DOI: 10.48305/jims.v43.i834.1276

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهل و سوم/شماره‌ی ۸۳٤/هفته‌ی دوم آذر ۱٤۰٤

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۵ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۶ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۴/۰۹/۱۵

شناسایی جهش‌های ژن SETX با استفاده از توالی‌یابی کل اگزوم در بیماری اسکلروز جانبی آمیوتروفیک در یک خانواده‌ی خوزستانی

سعید شیخ زاده[۱]، زهره ولی‌زاده[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اسکلروز جانبی آمیوتروفیک ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) یک اختلال عصبی هتروژن است که منجر به فلج سریع، پیشرونده و نارسایی تنفسی می‌شود. حدود ۱۰ درصد موارد ALS خانوادگی هستند و ناشی از یک نقص ژنی خاص است که در شجره‌نامه‌ها به عنوان یک صفت مندلی در نظر گرفته شده است. اسکلروز جانبی آمیوتروفیک نوع ۴ (ALS4) یک شکل خانوادگی ALSبا شروع در نوجوانی است که به‌دلیل جهش در ژن سناتاکسین (SETX) ایجاد می‌شود. فناوری‌های پیشرفته ژنومی روند تشخیص اختلالات ژنتیکی را تسریع می کنند و اثربخشی حمایت ژنتیکی را برای بیماران و خانواده‌های‌شان افزایش می‌دهند.

روش‌ها: در این مطالعه، تشخیص جهش در ژن SETX، با استفاده از توالی‌یابی کل اگزوم (WES) انجام شد. سپس از روش PCR (Polymerase Chain Reaction)به منظور تأیید واریانت استفاده شد و در ادامه، توالی‌یابی با استفاده از روش سنگر و آنالیز نتایج سکانس با نرم‌افزار Chromas Pro انجام شد.

یافته‌ها: نتایج تعیین توالی اگزوم نشان داد که یک جهش هموزیگوت در ژن NM_015046:exon19:c.C6461T:p.T2154M. در توالی‌های اگزوم فرزند مبتلا به ALS4 در خانواده وجود دارد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه مزیت استفاده از WES را برای تشخیص ژنتیکی در بیماری ALS برجسته کرده است. با تحقیق در مورد علت ژنتیکی بیماری ALS4، می‌توانیم به درک بهتری از بیولوژی مولکولی این بیماری دست یابیم.

واژگان کلیدی: اسکلروز جانبی آمیوتروفیک؛ توالی اگزوم؛ سناتاکسین

ارجاع: شیخ زاده سعید، ولی‌زاده زهره. **شناسایی جهش‌های ژن SETX با استفاده از توالی‌یابی کل اگزوم در بیماری اسکلروز جانبی آمیوتروفیک در یک خانواده‌ی خوزستانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۳۴): ۱۲۷۶- ۱۲۸۳.

مقدمه

اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (Amyotrophic lateral sclerosis) ALS، یک اختلال عصبی هتروژن است که به طور کلاسیک با از دست دادن نورون‌های حرکتی فوقانی و تحتانی مشخص می‌شود و منجر به فلج سریع، پیشرونده و نارسایی تنفسی در عرض سه تا پنج سال پس از شروع علائم می‌گردد (۱). تظاهرات بالینی ALS از نظر سن و محل شروع، درجه نسبی درگیری نورون‌های حرکتی فوقانی و تحتانی، سرعت پیشرفت علائم متغیر است. ALS می‌تواند پراکنده (sALS) باشد، که ۸۵ تا ۹۰ درصد موارد را شامل می‌شود و معمولاً بدون سابقه‌ی ژنتیکی روشن خانوادگی است. این نوع به احتمال زیاد با یک علت پلی‌ژنتیک و چندعاملی مرتبط است (۲). در حالی که اکثر موارد ALS به نظر می‌رسد پراکنده و بدون علت ژنتیکی یا الگوی وراثتی واضح باشند، حداقل ۱۰ درصد از موارد ALS خانوادگی هستند و ناشی از یک نقص ژنی خاص‌اند که در شجره‌نامه‌ها به عنوان یک صفت مندلی جدا شده است (۳).

