



Research Article

Identification of Mutation in RNF170 Gene in a Person with Hereditary Spastic Paraplegia Using Whole Exome Sequencing Method

Negar Rezakhani ¹ , Abdolazim Sarli ² , Milad Gholami ^{3,*}

¹ Student Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² Gorgan Congenital Malformations Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

³ Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

* **Corresponding author:** Milad Gholami, Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. E-mail: mtu.q220@gmail.com

DOI: [10.61186/jams.26.1.41](https://doi.org/10.61186/jams.26.1.41)

How to Cite this Article:

Rezakhani N, Sarli A, Gholami M. Identification of Mutation in RNF170 Gene in a Person with Hereditary Spastic Paraplegia Using Whole Exome Sequencing Method. *J Arak Uni Med Sci.* 2022;**26**(1):41-47. DOI: [10.61186/jams.26.1.41](https://doi.org/10.61186/jams.26.1.41)

Received: 14 Aug 2023

Accepted: 19 Dec 2023

Keywords:

Mutation
Hereditary Spastic Paraplegia
Whole Exome Sequencing
RNF170

© 2023 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Hereditary spastic paraplegia is a rare disease with different inheritance patterns. The prevalence of this disease is about 1.8 per 100 thousand people. Most of the affected patients are the result of consanguineous marriages. Weakness and muscle spasm is the main manifestation of this disease. The purpose of this study was to investigate the mutation analysis of a person with hereditary spastic paraplegia by the whole exome sequencing method.

Methods: Peripheral blood samples were obtained from a person suffering from gait disorder and lower limb spasm with autosomal recessive inheritance pattern. DNA extraction and whole exome sequencing was performed. After analyzing the data related to the whole exome sequence, the disease-causing mutation in the affected person was confirmed using Sanger sequencing method. Also, parents were investigated to separate mutation and carrier status. This study was approved by Arak University of Medical Sciences (code IR.ARAKMU.REC.1401.039). Ethical principles have been followed in accordance with the guidelines of the National Ethics Committee and COPE regulations.

Results: In the present study, a homozygous pathogenic mutation (NM_030954.4): c.304T>C (p.Cys102Arg) in the RNF170 gene was identified in the patient, therefore, hereditary spastic paraplegia type 85 was confirmed in him. Also, the parents of the affected person were heterozygous for the mutation.

Conclusions: Homozygous mutation in RNF170 gene was detected using whole exome sequencing method. A mutation in this gene causes hereditary spastic paraplegia. Considering the consanguineous marriage of carrier parents, this finding can be used for preventive measures in future children.

شناسایی جهش در ژن RNF170 در یک فرد مبتلا به پاراپلژی اسپاستیک توارثی با استفاده از روش توالی یابی کل اگزوم

نگار رضاخانی^۱ ID، عبدالعظیم سارلی^۲ ID، میلاد غلامی^۳ ID*

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۲ مرکز تحقیقات ناهنجاری‌های مادرزادی گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

^۳ گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

* نویسنده مسئول: میلاد غلامی، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. ایمیل:

mtu.q220@gmail.com

DOI: 10.61186/jams.26.1.41

چکیده

مقدمه: پاراپلژی اسپاستیک توارثی یک بیماری نادر با الگوهای متفاوت توارثی است. شیوع این بیماری در نوع اتوزوم غالب و مغلوب حدود ۱/۸ در هر ۱۰۰ هزار نفر است. اغلب افراد مبتلا در ایران حاصل ازدواج خویشاوندی می‌باشند. ضعف و اسپاسم عضلانی، تظاهر اصلی این بیماری است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی ژنتیکی یک فرد مبتلا به پاراپلژی اسپاستیک توارثی از طریق روش توالی یابی کل اگزوم بود.

روش کار: از یک فرد مبتلا به اختلال راه رفتن و اسپاسم اندام تحتانی و حاصل ازدواج خویشاوندی با الگوی توارث اتوزوم مغلوب نمونه خون محیطی تهیه، DNA استخراج و توالی یابی کل اگزوم انجام شد. پس از آنالیز داده‌های مرتبط با توالی یابی کل اگزوم، جهش مسبب بیماری در فرد مبتلا با استفاده از روش توالی یابی سنجر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پدر و مادر جهت تفکیک جهش و ناقل بودن بررسی شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک تأیید شده است (کد IR.ARAKMU.REC.1401.039). اصول اخلاقی مطابق با رهنمودهای کمیته اخلاق ملی و مقررات COPE رعایت شده است. این مطالعه با کد اخلاق IR.UOK.REC.1401.015 به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه کردستان رسیده است.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر جهش بیماری‌زای هموزیگوت (p.Cys102Arg) (NM_030954.4): c.304T>C در اگزوم شماره ۴ ژن RNF170 در فرد مبتلا شناسایی شد. نوع بیماری، پاراپلژی اسپاستیک توارثی تیپ ۸۵ تعیین شد. همچنین پدر و مادر فرد مبتلا واجد جهش به صورت هتروزیگوت و سالم بودند.

