

بررسی عامل ارثی صرع غیر سندرمی اتوزومی مغلوب در یک خانواده‌ی ایرانی به روش توالی‌یابی کامل اگزوم

راضیه خالصی^۱، مسعود گرشناسی^۲، محمود تولایی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: علت بیشتر موارد صرع ناشناخته است و عوامل ارثی می‌تواند در بروز آن نقش داشته باشد. امروزه، تحقیقات وسیعی در زمینه‌ی علل ایجاد صرع در حال انجام است. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی ژن(های) عامل صرع غیر سندرمی با الگوی توارث اتوزومی مغلوب در یک خانواده‌ی ایرانی به روش توالی‌یابی کامل اگزوم بود.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر، از نوع تجربی بود. DNA ژنومی از خون سه فرد مبتلا و یکی از افراد سالم خانواده، استخراج و توالی‌یابی اگزوم با پلت‌فورم Illumina HiSeq 2000 انجام شد. ابتدا، دسته‌بندی واریانت‌ها از نظر نوع، جایگاه جهش و فراوانی آللی و سپس، اولویت‌بندی آن‌ها با دو رویکرد انجام شد. توالی‌یابی سنگر برای تأیید واریانت (c.854C>T), (g.5780794G>A), (NM_207111.3(RNF216): ژن RNF216 انجام شد.

یافته‌ها: از ۱۳۰۸۵۵ واریانت، حدود ۸۵ درصد از نوع تغییرات تک نوکلئوتیدی و ۱۵ درصد از نوع indels بودند. یک سوم تغییرات در نواحی بین ژنی و اینترونی، یک سوم در 3',5'UTR و یک سوم در نواحی اگزومی و جایگاه پیرایش بودند. از نظر فراوانی آللی در پایگاه داده‌ی ExAC و ۱۰۰۰ ژنوم، به ترتیب ۳/۸ درصد و ۳/۴ درصد واریانت‌ها، فراوانی آللی کمتر از ۰/۰۱ داشتند. با اعمال هر دو رویکرد، واریانت (c.854C>T), (g.5780794G>A), (NM_207111.3(RNF216): ژن RNF216 به عنوان کاندیدا شناسایی شد، اما ارتباط این واریانت در همه‌ی اعضای خانواده تأیید نگردید.

نتیجه‌گیری: توالی‌یابی اگزوم به ابزاری جهت مطالعه‌ی عوامل ژنتیکی بیماری‌های مندلی تبدیل شد، اما با محدودیت‌هایی نیز همراه بود. در صورت قرار گرفتن واریانت در نواحی غیر کد شونده‌ی ژنوم، هتروژنی کلینیکی، تشخیص نادرست بیماری، فنوکپی، محدودیت‌های تکنیکی و آنالیز واریانتی، می‌تواند موانعی برای شناسایی واریانت عامل بیماری محسوب شوند که باعث عدم موفقیت در شناسایی ژن عامل بیماری در این خانواده شده‌اند.

واژگان کلیدی: تشنج صرعی، توالی‌یابی DNA، شناسایی ژن کاندید

ارجاع: خالصی راضیه، گرشناسی مسعود، تولایی محمود. بررسی عامل ارثی صرع غیر سندرمی اتوزومی مغلوب در یک خانواده‌ی ایرانی به روش

توالی‌یابی کامل اگزوم. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۴۰۷): ۱۳۶۸-۱۳۶۲

مقدمه

صرع، به عنوان شایع‌ترین و شناخته شده‌ترین اختلال دستگاه عصبی پس از سکته‌ی مغزی و قلبی، بیشترین فراوانی را در جمعیت‌های انسانی دارد. بیش از ۵۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به این بیماری مبتلا هستند (۱-۲). بررسی علت بروز صرع در طول قرن‌ها، همواره یکی از مشکلات مهم پزشکان بوده است (۳-۴). این بیماری در بیشتر موارد، ایدیوپاتیکی و فاقد علت مشخصی است و عوامل ارثی ممکن است در بروز آن نقش داشته باشند (۵-۸). در ۴۰ درصد مبتلایان به

صرع، عامل ژنتیک دخیل است.

صرع‌های ژنتیکی را می‌توان بر اساس مکانیسم‌های توارثی طبقه‌بندی کرد. سه گروه اصلی برای آن‌ها شناسایی شده است؛ اختلالات مندلی که یک لوکوس اصلی می‌تواند عامل ایجاد بیماری باشد، بیماری‌های پیچیده یا غیر مندلی که می‌تواند حاصل میان‌کنش چندین لوکوس ژنتیکی با عوامل محیطی باشد یا در نتیجه‌ی الگوی توارث مادری DNA میتوکندریایی ایجاد شوند و اختلالات کروموزومی که مبتلایان، حامل یک ناهنجاری سیتوزنتیکی هستند (۹).