فرایندهای بیولوژیکی متعددی از جمله پردازش RNA، سمیت تحریک‌پذیر، استرس اکسیداتیو، ناهنجاری‌های اسکلت سلولی، اختلال در حمل و نقل آکسونی، التهاب عصبی، اختلال عملکرد میتوکندری و تجمع پروتئین با ALS مرتبط شده‌اند (۲). بیشتر خطرات ژنتیکی در ALS چندژنی است که نشان‌دهنده‌ی ساختار

۱- دانشجو زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: زهره ولی‌زاده: استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

Email: 1754296572@iau.ir

ژنتیکی پیچیده‌ای است (۴). بیش از ۲۰ جهش ژنی برای ایجاد ALSشناسایی شده است که شایع‌ترین آنها در ژن‌های C9orf72 ، SOD1، TARDBP و FUS قرار دارند. با این حال، در ۸۰ درصد موارد، هیچ جهش بیماری‌زایی شناسایی نشده است. علاوه بر این، دانش در مورد پاتوفیزیولوژی مشترک مورد انتظار در زمینه تخریب عصبی مخچه بسیار محدود است (۵). این ناهمگونی بالینی و ژنتیکی، شناسایی مکانیسم‌های بیماری‌زا در طیف ALS را چالش‌برانگیز کرده است (۵).

اسکلروز جانبی آمیوتروفیک نوع ۴ (ALS4) یک شکل خانوادگی از ALS با شروع در نوجوانی است که با وراثت غالب و نوروپاتی حرکتی آهسته و پیشرونده مشخص می‌شود این نوع بسیار نادر است و تنها خانواده‌های بسیار کمی از آن در سراسر جهان شناسایی شده‌اند. در سال ۲۰۰۴،ALS4 به عنوان نتیجه‌ی جهش در ژن سناتاکسین شناسایی شد. سناتاکسین (SETX) یک پروتئین بزرگ با ۲۶۷۷ اسید آمینه است که حاوی یک دامنه برهمکنش پروتئینی و یک دامنه هلیکاز کربوکسی پایانه‌ای است که آن را به‌عنوان یک عضو از ابر خانواده I، RNA-DNA هلیکاز تعریف می‌کند (۳). جهش‌های غالب در SETX منجر به شکل نوجوانی از اسکلروز جانبی آمیوتروفیک به نام ALS4 می‌شوند، در حالی که جهش‌های مغلوب مسئول آتاکسی به نام آتاکسی با آپراکسی چشمی نوع ۲ هستند (۶، ۷).

در حال حاضر، با توجه به تفاوت‌های قابل توجه در اپیدمیولوژی ژنتیکی بین کشورهای مختلف، انجام غربالگری ژنتیکی جامع برای روشن کردن ساختار ژنتیکی منحصر به فرد ALS بسیار مهم است. علاوه بر این، تحقیقات بیشتری برای بررسی طیف جهش های SETXمورد نیاز است. بنابراین، در مطالعه‌ی ما پروباند ALS انتخاب شد و توالی یابی کامل اگزوم (WES) را برای تجزیه و تحلیل جهش‌های بیماری‌زای بالقوه برروی پروباند (فرزند پسر ۱۰ ساله) مبتلا به ALS و تمام اعضای خانواده هسته صورت گرفت و در این مطالعه به‌طور خاص بر جهش‌های SETX تمرکز کردیم.

روش‌ها

این مطالعه‌ی مورد-شاهدی توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول با کد IR.IAU.D.REC.1401.029 تأیید شد. پس از تعیین معیارهای ورود و خروج از مطالعه، اعضای گروه‌های هدف و کنترل با اخذ رضایت‌نامه‌ی آگاهانه و رعایت پروتکل‌های اخلاقی جهت انجام آزمایش ها، وارد مطالعه شدند. این مطالعه در «آزمایشگاه ژنتیکی و تشخیص طبی نورژن اهواز» در سال ۱۴۰۱ و در بازه‌ی زمانی ۶ ماهه انجام گرفته است. جامعه‌ی مورد مطالعه در این پژوهش شامل دو گروه هدف و کنترل بود. جمعیت هدف متشکل از ۲۴ عضو بود که شامل یک خانواده هسته‌ای ۶ نفره با یک فرزند مبتلا و ۱۸ نفر از بستگان آن‌ها می شد. بستگان این خانواده شامل ۱۷ فرد سالم و ۱ فرد مبتلا به اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) بودند که نسبت درجه ۳ با خانواده هسته داشتند و علائم و بیماری آن‌ها نیز توسط پزشک متخصص تأیید شده بود. جمعیت کنترل شامل ۶ نفر از افراد کاملاً سالم و بدون نسبت خانوادگی با جمعیت هدف بود. همه موارد ابتلا به ALS در آزمایشگاه نورژن اهواز تشخیص داده شد.