نتیجه‌گیری: با استفاده از روش توالی یابی کل اگزوم جهش هموزیگوت در ژن RNF170 شناسایی شد. جهش در این ژن مسبب بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی می‌شود. با توجه به ازدواج خویشاوندی والدین ناقل، از این یافته می‌توان برای اقدامات پیشگیرانه در فرزندان آینده استفاده کرد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۸

واژگان کلیدی:

جهش

پاراپلژی اسپاستیک توارثی

توالی یابی کل اگزوم و

RNF170

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

مقدمه

به دو نوع غیرسندرمی و سندرمی تقسیم‌بندی می‌شوند. در نوع غیرسندرمی افراد بیمار با اختلال عصبی محدود به ضعف پیشرونده اسپاستیک در اندام تحتانی و احساس لرزش در اندام تحتانی شناسایی می‌شوند و به طور معمول طول عمر کاهش نمی‌یابد؛ در حالی که در نوع سندرمی علائم دیگر مانند آتاکسی، تشنج، ناتوانی ذهنی، زوال عقل، آتروفی عضلانی و نوروپاتی محیطی نیز مشاهده می‌شود. همچنین بیماران بر اساس اینکه علائم را در دوره کودکی یا بعد از دوره کودکی نشان دهند به دو دسته زودرس و دیررس طبقه‌بندی می‌شوند (۷، ۸). جهش در ژن‌هایی مانند *SPAST*، *ATL1*، *SPG31*، *CYP7B1*، *SPG7*، *SPG11* و *LICAM* با الگوهای مختلف توارثی از شایع‌ترین مسبب‌های این بیماری است (۹).

پاراپلژی اسپاستیک توارثی یک تشخیص بالینی برای آن دسته از سندرم‌های عصبی است که در آن ضعف و اسپاسم دو طرفه اندام تحتانی با درجات متغیر تظاهر می‌یابد (۱، ۲). بر اساس مطالعات متاآنالیز انجام شده، شیوع این بیماری در نوع اتوزوم غالب و مغلوب در مجموع ۱/۸ در هر ۱۰۰ هزار نفر است (۳، ۴). بیماری می‌تواند از بدو تولد تا دهه هفتم زندگی تظاهر پیدا کند (۵). پاراپلژی اسپاستیک توارثی بسیار هتروژن با حداقل ۸۰ مکان ژنی شناسایی شده است و بر اساس نحوه توارث به انواع وابسته به جنس، اتوزومی مغلوب، اتوزومی غالب و میتوکندریایی تقسیم می‌شود، همچنین از دیدگاه بالینی با دیگر بیماری‌ها تشابه بالینی دارد و نیازمند تشخیص افتراقی است (۶). مطالعات مختلفی بر روی علت ژنتیکی بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی انجام شده است. بیماران بر اساس داشتن یا نداشتن علائم دیگر،

احتمالی از نرم افزارهای *insilico* مانند SIFT، Polyphen2، Mutation Taster استفاده شد.

واکنش PCR و توالی‌یابی سنگر

پس از آنالیز داده‌ها، جهت تفکیک و تأیید نقطه جهش، پرایمرها (F: CTGCACCTGACCTCGACATT and R: TGGGAATCCAGCCTTTGTACA) با استفاده از سایت OligoAnalyzer Primer3Plus طراحی شد و از طریق نرم افزار بررسی شد. همچنین اختصاصی بودن پرایمرها با استفاده از سایت پرایمر بلاست NCBI و UCSC In-Silico PCR ارزیابی شدند. جهت انجام واکنش PCR، از Master Mix شرکت آمپلیکون دانمارک استفاده کردیم. جهت تعیین دمای اتصال پرایمرها ابتدا از روش گرادیانت PCR استفاده کردیم. سپس برای انجام ۱ واکنش PCR نهایی: ۲ مایکرولیتر DNA، ۲۰ مایکرولیتر Master Mix، ۲۴ مایکرولیتر آب، ۱ مایکرولیتر پرایمر reverse و به همین مقدار forward استفاده شد. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر طبق شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲۵ ثانیه برای ۳۳ سیکل انجام شد. سپس بر روی محصول PCR با اندازه ۵۳۱ نوکلئوتید، توالی‌یابی سنگر با دستگاه ABI 3130XL (Applied Biosystems) انجام شد و نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas مورد بررسی و بلاست قرار گرفت.

یافته‌ها

دختر ۱۴ ساله با شجره‌نامه (شکل ۱) حاصل ازدواج خویشاوندی مشکوک به اختلال پاراپلژی اسپاستیک با علائم اختلال راه رفتن، اسپاسم اندام تحتانی و راه رفتن اسپاستیک با قومیت بلوچ به مشاور ژنتیک پزشکی مراجعه کرده بود. فرد مبتلا از کودکی در حرکت و دویدن نسبت به هم‌بازی‌هایش تأخیر داشته است. از ۱۲ سالگی درد در اندام تحتانی، هیپرفلکسی و کلونوس نیز در او مشاهده شد. در MRI مغز شواهدی از ضایعات فشاری و یا التهابی مشاهده نشد. همچنین فرد مبتلا، خواری با علائم مشابه داشته که فوت شده است. بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیکی ۵۳۳۷۸۷ واریانت شناسایی شد. بر اساس فیلترهای اعمال شده، فراوانی آلی کمتر از ۱ درصد و الگوی توارث اتوزومی مغلوب، واریانت‌ها به ۶۸ عدد هموزیگوت کاهش داده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای پیش‌بینی‌کننده بیماری‌زایی، واریانت‌های غیربیماری‌زا هموزیگوت از مطالعه خارج شدند و یک واریانت بیماری‌زا در اگزون شماره ۴ ژن $c.304T>C$ (p.Cys102Arg) شناسایی شد. این واریانت در پایگاه داده varsome.com نیز بررسی شد و بر اساس طبقه‌بندی ژرملاین احتمالاً بیماری‌زا گزارش شده شد. اسکور حفاظتی جهش مذکور، بر اساس برنامه phyloP100، ۸/۰۴۴ گزارش شد که حاکی از وقوع جهش در منطقه حفاظت شده اگزونی است. همچنین بر اساس پایگاه داده UniProt، واریانت مذکور بیماری‌زا گزارش شد.

