Iduronate Sulfatase (IDS)	وابسته به جنس مغلوب	HS and DS
MPS III (A-D) سندرم سان فیلیپو	A: Heparan sulfamidase (SGSH) B: N-acetylglucosaminidase (NAGLU) C: Heparan-α-glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT) D: N-acetylglucosamine 6-sulfatase (GNS)	اتوزوم مغلوب	HS
MPS IV (A and B) سندرم موركيو	A: galatosamine-6-sulfatase (GALNS) B: β-galactosidase (GLB1)	اتوزوم مغلوب	A: CS and KS B: KS
MPS VI سندرم ماروتو لامی	Arylsulfatase B (ARSB)	اتوزوم مغلوب	DS
MPS VII سندرم اسلای	B-glucuronidase (GUSB)	اتوزوم مغلوب	HS, DS, and CS
MPS IX سندرم ناتوویسز	Hyaluronidase (HYAL1)	اتوزوم مغلوب	HA

افق دانش

تیپ چهارم بیماری MPS سندرم موركيو نام دارد که این تیپ بیماری خود به دو دسته تقسیم می‌شود و دو ژن متفاوت از هم هرکدام می‌توانند به‌تنهایی باعث بروز این بیماری شوند. وراثت هر دو ژن از نوع اتوزوم مغلوب است و بنابراین این تیپ در ازدواج‌های خویشاوندی شایع‌تر است [۴].

شایع‌ترین تیپ MPSIV تیپ A آن است که این تیپ بیماری ناشی از کمبود یا عدم حضور آنزیم گالاکتوزآمین ۶ سولفاتاز (EC 3.1.6.4) است. ژن GALNS (NM_000512.4) مسئول تولید این آنزیم در سلول‌هاست که این ژن ۵۲۲ اسیدامینه را کد می‌کند و دارای ۱۴ اگزون است. جایگاه کروموزومی این ژن 16q24.3 است. آنزیم گالاکتوزآمین ۶ سولفاتاز مسئول حذف گروه‌های سولفات از N ترمینال استیل گالاکتوزآمین ۶ سولفات در موکوپلی ساکاریدهایی چون کراتان سولفات و کندروایتین سولفات است. درنتیجه در بیماران MPSIV A به دلیل نقص ژنی در این آنزیم، میزان GAG افزایش‌یافته در سلول‌ها، کراتان سولفات و کندروایتین سولفات است. شیوع این تیپ بیماری، یک در هر ۲۰۰ هزار تولد نوزاد زنده در جهان تخمین زده شده است [۵]. علائم بالینی موركيو A شامل اختلالات اسکلتی، کاهش شنوایی، مشکلاتی در قرنیه چشم‌ها، نارسایی‌های قلبی، کوتاه بودن غیرطبیعی قد، اسکلیوز، کیفوز، نقص مینای دندان‌ها، سفتی بیش از حد مفاصل، پیشانی برجسته و گردن کوتاه است. علائم این تیپ از بیماری معمولاً در دوسالگی با افزایش کراتان سولفات و کندروایتین سولفات بروز پیدا می‌کند که اولین علائم ظاهرشونده هم اختلالات اسکلتی و انحنای ستون فقرات است [۵].

تیپ دوم MPSIV نوع B آن است که این تیپ بر اثر کمبود یا عدم حضور آنزیم بتا گالاکتوزیداز (E.C.3.2.1.23) (β-Gal) ایجاد می‌شود. این آنزیم توسط ژنی به نام GLB1 (NM_000404.3) کد می‌شود. این ژن دارای جایگاه کروموزومی 3p22.3 است که ۶۷۷ اسیدآمینه را نیز کد می‌کند و ۱۶ اگزون دارد. نقص ژنی GLB1 غیر از MPSIV B سبب ایجاد بیماری دیگری به نام GM1 gangliosidosis نیز می‌شود. به عبارتی ایجاد موتاسیون در ژن GLB1 باعث نقص در فعالیت آنزیم β-Gal می‌شود که این آنزیم برای تجزیه فسفولیپید GM1 gangliosidosis و کراتان سولفات در سلول‌های بدن کاربرد دارد. درنتیجه در بیماران B GAG، MPSIV افزایش‌یافته در بدن، کراتان سولفات است. این تیپ بیماری معمولاً با تغیرات اسکلتی مانند دیسپلازی اسکلتی و کوتاهی قد همراه است.