استخراج ژنوم

پس از جمع‌آوری نمونه های خون محیطی، نمونه ها به منظور استخراج ژنوم به بخش مولکولی آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNAبا استفاده از نمونه‌های خون و به روش Salting-out انجام شد. سپس، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. در نهایت، نمونه های DNA در دمای ۲۰ – درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (۸).

توالی کل اگزوم (WES)

به منظور توالی یابی کل اگزوم بر روی DNA ژنومی به دست آمده از اعضای خانواده هسته، فرایندهای کتابخانه‌ای و آماده‌سازی اولیه Library (Preparation) به‌طور دقیق و بر اساس دستورالعمل های کیت Agilent SureSelectXT انجام شد. فرایند های Exome Enrichment با استفاده از کیت Agilent SureSelectXT Human All Exon V6 (Agilent, Santa Clara, CA) انجام گردید. در مجموع ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی خالص به‌طور همزمان قطعه‌قطعه و به‌صورت آنزیمی برچسب‌گذاری شد.

پس از هیبریده شدن قطعات، پرو سه جذب هیبریدا سیونی درفاز آبی (Aqueous-phase hybridization) با استفاده از پروب های بیوتینیله (Biotinylated baits) به منظور دستیابی اختصاصی‌تر و بیشتر به توالی‌های اگزونیک انجام شد. در ادامه، با استفاده از ذرات مغناطیسی استرپتاویدینی موجود در کیت که دارای خاصیت جذب‌کنندگی برای بیوتین هستند (Biotin-streptavidin-based magnetic bead)، قطعات هیبریدی اگزونیک که بیوتینیله شده بودند، جذب شدند و مناطقی که با این ذرات پوشیده نشده بودند، شسته شدند.

به منظور تقویت و دستیابی به مجموعه‌ای غنی از قطعات کتابخانه‌ای اگزونیک، PCR انجام شد. قطعات کتابخانه‌ای اگزونیک به‌دست آمده در مرحله‌ی قبل، از طریق پلتفرم Illumina HiSeq 4000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) با متوسط عمق خوانش ×۱۰۰ توالی یابی و سکانس گذاری شدند. کنترل کیفیت خوانش توالی‌ها با استفاده از آنالیزورهای بیوانفورماتیکی موجود در نرم‌افزار آنلاین FastQC مورد سنجش قرار گرفت.

طبقه‌بندی و فیلترینگ واریانت‌ها

شناسایی اولیه، نام‌گذاری، طبقه‌بندی و تعیین فرمت واریانت‌ها بر اساس پایگاه مرجع GRCh37/gh19 و با استفاده از نرم‌افزار ANNOVARانجام شد. تفسیر واریانت‌ها و آنالیز ژنوم با کمک نرم‌افزار اینترنتی GATK 3.v4 انجام گردید. فیلترینگ هتروزیگوتی و هوموزیگوتی واریانت‌ها بر اساس شاخص GMAF تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

تأیید نتایج WES در نمونه‌های پروباند و اعضای خانواده هسته با استفاده از توالی‌یابی مستقیم PCR انجام شد. برای بررسی هر مورد، پرایمرهای خاصی طراحی شد (جدول ۱ و ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی غلظتی معادل ۱۰۰ نانوگرم از DNA، ۲۰۰ میکرومولار از dNTP و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز تحت شرایط بافر استاندارد و با Mg^{2+} بهینه‌سازی شده تا ۱/۵ میلی‌مولار صورت گرفت (۹).

محصولات PCR برای ارزیابی صحت واکنش و مشاهده باندها بر روی ژل ۲ درصد آگارز الکتروفورز شدند.