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله الاعظم (عج)، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: مسعود گرشناسی

رویکرد اول:

- ۱- واریانت‌های مترادف حذف شدند و تمرکز روی واریانت‌های نامترادف نواحی آگزونی قرار گرفت.
- ۲- بر اساس میزان فراوانی آللی موجود در پایگاه‌های داده فیلتر و واریانت‌هایی با فراوانی آللی بالاتر از ۰/۱ حذف شدند.
- ۳- واریانت‌ها با اعمال الگوی توارث اتوزومی مغلوب اولویت‌بندی شدند (۱۴).

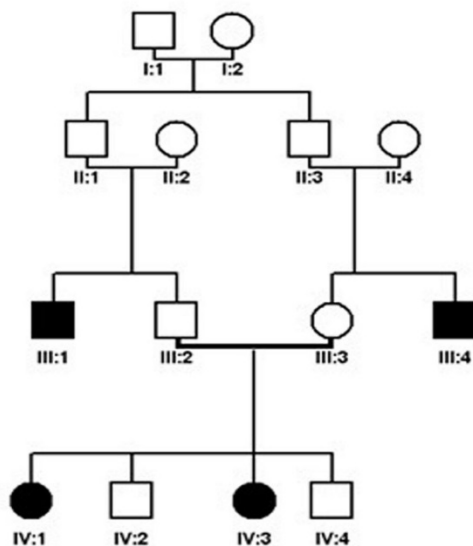
رویکرد دوم:

- ۱- ابتدا واریانت‌ها در دو گروه واریانت‌های تک نوکلئوتیدی و گروه Indels تقسیم‌بندی شدند. در این مرحله، برای هر گروه از واریانت‌ها، واریانت‌های مترادف و واریانت‌های نواحی ایترونی و بین ژنی حذف شدند.
- ۲- الگوی توارث اتوزومی مغلوب روی واریانت‌ها اعمال شد.
- ۳- واریانت‌ها بر اساس فراوانی آللی در پایگاه‌های داده اولویت‌بندی شدند.

سپس، تأیید جهش RNF216 و تفکیک آن در خانواده به روش توالی‌یابی سنگر (Sanger sequencing) انجام شد.

یافته‌ها

افراد مبتلا توسط پزشک متخصص مغز و اعصاب معاینه و بیماری صرع در افراد تشخیص داده شد. شجره‌نامه‌ی خانوادگی در شکل ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱. شجره‌نامه‌ی خانوادگی. توالی‌یابی آگزوم برای افراد III:3، III:4، III:1، IV:1، IV:3 انجام شد. نمونه‌های III:1 و III:2 در دسترس نبودند.

به دلیل شیوع به نسبت بالای این بیماری در دنیا، امروزه تحقیقات وسیعی در زمینه‌ی علل ایجاد صرع و راه‌کارهای جلوگیری از بروز آن در حال انجام است (۱۱-۱۰). پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌ی تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (NGS یا Next-generation sequencing)، به ویژه توالی‌یابی کامل آگزوم (Whole exome sequencing یا WES)، کشف اساس بیماری‌های ژنتیکی انسانی را متحول کرده است (۱۳-۱۲). بنابراین، با توجه به شیوع بالای این بیماری در ایران و مطالعات اندکی که در زمینه‌ی شناسایی عوامل ژنتیکی دخیل در ایجاد این بیماری صورت گرفته است، این مطالعه با هدف بررسی عامل ارثی صرع غیر سندرمی با الگوی توارث اتوزومی مغلوب (حاصل ازدواج خویشاوندی) و به طور احتمالی مونوزئیک در یک خانواده‌ی ایرانی به روش توالی‌یابی کامل آگزوم انجام شد.