مبتلایان بیماری را در دوران نوزادی یا بدو تولد نشان نمی‌دهند و معمولاً در سن دوسالگی به بعد با مشکلات راه رفتن بروز بیماری را نشان می‌دهند. رفته‌رفته علائم دیگر این بیماری همچون مشکلات تنفسی، مشکلات خواب، بیماری‌های دریچه قلبی، اختلالات شنوایی و اختلالات قرنیه چشم نیز با افزایش سن بروز می‌یابند. هوش در این افراد تا حدی نسبت به افراد سالم پایین‌تر است [۶-۱۰].

در این طرح تحقیقاتی دو بیمار مبتلا به MPSIV مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند تا جهش‌های عامل بروز این بیماری در آن‌ها مشخص شود. هر دو مبتلا از طریق تکنیک NGS[1] توالی یابی شدند تا درنهایت جهش ژنتیکی عامل بروز بیماری در آن ها مشاهده شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه دو کودک ایرانی مبتلا به سندرم مورکیو که هر دو حاصل ازدواج خویشاوندی بودند، به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی معرفی شدند. معیارهای ورود این بیماران در این مطالعه پایین بودن سطح آنزیم‌های دخیل در این تیپ بیماری MPS از طریق آزمایشات آنزیمی و تشخیص پزشکان متخصص بود. از هر دو خانواده رضایت‌نامه کتبی مبنی بر انجام تحقیق روی نمونه فرد مبتلا و خانواده او دریافت شد.

مبتلای اول پسری سه‌ساله بود که پدر و مادر او با یکدیگر دخترعمو پسرعمو بودند. اولین علائم ناهنجاری در این کودک تقریبا در ۱۸ماهگی و عفونت ریوی شدید و تشنج و سر بزرگ‌تر از حد طبیعی بوده است. سپس با افزایش سن، علائم بالینی دیگری که شامل لاغری بیش از حد پاها، عدم رشد دندان‌ها، لثه اضافی، چهره کاملاً متورم و خشن، سر بزرگ‌تر از حد طبیعی، عدم تکلم، از دست دادن کامل بینایی، کند ذهنی و نشان ندادن هیچ پاسخی به سر و صدا، سرفه‌های بیش از حد و مصرف داروهای ریوی، قادر نبودن به نشستن و ایستادن، کیفوز، بیرون‌زدگی جناغ سینه، عدم تکان دادن انگشتان دست، هپاتومگالی و اسپلنومگالی هستند، در او دیده شده است.

مبتلای دوم پسری ۱۴ساله است که او نیز حاصل ازدواج خویشاوندی است و در ۱۱سالگی بیماری را با عدم تعادل در راه رفتن نشان داده است و در حال حاضر عدم رشد کافی قد، جلو بودن بیش از حد فک، بینایی ضعیف، جلو بودن غیرطبیعی جناغ سینه و درد لگن و مفاصل زانو نیز در او تظاهر یافته‌اند.

مراحل انجام کار

پس از انجام مشاوره ژنتیک، از بیمار و تمام اعضای خانواده ایشان سی‌سیب ۱۰ خون وریدی دریافت شد. سپس DNA ژنومی به روش نمک اشباع[2] [۱۱] تخلیص شد. DNA تخلیص‌شده هر دو مبتلا NGS شد تا جهش‌های عامل بیماری در دو مبتلا با سرعت بیشتری پیدا شود. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، در مبتلای یک در ژن GLB1 و در مبتلای دو در ژن GALNS جهش عامل بیماری به صورت هموزیگوت مشاهده شد. سپس اگزونی که در هر مبتلا به عنوان جهش عامل بیماری دیده شده بود، با استفاده از تکنیک تعیین توالی سنگر تعیین توالی شد تا جهش مشاهده‌شده در دو مبتلا تأیید شود. سپس هر دو جهش پیدا شده از لحاظ بیماری‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند تا صحت بیماری‌زا بودن آن‌ها تأیید شود.

یافته‌ها

نتایج حاصل از NGS به این صورت بود که مبتلای شماره یک دارای جهش c.443G>A در ژن GLB1 به صورت هموزیگوت در اگزون چهار بود که این جهش پیش از این مطالعه در جمعیت دیگری نیز گزارش شده بود و بیماری‌زایی آن تأیید شده بود [۱۲]. مبتلای شماره دو نیز دارای جهش c.313A>G در ژن GALNS به شکل هموزیگوت و در اگزون سه این ژن بود که این جهش برای اولین‌بار در این مطالعه دیده شد و تا به امروز گزارش نشده بود (نتایج گزارش‌شده NGS در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است). سپس برای تأیید این جهش‌ها، اگزون چهار ژن GLB1 در مبتلای یک و اگزون سه ژن GALNS در مبتلای دو با روش سنگر تعیین توالی شد که در هر دو مبتلا جهش‌های پیداشده با روش سنگر نیز تأیید شدند (نتایج تعیین توالی سنگر این اگزون‌ها نیز در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است).