توالی‌یابی سنگر

در این مطالعه، ۵۰ میکرولیتر از محصولات PCR مربوط به نمونه‌های پروباند و اعضای خانواده هسته برای سکانس‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌یابی سنگر در بخش مولکولی آزمایشگاه ژنتیک و تشخیص طبی نورژن با استفاده از دستگاه ABI PRISM 3130x1 DNA Analyzerانجام شد. جهت آنالیز نتایج سکانس نیز از نرم‌افزار Version 2.6.6 Chromas Pro استفاده گردید.

به منظور تحلیل جامعه‌ی مورد مطالعه، داده‌های مرتبط با تعداد افراد جمعیت هدف و جمعیت کنترل در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۶ (version 26, IBM Corporation, Armonk, NY) وارد شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معیاری برای داشتن ارزش آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج تعیین توالی کل اگزوم ژن SETX نشان داد که یک واریانت هموزیگوت در توالی‌های اگزوم فرزند مبتلا به ALS شناسایی شد. بررسی توالی واریانت‌ها با استفاده از نرم‌افزارها و مقایسه‌ی آن‌ها با سکانس های اگزومی مرجع نشان داد که واریانت مربوط به ژن SETXاست.

واریانت SETX: NM_015046:exon19:c.C6461T:p.T2154M.

به منظور ردیابی الگوی توارث خانوادگی واریانت و شناسایی حضور واریانت هتروزیگوت آن (غربالگری خانواده و شناسایی افراد ناقل) در تمامی اعضای خانواده، از طریق PCR و ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

برای تأیید نتایج سکانس اگزوم و شناسایی واریانت هموزیگوت، همچنین شناسایی افراد ناقل واریانت در خانواده، از روش توالی‌یابی سنگر استفاده شد. نتایج توالی‌یابی سنگر نشان‌دهنده‌ی جهش تک‌نوکلئوتیدی در ژن SETX بود و با نتایج توالی‌یابی اگزوم تطابق داشت. نتایج نشان داد که خانواده هسته از نظر واریانت SETX متشکل از والدین (پدر و مادر ناقل) و یک فرزند هموزیگوت (مبتلا) است که حامل هیچ‌یک از آلل‌های معیوب پدری یا مادری نیست (شکل ۲).

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده جهت فرایندهای توالی یابی

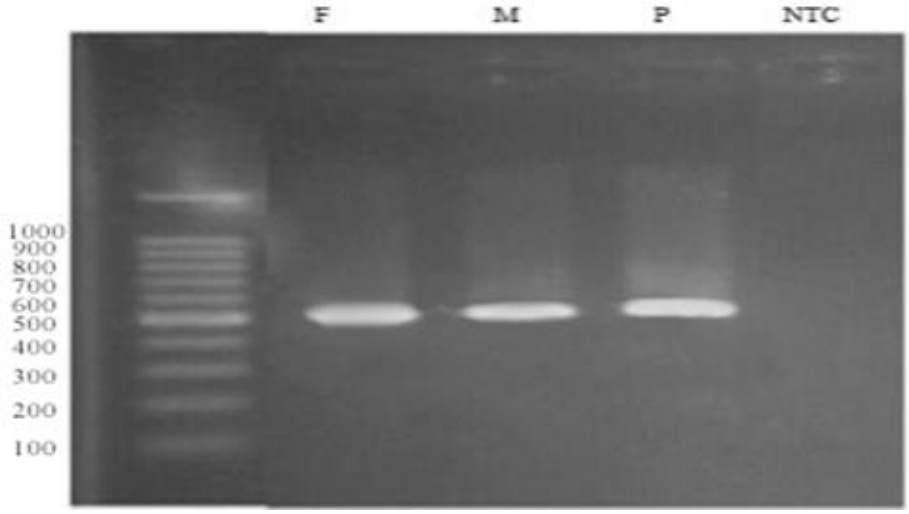
توالی الیگونوکلیوتیدی	نوع پرایمر	نام علمی به همراه ژن
TGA GGG TTT CCC CTA ACT TTT AC	Forward	SETX-EX19-F-497
CCC CCA ATA CTG GAA AAT CCA C	Reverse	SETX-EX19-R-497