پس از الکتروفورز محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد (شکل ۲ الف)، نتایج توالی‌یابی سنگر یک جهش بدمعنی (p.Cys102Arg) $c.304T>C$ (NM_030954.4) در اگزون شماره ۴ ژن *RNF170* را به صورت هموزیگوت در فرد مبتلا تأیید

جهش در ژن *RNF170* یکی از مسبب‌های جدید پاراپلژی اسپاستیک توارثی است. ژن *RNF170* بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۸ قرار دارد که حاوی ۱۲ اگزون است. ژن *RNF170* پروتئینی را کد می‌کند که در غشای شبکه آندوپلاسمی قرار دارد. این پروتئین به عنوان یک لیگاز بوبیکوئیتین E3 عمل می‌کند و واسطه یوبی کوئیتیناسیون و پردازش گیرنده‌های اینوزیتول ۱،۴،۵-تری فسفات (IP3) از طریق مسیر تخریب پروتئین مرتبط با شبکه آندوپلاسمی است. گیرنده‌های اینوزیتول ۱،۴،۵-تری فسفات نقش کلیدی در سیگنال دهی سلول ایفا می‌کنند. جهش در ژن *RNF170* با بیماری پاراپلژی اسپاستیک نوع ۸۵ همراهی دارد (۱۰).

با توجه به هتروژن بودن بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی بررسی اینگونه بیماری‌ها با استفاده از روش‌هایی با کارایی بالا مانند توالی‌یابی کل اگزوم ضمن شناسایی علت بیماری به تعیین پروفایل جهشی بیماری در ایران، به مدیریت و پیشگیری از بیماری نیز کمک می‌کند. شایان ذکر است به دلیل تشابه علائم با دیگر بیماری‌های توارثی مانند آتاکسی اسپینوسربال، زوال عقل زود هنگام، اسکروز جانبی آمیوتروفیک تنها راه تشخیص افتراقی آزمایش ژنتیک است. لذا در این مطالعه خانمی ۱۴ ساله با علائم مشابه به پاراپلژی اسپاستیک توارثی حاصل از یک ازدواج خویشاوندی با استفاده از روش توالی‌یابی کل اگزوم مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

نمونه‌گیری و استخراج DNA

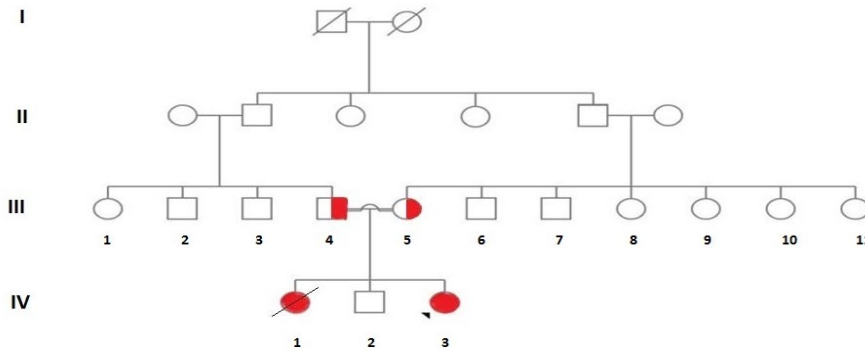
پس از اخذ کد اخلاق از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد IR.ARAKMU.REC.1401.039 از یک فرد مبتلا به اختلال راه رفتن و اسپاسم اندام تحتانی که حاصل ازدواج خویشاوندی بود و همچنین پدر و مادر او، ۶ سی سی خون محیطی جهت استخراج DNA با استفاده از روش salting-out اخذ شد. نمونه DNA افراد مورد مطالعه از دیدگاه کیفی با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