بحث

سندرم مورکیو تیپ چهارم بیماری MPS است که دارای دو تیپ A و B است. شیوع ابتلا به این بیماری در کشورهای خاورمیانه همانند ایران به نسبت دیگر نقاط جهان به علت نرخ بالای ازدواج خویشاوندی بیشتر باشد (نرخ ازدواج خویشاوندی در ایران حدودا ۳۸/۶ درصد است [۱۳، ۱۴]. در این مطالعه دو بیمار که یکی مبتلا به مورکیو A و دیگری مورکیو B بودند مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند تا جهش عامل بیماری آن‌ها در ژن‌های GLB1 و GALNS پیدا شود.

در این مطالعه جهش c.313A>G در ژن GALNS برای اولین‌بار در یکی از مبتلایان مشاهده شد که تا به حال در دنیا گزارش نشده است. این جهش سبب جابه‌جا شدن اسیدآمینه آرژنین با گلاسین در کدون ۱۰۵ می‌شود. طبق نتیجه NGS، این جهش از نوع Class 2 و بیماری‌زاست. آرژنین یک اسیدآمینه باردار مثبت و هیدروفیل است، اما گلایسین خنثی و هیدروفوب است و کاملاً با یکدیگر تفاوت دارند. همچنین گلایسین به لحاظ ساختاری کوچک‌تر از آرژنین است (تصویر شماره ۳ الف). در فرم طبیعی پروتئین آرژنین در جایگاه خود یک پل نمکی با گلوتامیک اسید در جایگاه ۴۱۰ تشکیل می‌دهد که این موتاسیون کاملاً این میانکنش را به دلیل از بین رفتن بار یونی مناسب برهم می‌زند. آرژنین به دلیل بار مثبتش با گلوتامیک اسید که دارای بار منفی است در این میان‌کنش حضور دارد. همچنین این ناحیه به عنوان یک دومین

1. Next Generation Sequencing
2. Salting out

الف

Gene & transcript	Variant	Associated disease	OMIM	Zygosity[a]
GLB1 NM_000404.3	c.443G>A p.R148H	GM1-gangliosidosis, type I, II,III Mucopolysaccharidosis type IVB	230500 253010	Hom
CADD[c] score	**Polyphen**	**dbSNPrsID[b]**	**Classification[e] (ClinVar)**	**Inheritance[d]**
34	Probably damaging	rs745864233	NR	AR

ب

Variant with possible relevance to patient's phenotype

Gene	position (hg38)	HGVSc/HGVSp (RefSeq transcript)	Variant type (Exon No/Total exon No)	Zygosity (index)	Variant classification*
GALNS	Chr16: 88841903	NM_000512.4:c.313A>G NP_000503.1:p.Arg105Gly	missense, (moderate impact) (3/14)	Homo (A>G)	Likely pathogenic (Class 2)

*variant classification based on ACMG recommendations

The result is consistent with the genetic diagnosis of Mucopolysaccharidosis IVA (AR, #253000)

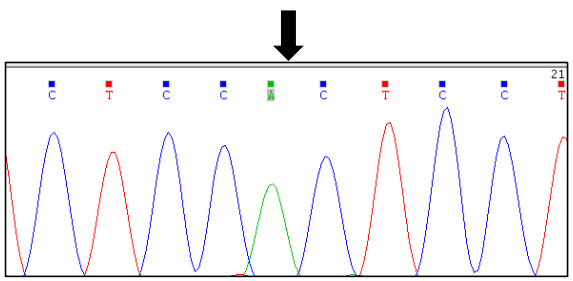
We recommend retrospective clinical analysis to evaluate the compatibility of phenotype with the identified variants, as well as genetic counselling.