جدول ۲. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR

مرحله	فرایند	تعداد سیکل	دما (°C)	دقیقه / ثانیه
اول	دناتوراسیون اولیه	۱	۹۴	۵ دقیقه
	دناتوراسیون ثانویه		۹۴	۱ دقیقه
دوم	آنیل کردن	۳۴	۶۱	۴۵ ثانیه
	کشیدگی		۷۲	۱ دقیقه
سوم	کشیدگی نهایی	۱	۷۲	۳ دقیقه
چهارم	هولدینگ	۱	۴	برای همیشه

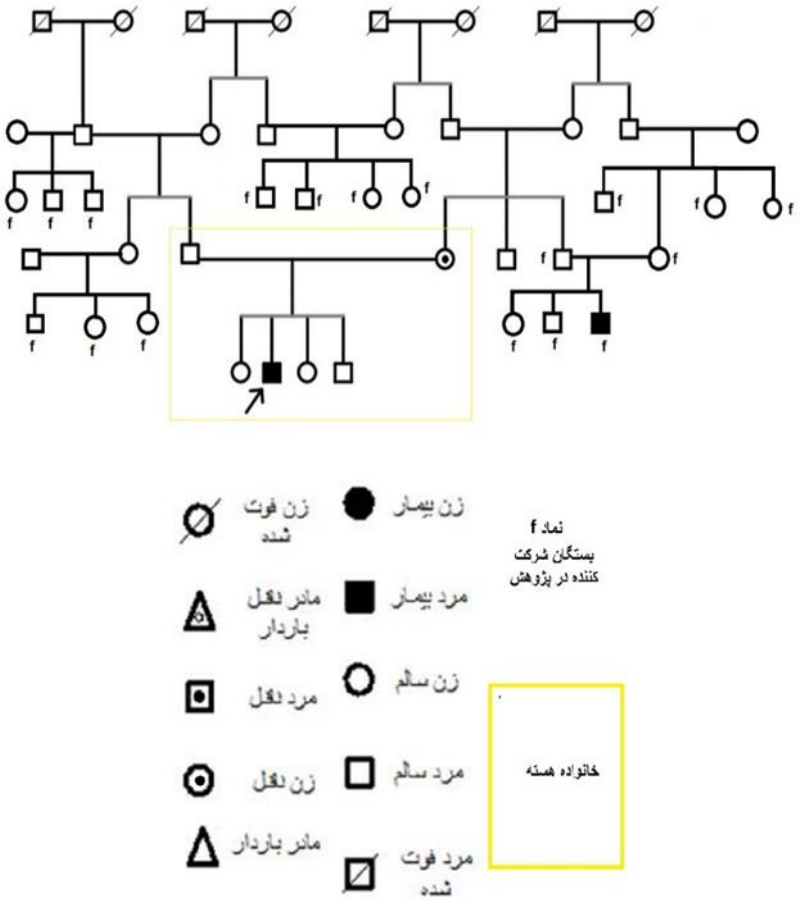
پس از تأیید واریانت NM_015046 مربوط به ژن SETX در پروباند (فرزند پسر ۱۰ ساله) و آنالیز نتایج حاصل از توالی‌یابی سایر اعضای خانواده و بستگان، کلیه افراد از نظر ویژگی های فنوتیپی مرتبط با ناهنجاری، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، ژنوتیپ جمعیت وابستگان به منظور شناسایی ناقلین، مبتلایان و افراد سالم در خانواده تعیین گردید. پس از تعیین الگوی بروز خانوادگی و مشخص شدن واریانت های هتروزیگوت و هموزیگوت در خانواده هسته و جمعیت وابستگان، نتایج آنالیز به صورت شجره‌نامه رسم گردید. نتایج بررسی‌ها نشان داد که پدر و مادر خانواده هسته از نظر این واریانت هتروزیگوت (ناقل) و ژنوتیپ سه فرزند آن‌ها هموزیگوت (سالم) می‌باشد. فرزند چهارم این خانواده، برخلاف سایر اعضای خانواده، حامل جهش ژن SETXو از نظر ژنوتیپی هموزیگوت معین گردید (شکل ۳).