توالی‌یابی کل اگزوم

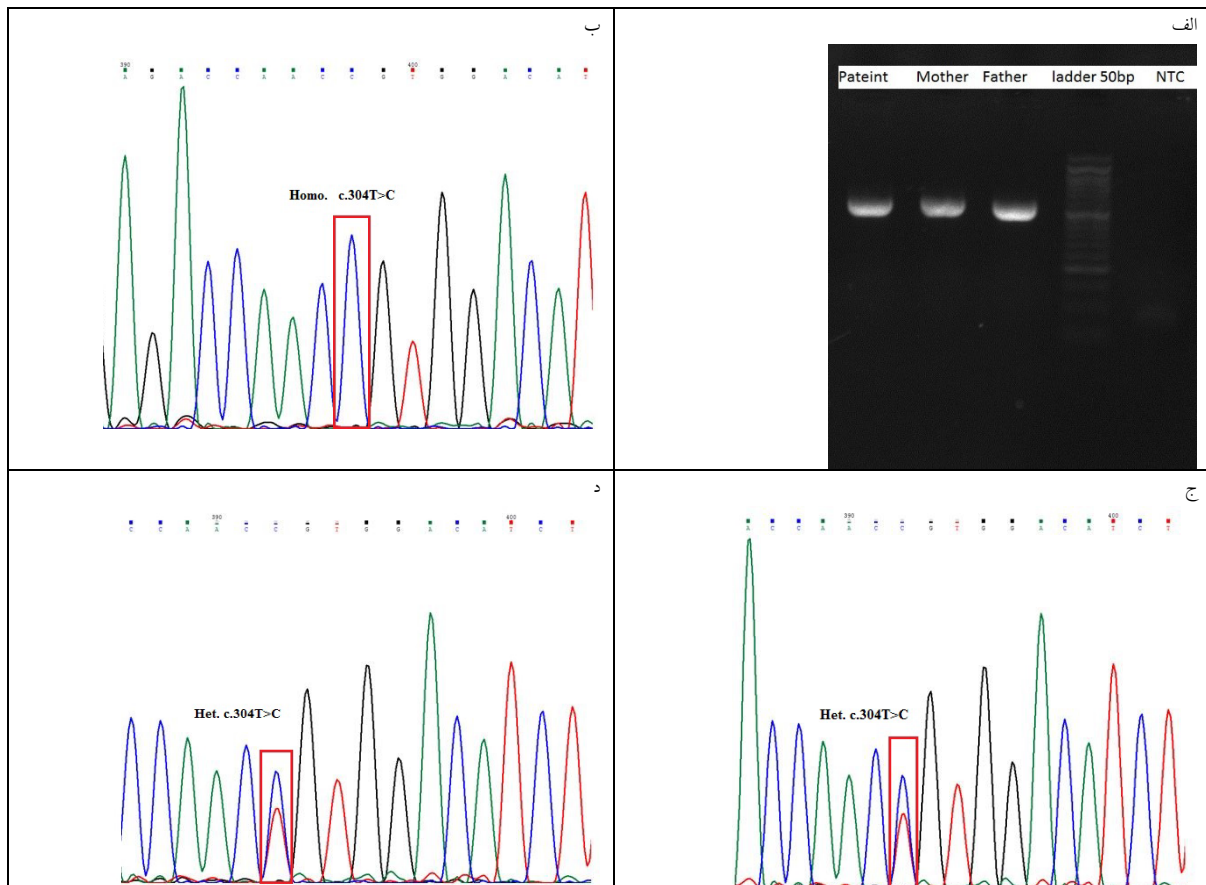
DNA فرد مبتلا از طریق توالی‌یابی کل اگزوم با استفاده از کیت NovaSeq SureSelect Human All Exon V7 r2 و پلتفرم NovaSeq 6000 بررسی شد. سپس فایل Fastq با استفاده از حذف آداپتورها و خوانش‌های با کیفیت کم کاهش ظرفیت داده شد و با نسخه ژنوم GRCh37 از سایت UCSC مورد تطابق قرار گرفت. خوانش‌های تکراری با استفاده از نرم افزار Picard نسخه 1.107 حذف شدند. در نهایت فایل BAM با استفاده از نرم افزار Samtools 0.1.18 ایجاد شد. SNP ها و indel با استفاده از نرم افزار GATK Unified Genotyper خوانش‌ها با استفاده از نرم افزار ANNOVAR تفسیر و توسط ddSNP نسخه ۱،۴۲، 1000Genome نسخه Phase3، Clin Var نسخه 05/2015، ESP نسخه ESP6500SI-V2 و پایگاه داده ایرانوم فیلتر شدند. واریانت‌هایی که فراوانی آلی آن‌ها کمتر از ۰/۰۱ درصد بود، برای آنالیز انتخاب شدند، سپس واریانت‌های ناجور و بسیار نادر در نواحی کدکننده و اسپلایسینگ انتخاب شدند. جهت پیش‌بینی واریانت‌های بیماری‌زای

باشد. پدر و مادر فرد مبتلا فاقد علائم بیماری و برای جهش هتروزایگوت بودند (شکل ۲ ج و د). این جهش فقط یک بار در پایگاه داده ژنوم ایرانوم در قومیت بلوچ در جهان گزارش شده است (۱۱). فراوانی آلی این جهش 0.00000398 در جمعیت دنیا است <https://varsome.com/variant/hg38/RNF170%3ACy.s102Arg?annotation-mode=germline>

کرد (شکل ۲ ب). جهش شناسایی شده با استفاده از نرم افزارهای پیش بینی کننده *insilico* بیماری را گزارش شد. همچنین در طبقه بندی ACMG با توجه به تفکیک جهش در والدین، بیماری را تشخیص داده شد. شناسایی ژن جهش یافته تشخیص بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی نوع ۸۵ را تأیید و همراهی خود را با علائم بیماری نشان داد. علائم شاخص این بیماری شامل هیپر رفلکسی، کلونوس، اسپاسم اندام تحتانی، راه رفتن اسپاستیک با سن بروز متنوع در کودکی تا نوجوانی می



شکل ۱. شجره نامه فرد مبتلا به با الگوی توارث اتوزومال مغلوب: نسل سوم پدر و مادر ناقل (شماره ۴ و ۵)، نسل چهارم به ترتیب خواهر فرد مبتلا، برادر سالم و فرد مبتلا (شماره ۱ الی ۳) را نشان می‌دهد.