افق دانش

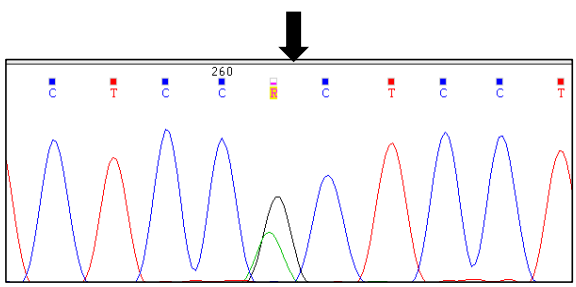
تصویر ۱. نتایج حاصل از NGS در هر دو مبتلا نشان داده شده است. در تصویر الف جهش c.443G>A در ژن GLB1 در مبتلای یک و در تصویر ب جهش c.313A>G در ژن GALNS در مبتلای دو گزارش شده‌اند.

کاتالیتیکی عمل می‌کند که این موتاسیون کاملاً این نقش را از بین می‌برد. گلایسین از لحاظ ساختاری اسیدآمینه‌ای انعطاف‌پذیر است که این ناحیه از پروتئین باید سخت و محکم باشد و وجود گلایسین در این ناحیه کاملاً ساختار پروتئین را تغییر داده و در عملکرد آن، تأثیر مستقیم می‌گذارد (تصویر شماره ۳ ب) [۱۵].

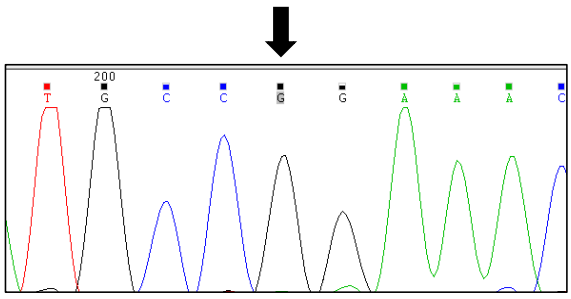
جهش c.443G>A در ژن GLB1 جهش دیگری بود که در این



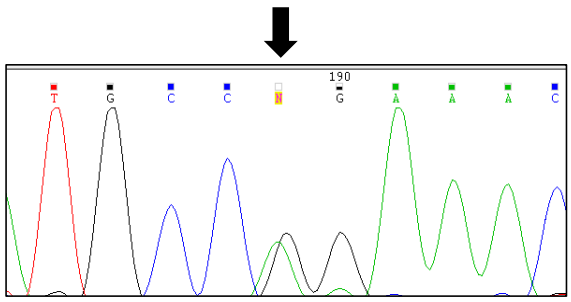
الف. جهش c.443G>A به شکل هموزیگوت در مبتلای ۱



ب. جهش c.443G>A به شکل هتروزیگوت در پدر مبتلای ۱



ج. جهش c.313A>G به شکل هموزیگوت در مبتلای ۲

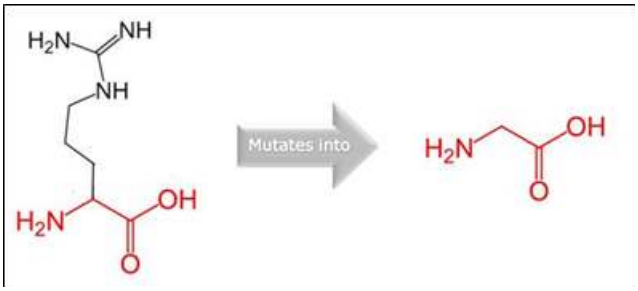


د. جهش c.313A>G به شکل هتروزیگوت در پدر مبتلای ۲

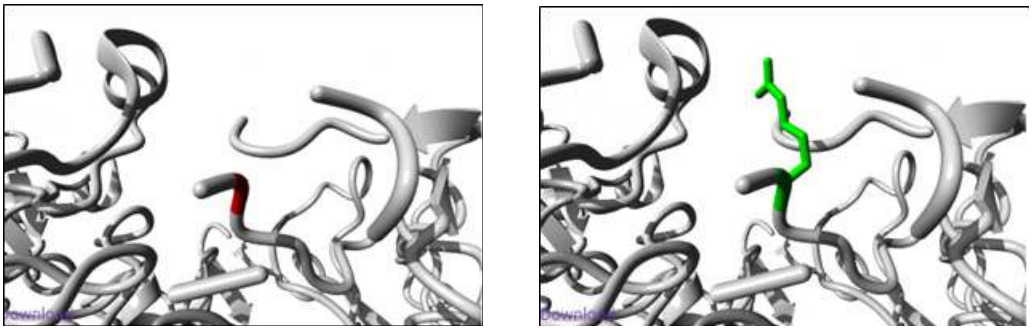
افق دانش

تصویر ۲. نتایج حاصل از تعیین توالی سنگر برای تأیید جهش‌های پیداشده در NGS نشان داده شده است. تصویر الف و ب مربوط به جهش c.443G>A در فرد مبتلای یک و پدر وی (ژن GLB1) است و تصویر ج و د نیز مربوط به جهش c.313A>G در مبتلای دو و پدر وی (ژن GALNS) است. تصویر الف و ج حالت هموزیگوت جهش‌ها را نشان می‌دهند که مربوط به مبتلایان است و تصویر ب و د نیز تعیین توالی پدر هر دو مبتلا را نشان می‌دهد که هر دو ناقل جهش هستند.