ارزیابی نتایج در جمعیت ۱۸ نفری وابستگان نشان داد که یک فرد از این جمعیت دارای هر دو آلل جهش یافته (هموزیگوت و مبتلا) و سایر افراد این مجموعه فاقد هیچ یک از آلل های جهش‌یافته (سالم) می‌باشند.



شکل ۱: نتایج ژل الکتروفورز به دنبال PCR با Ladder 100 bp و مشاهده باند 500 bp در نمونه‌ها

شکل ۲: نتایج توالی‌یابی سنگر والدین با ژنوتیپ هتروزیگوت و یکی از فرزندان مبتلا با ژنوتیپ هوموزیگوت



شکل ۳: الگوی توارث واریانت و شجره‌نامه ژنتیکی طراحی شده در جمعیت خانواده‌ی این مطالعه

بحث

در این مطالعه، غربالگری ژنتیکی بر روی ۲۴ فرد شامل یک خانواده هسته ۶ نفره با یک فرزند مبتلا و ۱۸ نفر از بستگان آن‌ها انجام شد. فرزند پروپاند و اعضای خانواده هسته، تحت توالی‌یابی ژنوم کامل (WGS) قرار گرفت. در این فرایند، یک جهش در ژن SETX در فرزند مبتلا شناسایی شد. شناسایی این ژن جهش‌یافته می‌تواند به فهم بهتر مکانیسم‌های مولکولی این بیماری کمک کند.

اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) به‌عنوان یک اختلال نورودژنراتیو چند سیستمی، عمدتاً بر سیستم حرکتی تأثیر می‌گذارد، اما تظاهرات برون‌حرکتی نیز به‌طور فزاینده‌ای شناسایی می‌شود. از دست دادن نورون‌های حرکتی فوقانی و تحتانی در قشر حرکتی، هسته‌های ساقه‌ی مغز و شاخ قدامی نخاع منجر به ضعف و تحلیل عضلانی پیشرونده می‌گردد. در سطح ژنتیکی، جهش‌هایی در بیش از ۲۰ ژن که با ALS مرتبط هستند، شناسایی شده است (۱۰).

مطالعات اخیر مبتنی بر جمعیت، شیوع ALS را بین ۴/۱ تا ۸/۴ در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر گزارش کرده‌اند. جنسیت مرد از مدت‌ها قبل به عنوان یک عامل خطر برای ALS در نظر گرفته شده است. علائم اولیه ALS غیراختصاصی هستند و ممکن است شبیه علائم سایر بیماری‌های عصبی- عضلانی باشند. با توجه به فقدان بیومارکرهای تشخیصی معتبر، تشخیص ALS تنها به صورت بالینی انجام می‌شود (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که تفاوت در بروز ALS بین جمعیت‌های آسیایی و غیرآسیایی وجود دارد. یکی از گمانه‌زنی‌ها برای بروز کمتر ALS در آسیا، شیوع کمتر ژن‌های شناخته‌شده‌ALS در جمعیت‌های آسیایی است (۱۱).

Sajjadi و همکاران نشان دادند که میانگین بروز سالیانه ALS در اصفهان ۰/۴۲ در ۱۰۰،۰۰۰ نفر بوده که بالاترین میزان بروز را در بین افراد ۷۰-۷۴ ساله دارد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که میزان بروز ALSدر جمعیت ایران پایین است (۱۲).

همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که ALS خانوادگی سن شروع کمتری نسبت به ALS پراکنده دارد و افراد مبتلا به ALS خانوادگی حدود ۵ سال جوان‌تر از افراد مبتلا به ALS پراکنده هستند، که این ممکن است نتیجه کاهش سن شروع واریته‌های ژنتیکی باشد (۱۳).

اسکلروز جانبی آمیوتروفیک جوانی (ALS4) یک شکل نادر اتوزومال غالب از اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) است که با ضعف و آتروفی عضلانی مشخص می‌شود. افراد مبتلا به ALS4 معمولاً علائم را در سن کمتر از ۲۵ سال آغاز می‌کنند، با سرعت پیشرفت آهسته و طول عمر طبیعی (۱۴).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که اغلب جهش‌های موجود در ژن SETX می‌توانند منجر به بروز ALS4 شوند، اما مبنای مکانیکی برای سمیت نورون‌های حرکتی هنوز ناشناخته است (۱۵).