شکل ۲. نتایج ژل آگارز و کروماتوگرام توالی یابی سنگر: الف) محصولات PCR با اندازه ۵۳۰ نوکلئوتید جهت اگزون شماره ۴ ژن *RNF170* برای فرد بیمار و والدین. ب) جهش *c.304T>C* (p.Cys102Arg) به صورت هموزیگوت در فرد مبتلا. ج و د) جهش هتروزایگوت در پدر و مادر فرد مبتلا

بحث

RNF170 یک لیگاز یوبیکوئیتین E3 است که در غشای شبکه آندوپلاسمی جای دارد و به واسطه یوبی کوئیتیناسیون و پردازش گیرنده‌های اینوزیتول ۱،۴،۵-تری فسفات در روند تخریب پروتئین‌ها نقش دارد. این ژن در بافت مختلف از جمله بازالگانگلیا مغز که مسئول کنترل حرکتی است بیان می‌شود. جهش در این ژن در سال ۲۰۱۹ برای اولین بار همراهی خود را با بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی نشان داد (۱۲).

در مطالعه حاضر جهش شناسایی شده در ژن *RNF170* به صورت هموزیگوت (chr8:42725165 A>G (NM_030954.4): c.304T>C (p.Cys102Arg) در فرد مبتلا شناسایی شد. این واریانت قبلاً در استان سیستان و بلوچستان ایران برای اولین بار گزارش شده بود و مطالعه ما برای دومین بار این نوع از جهش را در دنیا گزارش می‌کند. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ بر روی چهار خانواده که دو مورد از آن‌ها ایرانی بودند انجام شد، نتایج جهش در ژن یوبی کوئیتین لیگاز *RNF170* E3 که باعث تخریب گیرنده‌های اینوزیتول ۱،۴،۵ تری فسفات می‌شود را در ایجاد فرم مغلوب پاراپلژی اسپاستیک توارثی مشخص کرد. مکانیسم جهش‌های شناسایی شده در هر چهار خانواده از نوع فقدان عملکرد بود. یکی از این خانواده‌های ایرانی شامل چهار خواهر و برادر (سه پسر و یک دختر) بلوچ، حاصل ازدواج خویشاوندی بودند. جهش هموزیگوت بدمعنی c.304T>C, p.Cys102Arg در ژن *RNF170* با روش توالی‌یابی کل اگزوم در هر چهار فرد شناسایی شد. سن شروع علائم در هر چهار نفر ۲ سالگی گزارش شد و افراد در زمان مطالعه ۱۲، ۱۱، ۷ و ۴ سال داشتند. تنها فرد بزرگتر از سن ۱۱/۵ سالگی توانایی راه رفتن مستقل را از دست داده بود و دچار آتروفی شدید و جنرالیزه عضلات شده بود و باقی افراد قادر به راه رفتن مستقل و فاقد آتروفی عضلانی بودند. تأخیر در رشد حرکتی، اختلال تکلم، اسپاستیسیته اندام تحتانی، افزایش رفلکس تاندون عمقی اندام تحتانی، پاسخ کف پای اسپاستیک، آتاکسی از تظاهرات بالینی هر چهار فرد بود. آتروفی عصب بینایی با افزایش سن تشدید یافته و در فرد بزرگتر آتروفی شدید عصب بینایی مشاهده شد. فرد ۱۱ و ۱۲ ساله ضعف اندام تحتانی، اختلال بلع و آتروفی مخچه در MRI داشتند در حالیکه در دو فرد دیگر این علائم یافت نشد. خانواده ایرانی دیگر از استان فارس که شامل دو برادر که حاصل ازدواج خویشاوندی بودند، تحت بررسی قرار گرفتند. جهش هموزیگوت تغییر چهارچوب p.Arg173Asnfs*49 در هر دو فرد در ژن *RNF170* شناسایی شد. سن شروع علائم ۳ سالگی گزارش شد و در زمان مطالعه ۱۷ و ۲۳ سال داشتند. این افراد هنوز قادر به راه رفتن مستقل بودند. اختلال بینایی، اختلال تکلم، اسپاستیسیته اندام فوقانی و تحتانی، افزایش رفلکس تاندون اندام فوقانی و تحتانی، ضعف اندام تحتانی، پاسخ کف پای اسپاستیک و آتاکسی از علائم این بیماران بود (۱۱). مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ بر روی چهار خواهر و برادر یک زوج از گینه هستند که با هم فامیل دور هستند انجام شد. توالی‌یابی کل اگزوم بر روی DNA استخراج شده از لکوسیت‌های مشتق شده از خون ۴ فرد مبتلا و هر دو والدین آنها انجام شد. جهش جدید p.(Tyr114*) در ژن *RNF170* که منجر به فرم اتوزوم مغلوب پاراپلژی اسپاستیک توارثی می‌شود به

صورت هموزیگوت شناسایی شد. علائم از سن ۳ سالگی شروع شده و شامل اسپاستیسیته اندام فوقانی و تحتانی، ضعف اندام تحتانی، ناتوانی در راه رفتن مستقل و آتروفی عضلات اندام تحتانی بود (۱۲).