الف



ب



افق دانش

تصویر ۳. در تصویر الف نشان داده شده که اسیدآمینه آرژنین (سمت چپ) بزرگ‌تر از گلاسین (سمت راست) است و این تغییر سایز می‌تواندکانفورماسیون پروتئین را تغییر دهد. در تصویر ب تغییر کانفورماسیون پروتئین نشان داده شده است. در تصویر سمت چپ پروتئین با وجود اسیدآمینه گلایسین و حالت موتانت نشان داده شده که قرمز است. در تصویر سمت راست حالت طبیعی پروتئین نشان داده شده است که اسیدآمینه آرژنین است.

مطالعه در یک مبتلا به صورت هموزیگوت دیده شد و پیش از این مطالعه در دنیا به عنوان یک جهش بیماری‌زا گزارش شده بود. کاسیوتی و همکارانش در سال ۲۰۱۱، ۲۱ بیمار MPS را مورد آنالیز ژنتیکی قرار دادند که چهار بیمار آن‌ها نوع سندرم مورکیو B بودند. در نتیجه تعیین توالی ژن GLB1 در این چهار بیمار موتاسیون c.443G>A در یکی از بیماران برای اولین‌بار مشاهده شد. [۱۲]. این جهش سبب جابه‌جا شدن اسیدآمینه آرژنین با هیستیدین در کدون ۱۴۸ ژن GLB1 می‌شود. به لحاظ اندازه، آرژنین بزرگ‌تر از هیستیدین است. در فرم طبیعی، پروتئین آرژنین در جایگاه خود با گلوتامیک اسید در جایگاه ۱۸۶ پیوند هیدروژنی می‌دهد. تفاوت اندازه آرژنین با هیستیدین می‌تواند در ایجاد این پیوند هیدروژنی با گلوتامیک اسید تداخل ایجاد کند و مانع تشکیل این پیوند شود. همچنین اسیدآمینه آرژنین در این موقعیت با گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۸۶، گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۸۸ و آسپارتیک اسید در موقعیت ۲۲۱ پل نمکی تشکیل می‌دهد که تبدیل شدن این اسیدآمینه به هیستیدین در تشکیل این پل‌های نمکی نیز مشکل‌ساز می‌شود [۱۵]. درنتیجه این جهش نیز به عنوان یک جهش بیماری‌زا در ژن GLB1 تلقی می‌شود.

برای یافتن جهش‌های بیماری‌زای بیشتر در بیماری MPSIV لازم است نمونه‌های بیشتری از تمامی مناطق ایران تهیه شود تا بتوان جهش‌های ژنتیکی بیشتر و گزارش‌نشده در دنیا را پیدا کرد. از این طریق می‌توان به همبستگی ژنوتیپ فنوتیپ در این بیماری نیز دست یافت. با بررسی تعداد نمونه‌های مبتلای بیشتر می‌توان اگزون‌های شایع ژن‌های GALNS و GLB1 را از نظر میزان جهش‌پذیری نیز مورد بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات انجام‌شده در دنیا در ارتباط با انواع تیپ‌های بیماری موکوپلی ساکاریدوز، امیدواریم نتایج این مطالعه کمک بزرگی به تشخیص پیش از تولد بیماری موکوپلی ساکاریدوز تیپ چهار بکند. با توجه به اینکه در این مطالعه یک جهش جدید و گزارش‌نشده در دنیا برای اولین‌بار دیده شد، پیشنهاد می‌شود که جامعه آماری بزرگ‌تری از بیماری موکوپلی ساکاریدوز مورد بررسی ژنتیکی قرار بگیرند تا بتوان جهش‌های بیماری‌زای بیشتری را در مبتلایان ایرانی گزارش داد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پیروی از اصول اخلاق پژوهش مطالعه حاضر در کمیته اخلاق مرکز پژوهشی ژنتیک انسانی کوثر به تأیید رسیده است و شماره فرم پیوست انجام آن ۹۸/۶۲۹۹ است.