در مطالعه‌ای که توسط Grunseich و همکاران انجام شد، به ارزیابی ویژگی‌های بالینی و مولکولی در بیماران مبتلا به اسکلروز جانبی آمیوتروفیک ۴ (ALS4) پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که جهش در ژن SETX با بیماری ALS4 مرتبط است (۱۶).

همچنین Chen و همکاران برای شناسایی اساس مولکولی ALS4، ۱۹ ژن را مورد بررسی قرار داد ند و جهش هایی در ژن SETX شناسایی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در ALS4، جهش در SETX ممکن است از طریق اختلال در فعالیت هلیکاز یا سایر مراحل پردازش RNA، باعث انحطاط عصبی شود (۱۴).

نتیجه‌گیری

عوامل ژنتیکی نقش مهمی در ALS ایفا می‌کنند و مطالعات ژنتیکی درک ما از مکانیسم‌های بیماری را بهبود می‌بخشند. برای به‌دست آوردن بینش بیشتر در مورد چشم‌انداز ژنتیکی ALS، ما توالی‌یابی کل اگزوم را برای غربالگری ژن‌ها در یک پروباند ALS خانوادگی انجام دادیم. در این گروه، یک جهش و یک واریانت هتروزیگوت در توالی‌های اگزوم یکی از پروباندها شناسایی کردیم. بررسی توالی واریانت‌ها با نرم‌افزارها و مقایسه‌ی آن‌ها با سکانس‌های اگزومی مرجع نشان داد که واریانت مربوط به ژن SETX (NM_015046:exon19:c.C6461T:p.T2154M) می‌باشد. در نتیجه، مطالعه‌ی ما به شواهد رو به رشد مرتبط با SETX و ALS کمک می‌کند و درک ما از چشم‌انداز ژنتیکی پیچیده این بیماری را افزایش می‌دهد.

این مطالعه مزیت ا ستفاده از WES را برای ت شخیص ژنتیکی در بیماری ALS برجسته کرده است. با تحقیق در مورد علت ژنتیکی بیماری ALS4، می‌توان به درک بهتری از بیولوژی مولکولی این بیماری دست یافت.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی با کد ۱۶۲۶۳۰۸۶۶ می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول به تصویب رسیده و با حمایت مالی آقای سعید شیخ زاده به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Ziff OJ, Neeves J, Mitchell J, Tyzack G, Martinez-Ruiz C, Luisier R, et al. Integrated transcriptome landscape of ALS identifies genome instability linked to TDP-43 pathology. Nat Commun 2023; 14(1): 2176.
2. Morello G, La Cognata V, Guarnaccia M, La Bella V, Conforti FL, Cavallaro S. A Diagnostic Gene-Expression Signature in Fibroblasts of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Cells 2023; 12(14): 1884.
3. Bennett CL, Dastidar S, Arnold FJ, McKinstry SU, Stockford C, Freibaum BD, et al. Senataxin helicase, the causal gene defect in ALS4, is a significant modifier of C9orf72 ALS G4C2 and arginine-containing dipeptide repeat toxicity. Acta Neuropathol Commun 2023; 11(1): 164.
4. Wang JC, Ramaswami G, Geschwind DH. Gene co-expression network analysis in human spinal cord highlights mechanisms underlying amyotrophic lateral sclerosis susceptibility. Sci Rep 2021; 11(1): 5748.
5. Edgar S, Ellis M, Abdul-Aziz NA, Goh K-J, Shahrizaila N, Kennerson ML, et al. Mutation analysis of SOD1, C9orf72, TARDBP and FUS genes in ethnically-diverse Malaysian patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neurobiol Aging 2021; 108: 200-6.
6. Richard P, Feng S, Tsai Y-L, Li W, Rinchetti P, Muhith U, et al. SETX (senataxin), the helicase mutated in AOA2 and ALS4, functions in autophagy regulation. Autophagy 2021; 17(8): 1889-906.
7. Nanetti L, Cavalieri S, Pensato V, Erbetta A, Pareyson D, Panzeri M, et al. SETX mutations are a frequent genetic cause of juvenile and adult onset cerebellar ataxia with neuropathy and elevated serum alpha-fetoprotein. Orphanet J Rare Dis 2013; 8: 123.
8. Gaaib JN, Nassief AF, Al-Assi AH. Simple salting-out method for genomic DNA extraction from whole blood. Tikrit J Pure Sci 2011; 16(2): 1813-662.
9. BioLabs NE. Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase. Accessed 2015; Available from: https://www.neb.com/en/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase?srsltid=AfmBOopyzjdJqqVye1p7cODLnpfXF9rACGsx0HpaYjmDM9a50Uuna8fa.
10. Masrori P, van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. Eur J Neurol 2020; 27(10): 1918-29.
11. Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. Curr Opin Neurol 2019; 32(5): 771-6.