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ توسط رحیمی بیدگلی در ایران بر روی یک خواهر و برادر حاصل ازدواج فامیلی انجام شد، جهش جدید هموزیگوت بی معنی *c.853T: p.R285 در ژن *CAPNI* مرتبط با الگوی اتوزوم مغلوب بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی با استفاده از توالی‌یابی کل اگزوم و روش سنگر شناسایی شد. علائم بیماران از سن ۲۵ سالگی و با سفتی اندام تحتانی و سختی در راه رفتن مخصوصاً در سرما شروع شد. راه رفتن اسپاستیک، هیپررفلکسی اندام تحتانی و پاسخ کف پای اکستانسور از سایر علائم بیماران بودند. اختلال تکلم، بینایی و حسی و بی‌اختیاری ادرار و مدفوع در بیماران دیده نشد. فرد بزرگتر (۳۷ سال) اخیراً دچار سختی در حفظ تعادل شده است و در Brain MRI آتروفی خفیف طناب نخاعی در ناحیه گردنی و سینه‌ای گزارش شد، درحالیکه فرد کوچکتر (۳۱ سال) این علائم را نداشت (۱۳). مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ در ایران بر روی پنج فرد از سه خانواده غیر مرتبط (کرد، آذری، لر) مبتلا به اختلال پاراپلژی اسپاستیک توارثی انجام شد، منجر به شناسایی سه جهش هموزیگوت جدید c.978delT; p.Q327Kfs*39 در ژن *ENTPD1* (SPG64) (تغییر چهارچوب)، c.A1208G; p.D403G در ژن *CYP7B1* (SPG5A) (بد معنی) و *ZFYVE26* (SPG15) c.3811delT; p.S1271Lfs*44 در ژن (تغییر چهارچوب) با الگوی توارث اتوزوم مغلوب با استفاده از روش توالی‌یابی کل اگزوم و سنگر شد. این افراد حاصل ازدواج خویشاوندی بودند و والدین آن‌ها از نظر فنوتیپی سالم و ناقل جهش بودند. سن شروع علائم در *SPG64* کمتر از ۵ سال گزارش شد و علائم شامل: اسپاستیسیته اندام فوقانی و تحتانی، ضعف اندام تحتانی، اختلال تکلم، پاسخ کف پای اکستانسور، کاهش رفلکس تاندون عمقی در اندام تحتانی، راه رفتن اسپاستیک، بی‌اختیاری ادرار و راه رفتن با کمک واکر بود. سن شروع علائم در *SPG5A* حدوداً از ۱۸ سالگی بود ولی علائم تقریباً مشابه با فرم قبلی بود و تفاوت در افزایش رفلکس تاندون عمقی در اندام تحتانی در این مورد بود. در *SPG15* علائم از ۱۱ سالگی شروع شدند و ناتوانی در یادگیری، افزایش رفلکس‌های تاندون عمقی در اندام تحتانی، کورپوس کالوزوم نازک و نقص در ماده سفید مغز و آتروفی خفیف مخچه از علائم متمایز دو جهش دیگر بود (۱۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ توسط فرازی فرد و همکارانش انجام شد، ۱۰ خانواده از ۶ کشور (ایران، آمریکا، آلمان، کانادا، بلغارستان، اسپانیا) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از توالی‌یابی سنگر جهش *UBAPI* ژن در خانواده ایرانی شناسایی شد که مرتبط با فرم اتوزوم غالب بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی است. این نوع تغییر چارچوب در *GENESIS*، *gnomAD*، *ExAC* و همچنین در پروژه ژنوم ایرانی وجود نداشت. سه مرد و دو زن از خانواده ایرانی بررسی شدند. سن شروع علائم از ۷ تا ۱۳ سالگی بود. با افزایش طول مدت بیماری افراد توانایی راه رفتن مستقل را از دست دادند به طوری که فردی که ۵۹ سال از زمان شروع علائم بیماری می‌گذشت، توانایی راه رفتن را به طور

هدف دارویی اولیه برای همه زیرگروه‌های HSP نیاز روز است (۱۹). یکی از کاربردهای بالقوه نتایج مطالعه حاضر استفاده از روش‌های نوین ژن درمانی است. شناسایی جهش‌های مسبب بیماری‌های تک ژنی مانند اختلال پاراپلژی اسپاستیک توارثی علاوه بر اینکه به تأیید و تشخیص کمک می‌کند، امکان استفاده از روش‌های درمانی نوین را جهت مدیریت بهتر بیماری برای فرد مبتلا در دسترس قرار می‌دهد. همچنین به شناسایی افراد ناقل کمک کرده و این افراد در ازدواج یا بارداری‌های بعدی خود می‌توانند از اقدامات پیشگیرانه مانند تشخیص ژنتیکی قبل از لانه‌گزینی و تشخیص قبل از تولد استفاده کنند. با توجه به اینکه بیماری‌های تخریب عصبی بعد از تولد بار مالی و روانی زیادی را به خانواده‌ها و اجتماع تحمیل می‌کند اینگونه اقدامات پیشگیرانه، کمک شایانی به کاهش بار مالی و روانی خانواده و دولت دارد. همچنین شایان ذکر است با توجه به تعداد زیاد ژن‌های دخیل در ایجاد این دسته از بیماری‌ها، طبقه بندی مولکولی HSP نیاز به استفاده از روش توالی‌یابی نسل بعد با توان بالا مانند توالی‌یابی کل اگزوم دارد که قدرتمندترین روش شناسایی جهش در بیماری‌های توارثی است به ویژه در مواردی که یک تشخیص بالینی دقیق میسر نیست.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر یک بیمار مبتلا به اختلال پاراپلژی اسپاستیک توارثی با استفاده از روش توالی‌یابی کل اگزوم و توالی‌یابی سنگر، مورد بررسی قرار گرفت که جهش شناسایی شده در اگزون شماره ۴ ژن *RNF170* chr8:42725165 A>G (NM_030954.4): c.304T>C (p.Cys102Arg) به صورت هموزیگوت در فرد مبتلا شناسایی شد، این جهش تشخیص بیماری پاراپلژی اسپاستیک توارثی و نوع آن را تأیید و همراهی خود را با علائم بیماری نشان داد. با یافته‌های این مطالعه افراد ناقل در خانواده فرد مبتلا می‌توانند در بارداری‌های بعدی از اقدامات پیشگیرانه مانند تشخیص ژنتیکی قبل از لانه‌گزینی و قبل از تولد استفاده کنند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش: دانشگاه علوم پزشکی اراک این مطالعه را با کد IR.ARAKMU.REC.1401.039 تأیید کرده است.