حامی مالی

این مطالعه از پایان‌نامه دکترای سید مهدی شفاعت در رشته زیست شناسی گرایش ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال استخراج شده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از تمام همکاران عزیز آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و دانشگاه آزاد واحد تهران شمال که در نوشتن این مقاله کمک بزرگی کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Bouwman MG, Teunissen QG, Wijburg FA, Linthorst GE. 'Doctor Google' ending the diagnostic odyssey in lysosomal storage disorders: Parents using internet search engines as an efficient diagnostic strategy in rare diseases. Archives of Disease in Childhood. 2010; 95(8):642-4. [DOI:10.1136/adc.2009.171827] [PMID]

[2] Wraith JE. The mucopolysaccharidoses: A clinical review and guide to management. Archives of Disease in Childhood. 1995; 72(3):263-7. [DOI:10.1136/adc.72.3.263] [PMID] [PMCID]

[3] Sheth J, Patel P, Sheth F, Shah R. Lysosomal storage disorders. Indian Pediatrics. 2004; 41(3):260-5. [PMID]

[4] Bleier M, Yuskiv N, Priest T, Moisa Popurs MA, Stockler-Ipsiroglu S, BC Children's Hospital, et al. Morquio B patient/caregiver survey: First insight into the natural course of a rare GLB1 related condition. Molecular Genetics and Metabolism Reports. 2018; 16:57-63. [DOI:10.1016/j.ymgmr.2018.06.006] [PMID] [PMCID]

[5] Rivera-Colón Y, Schutsky EK, Kita AZ, Garman SC. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. Journal of Molecular Biology. 2012; 423(5):736-51. [DOI:10.1016/j.jmb.2012.08.020] [PMID] [PMCID]

[6] Hofer D, Paul K, Fantur K, Beck M, Bürger F, Caillaud C, et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: Expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid beta-galactosidase. Human Mutation. 2009; 30(8):1214-21. [DOI:10.1002/humu.21031] [PMID]

[7] Santamaria R, Chabás A, Coll MJ, Miranda CS, Vilageliu L, Grinberg D. Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: Possible common origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies. Human Mutation. 2006; 27(10):1060. [DOI:10.1002/humu.9451] [PMID]

[8] Lei HL, Ye J, Qiu WJ, Zhang HW, Han LS, Wang Y, et al. Beta-galactosidase deficiencies and novel GLB1 mutations in three Chinese patients with Morquio B disease or GM1 gangliosidosis. World Journal of Pediatrics. 2012; 8(4):359-62. [DOI:10.1007/s12519-012-0382-0] [PMID]

[9] Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, Sinigerska I, et al. Novel beta-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. American Journal of Medical Genetics. Part A. 2008; 146A(13):1736-40. [DOI:10.1002/ajmg.a.32318] [PMID]

[10] Paschke E, Milos I, Kreimer-Erlacher H, Hoefler G, Beck M, Hoeltzenbein M, et al. Mutation analyses in 17 patients with deficiency in acid beta-galactosidase: Three novel point mutations and high correlation of mutation W273L with Morquio disease type B. Human Genetics. 2001; 109(2):159-66. [DOI:10.1007/s004390100570] [PMID]

[11] 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. [DOI:10.1093/nar/16.3.1215] [PMID] [PMCID]

[12] Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y, Procopio E, Catarzi S, Ferri L, et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: An update on genetic alterations and clinical findings. Biochimica et Biophysica Acta. 2011; 1812(7):782-90. [DOI:10.1016/j.bbadis.2011.03.018] [PMID] [PMCID]

[13] Shafaat M, Alaee MR, Rahmanifar A, Setoodeh A, Razzaghy-Azar M, Bagherian H, et al. Autozygosity mapping of methylmalonic acidemia associated genes by short tandem repeat markers facilitates the identification of five novel mutations in an Iranian patient cohort. Metabolic Brain Disease. 2018; 33(5):1689-97. [DOI:10.1007/s11011-018-0277-4] [PMID]

[14] Shafaat M, Hashemi M, Majd A, Abiri M, Zeinali S. Genetic testing of mucopolysaccharidoses disease using multiplex PCR- based panels of STR markers: In silico analysis of novel mutations. Metabolic Brain Disease. 2019; 34(5):1447-55. [DOI:10.1007/s11011-019-00434-z] [PMID]

[15] Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. BMC Bioinformatics. 2010; 11:548. [DOI:10.1186/1471-2105-11-548] [PMID] [PMCID]