12. Sajjadi M, Etemadifar M, Nemati A, Ghazavi H, Basiri K, Khoundabi B, et al. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Isfahan, Iran. Eur J Neurol 2010; 17(7): 984-9.
13. Mehta PR, Jones AR, Opie-Martin S, Shatunov A, Iacoangeli A, Al Khleifat A, et al. Younger age of onset in familial amyotrophic lateral sclerosis is a result of pathogenic gene variants, rather than ascertainment bias. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2019; 90(3): 268-71.
14. Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). Am J Hum Genet 2004; 74(6): 1128-35.
15. Bennett CL, Dastidar SG, Ling S-C, Malik B, Ashe T, Wadhwa M, et al. Senataxin mutations elicit motor neuron degeneration phenotypes and yield TDP-43 mislocalization in ALS4 mice and human patients. Acta Neuropathol 2018; 136(3): 425-43.
16. Grunseich C, Patankar A, Amaya J, Watts JA, Li D, Ramirez P, et al. Clinical and molecular aspects of senataxin mutations in amyotrophic lateral sclerosis 4. Ann Neurol 2020; 87(4): 547-55.

DOI: *10.48305/jims.v43.i834.1276*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 43, No. 834, 2nd Week, December 2025**

Received: 15.11.2024 Accepted: 07.11.2025 Published: 06.12.2025

Identification of SETX Gene Mutations Using Whole Exome Sequencing in Amyotrophic Lateral Sclerosis in a Khuzestan Family

Saeed Shaikhzadeh[1], Zohreh Valizadeh[2]

Original Article

Abstract

Background: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a complex neurological disorder characterized by rapid and progressive paralysis, eventually leading to respiratory failure. Approximately 10% of ALS cases are familial, stemming from specific genetic mutations that follow Mendelian inheritance patterns. Amyotrophic lateral sclerosis type 4 (ALS4) is a juvenile-onset form of familial ALS caused by mutations in the senataxin (SETX) gene. Advanced genomic technologies expedite the diagnosis of genetic disorders and enhance the quality of genetic support for patients and their families.

Methods: In this research, the detection of mutations in the SETX gene was performed through whole-exome sequencing (WES). The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was subsequently employed to validate the variant, followed by Sanger sequencing, and the resulting sequences were analyzed using Chromas Pro software.

Findings: The whole-exome sequencing results revealed a homozygous mutation in the gene (NM_015046:exon19:c.C6461T:p.T2154M) in the exome sequences of the affected offspring in the family.

Conclusion: This study highlights the advantage of utilizing WES for the genetic diagnosis of ALS. By investigating the genetic cause of ALS4, we can achieve a better understanding of the molecular biology of this disease..

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis; Exome sequencing; Senataxin

Citation: Shaikhzadeh S, Valizadeh Z. **Identification of SETX Gene Mutations Using Whole Exome Sequencing in Amyotrophic Lateral Sclerosis in a Khuzestan Family.** J Isfahan Med Sch 2025;43(834): 1276-83.

1- Student, Department of Biology, Dez.C., Islamic Azad University, Dezful, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Biology, Dez.C., Islamic Azad University, Dezful, Iran.
Corresponding Author: Zohreh Valizadeh, Assistant Professor, Department of Biology, Dez.C., Islamic Azad University, Dezful, Iran; Email: 1754296572@iau.ir