حمایت مالی

دانشگاه علوم پزشکی اراک حامی مالی این پایان‌نامه است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در پژوهش و آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از فرد مبتلا و خانواده او که در این مطالعه شرکت کردند کمال تشکر را داریم. همچنین، نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه علوم پزشکی اراک تشکر و قدردانی می‌کنند.

کامل از دست داده بود در حالیکه فردی با طول دوره بیماری ۱۴ سال توانایی راه رفتن به طور مستقل را داشت. اسپاستیسیته اندام تحتانی، ضعف اندام تحتانی، افزایش رفلکس تاندون عمقی اندام فوقانی و تحتانی، پاسخ اکستانسور کف پای از علائم مشترک تمام بیماران بود. اسپاستیسیته و ضعف اندام فوقانی، آتاکسی، آتروفی عضلانی، اختلال بینایی و بی‌اختیاری ادرار و مدفوع در هیچ کدام از بیماران دیده نشد (۱۵). در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای بر روی سه فرد مسلمان عرب متعلق به یک خانواده با ازدواج فامیلی جهش جدیدی در ژن *NT5C2* شناسایی شد که منجر به نوع SPG45 می‌شود. بیماران دارای یک فنوتیپ از HSP پیچیده با ناتوانی ذهنی متوسط، اختلال کمبود توجه بودند و هر فرد دارای جسم پینه‌ای و پاتولوژی ماده سفید قابل توجهی بود. سابقه هیچ گونه عارضه‌ای در بارداری وجود نداشت. افراد مبتلا تا سن ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی به طور طبیعی رشد کردند. به دلیل تأخیر تکاملی، کودکان به فیزیوتراپی ارجاع داده شدند و علاوه بر آن اسپاستیسیته اندام تحتانی، کوتاهی و کشش تاندون آشیل به صورت دو طرفه، تأخیر تکلم مشاهده شد (۱۶).

بر اساس مطالعاتی که تاکنون انجام شده، بیشتر افراد مبتلا به اختلال پاراپلژی اسپاستیک منتج از ازدواج خویشاوندی و درون قومیتی هستند، که بیمار مطالعه حاضر نیز حاصل از ازدواج خویشاوندی است که این امر اهمیت بررسی ازدواج‌های خویشاوندی را مخصوصاً در بیماری‌های با الگوی توارثی مغلوب اتوزومی را نشان می‌دهد. همچنین نوع جهش شناسایی شده در ژن *RNF170* با مطالعه بیمار اهل سیستان و بلوچستان یکسان است که این امر نشان از پدیده ژنتیکی اثر بنیانگذار است. بیشتر علائمی که در مطالعات قبلی گزارش شده است با علائم بیمار ما همخوانی دارد، این نکته ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ را نشان می‌دهد ولی از آنجایی که ارتباط فنوتیپ و ژنوتیپ مشخص و دقیقی برای تشخیص HSP وجود ندارد تشخیص نهایی صرفاً بر اساس بررسی‌های ژنتیکی است. بنابراین، شناسایی موارد جدید و گسترش طیف جهش‌ها در ژن‌های ایجادکننده HSP ممکن است برای یافتن این ارتباط و تشخیص سایر افراد با این جهش‌ها ارزشمند باشد. همچنین براساس مطالعات مذکور بروز علائم بیماری از بدو تولد تا دهه هفتم زندگی گزارش شده است، که بیمار مطالعه ما شروع علائم را در سنین کودکی نشان داد که این امر با سن بروز این بیماری همخوانی دارد.

رویکرد ایده آل برای مدیریت علائم این بیماری درمان علامتی است. یک برنامه تمرینی تحت نظارت نوروفیزیوتراپیست، تمرکز در ابتدا بر روی تمرینات کششی، و بعد تمرینات تعادلی، می‌تواند مفید واقع شود (۷). طبق مطالعات، داروی دالفامپریدین در درمان بیماران مبتلا به HSP می‌تواند مفید باشد و هیچ عارضه جانبی جدی در استفاده از این دارو مشاهده نشده است که این امر ایمنی نسبی این دارو را در بیماران HSP نشان می‌دهد (۱۷). در مطالعه دیگری مطرح شد که داروهای ضد اسپاستیسیته خوراکی خط اول درمان هستند، اما اثربخشی نسبتاً محدود آنها معمولاً درمان باکلوفن اینتراتکال را ضروری می‌کند. باکلوفن اینتراتکال می‌تواند باعث بهبود اسپاستیسیته و عملکرد راه رفتن شود (۱۸). این درمان‌ها ممکن است به تسکین برخی از علائم جسمی یا روحی کمک کند، اما در حال حاضر هیچ درمان دارویی مناسبی برای فنوتیپ‌های HSP در دسترس نیست. از این رو، یافتن

مقاله از پایان نامه خانم نگار رضاخانی با عنوان پایان نامه "بررسی جهشی یک فرد مبتلا به اختلال پاراپلژی اسپاستیک توارثی با استفاده از روش توالی یابی در یک خانواده" مستخرج شده است.

References

1. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;**126**(3):307-328. doi: 10.1007/s00401-013-1115-8 pmid: 23897027
2. Roşulescu E, Stănoiu C, Buteică E, Stănoiu B, Burada F, Zăvăleanu M. Hereditary spastic paraplegia. *Rom J Morphol Embryol.* 2009;**50**(2):299-303.
3. Murala S, Nagarajan E, Bollu PC. Hereditary spastic paraplegia. *Neurol Sci.* 2021;**42**(3):883-894. doi: 10.1007/s10072-020-04981-7 pmid: 33439395
4. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology.* 2014;**42**(3):174-183. doi: 10.1159/000358801 pmid: 24603320
5. Harding AE. Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1981;**44**(10):871-883. doi: 10.1136/jnnp.44.10.871 pmid: 7310405
6. Hedera P. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, et al., editors. GeneReviews(*). Seattle (WA): University of Washington, Seattle 1993.
7. Shribman S, Reid E, Crosby AH, Houlden H, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: from diagnosis to emerging therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2019;**18**(12):1136-1146. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30235-2 pmid: 31377012
8. Panwala TF, Garcia-Santibanez R, Vizcarra JA, Garcia AG, Verma S. Childhood-Onset Hereditary Spastic Paraplegia (HSP): A Case Series and Review of Literature. *Pediatr Neurol.* 2022;**130**:7-13. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2022.02.007 pmid: 35303589
9. Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol.* 2014;**261**:518-539. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.06.011 pmid: 24954637
10. Lu JP, Wang Y, Sliter DA, Pearce MM, Wojcikiewicz RJ. RNF170 protein, an endoplasmic reticulum membrane ubiquitin ligase, mediates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 2011;**286**(27):24426-24433. doi: 10.1074/jbc.M111.251983 pmid: 21610068
11. Wagner M, Osborn DPS, Gehweiler I, Nagel M, Ulmer U, Bakhtiari S, et al. Bi-allelic variants in RNF170 are associated with hereditary spastic paraplegia. *Nat Commun.* 2019;**10**(1):4790. doi: 10.1038/s41467-019-12620-9 pmid: 31636353
12. de Sainte Agathe JM, Mercier S, Mahe JY, Pereon Y, Buratti J, Tissier L, et al. RNF170-Related Hereditary Spastic Paraplegia: Confirmation by a Novel Mutation. *Mov Disord.* 2021;**36**(3):771-774. doi: 10.1002/mds.28371 pmid: 33165979
13. Rahimi Bidgoli MM, Javanparast L, Rohani M, Najmabadi H, Zamani B, Alavi A. CAPN1 and hereditary spastic paraplegia: a novel variant in an Iranian family and overview of the genotype-phenotype correlation. *Int J Neurosci.* 2021;**131**(10):962-974. doi: 10.1080/00207454.2020.1763344 pmid: 32352326
14. Pashaei M, Davarzani A, Hajati R, Zamani B, Nafissi S, Larti F, et al. Description of clinical features and genetic analysis of one ultra-rare (SPG64) and two common forms (SPG5A and SPG15) of hereditary spastic paraplegia families. *J Neurogenet.* 2021;**35**(2):84-94. doi: 10.1080/01677063.2021.1895146 pmid: 33771085
15. Farazi Fard MA, Rebelo AP, Buglo E, Nemati H, Dastsooz H, Gehweiler I, et al. Truncating Mutations in UBAP1 Cause Hereditary Spastic Paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2019;**104**(4):767-773. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.03.001 pmid: 30929741
16. Straussberg R, Onoufriadis A, Konen O, Zouabi Y, Cohen L, Lee JYW, et al. Novel homozygous missense mutation in NTS2C2 underlying hereditary spastic paraplegia SPG45. *Am J Med Genet A.* 2017;**173**(11):3109-3113. doi: 10.1002/ajmg.a.38414 pmid: 28884889
17. Bereau M, Anheim M, Chanson JB, Tio G, Echaniz-Laguna A, Depienne C, et al. Dalfampridine in hereditary spastic paraplegia: a prospective, open study. *J Neurol.* 2015;**262**(5):1285-1288. doi: 10.1007/s00415-015-7707-6 pmid: 25808501
18. Margetis K, Korfiatis S, Boutos N, Gatzonis S, Themistocleous M, Siatouni A, et al. Intrathecal baclofen therapy for the symptomatic treatment of hereditary spastic paraplegia. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014;**123**:142-145. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.05.024 pmid: 24973568
19. Meyyazhagan A, Kuchi Bhotla H, Pappuswamy M, Orlacchio A. The Puzzle of Hereditary Spastic Paraplegia: From Epidemiology to Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022;**23**(14). doi: 10.3390/ijms23147665 pmid: 35887006