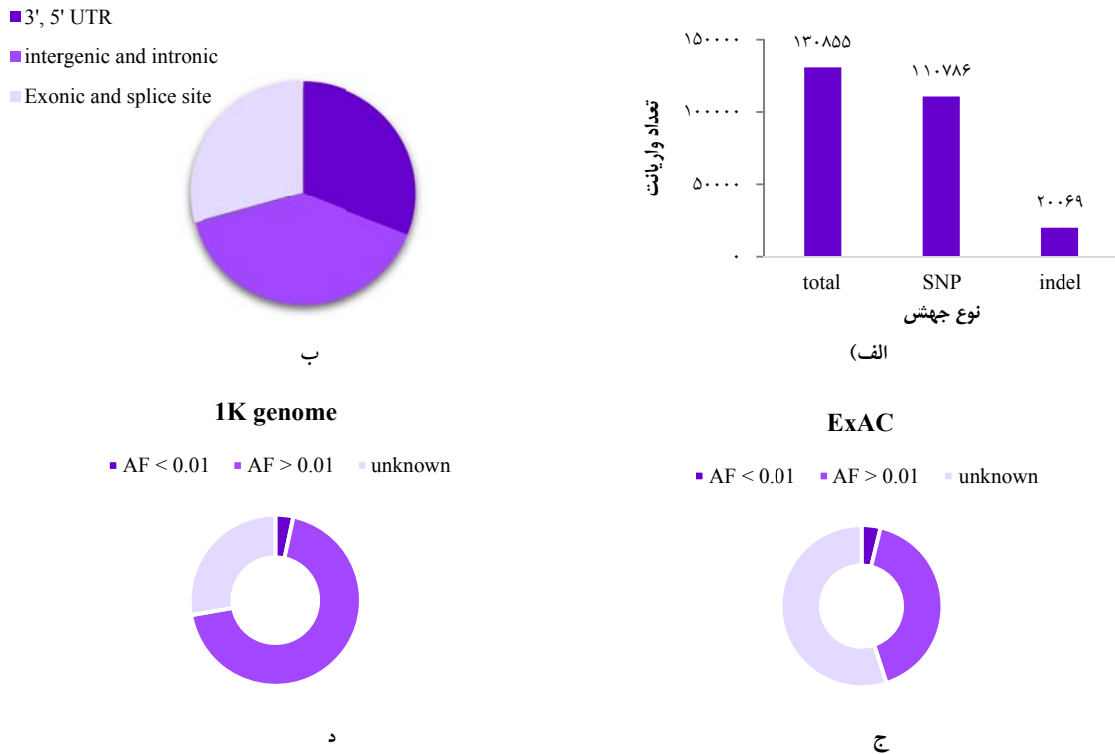
روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی بود. نمونه‌ی خون ۳ فرد مبتلا و یک فرد سالم در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری گردید. این مطالعه، توسط کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تأیید و فرم رضایت‌نامه توسط اعضای خانواده تکمیل شد. استخراج DNA به روش ترسیب نمکی انجام و غلظت و کیفیت DNA از طریق نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

سپس، توالی‌یابی کامل آگزوم توسط شرکت BGI Tech (هنگ‌کنگ) با استفاده از پلت‌فرم Illumina HiSeq 2000 (ایلوئینا، آمریکا) انجام شد. DNA ژنومی به صورت تصادفی به قطعات ۲۰۰-۱۵۰ جفت بازی خرد و آداپتورهایی به دو انتهای قطعات متصل شد. پس از تکثیر قطعات، به دام اندازی آگزوم روی ۵۰ نانوگرم DNA با استفاده از کیت Nextera Rapid Capture Exome (ایلوئینا، آمریکا) صورت گرفت و قطعات DNA از هر دو انتها توالی‌یابی شدند. کیفیت به دام اندازی آگزوم و میزان پوشش، با نرم‌افزار GATK ارزیابی شد.

در مرحله‌ی بعد، خوانش با استفاده از نرم‌افزار BWA نسخه‌ی 0.5.9، با ژنوم مرجع UCSC hg19 هم‌ردیف شدند. از نرم‌افزارهای SAMtools و Annovar برای شناسایی و تفسیر واریانت‌ها استفاده شد.

داده‌های خام از نظر موقعیت ژنومی، نوع جهش و فراوانی آللی در پایگاه‌های داده‌ی ExAC و ۱۰۰۰ ژنوم بررسی شدند. سپس، جهت دستیابی به واریانت‌ها (های) کاندیدای عامل بیماری، اولویت‌بندی با دو رویکرد زیر انجام شد:



شکل ۲. دسته‌بندی واریانت‌ها بر اساس (الف) نوع جهش، (ب) جایگاه جهش، (ج) فراوانی آللی در پایگاه داده‌ی ExAC و (د) ۱۰۰۰ ژنوم
 SNP: Single nucleotide polymorphism

Indels، تمرکز روی واریانت‌های نواحی اگزونی و پیرایش قرار گرفت و تعداد واریانت‌ها به ترتیب به ۱۷۱۱۵ و ۷۶۶ مورد کاهش یافت. سپس، با اعمال الگوی توارث، تعداد واریانت‌های بد معنی به ۹۷ مورد رسید و همگی موارد Indels حذف شدند. در ادامه، با حذف واریانت‌هایی با فراوانی آللی بیشتر از ۰/۰۱، تنها واریانت NM_207111.3(RNF216): (g.5780794G>A), (c.854C>T) ژن RNF216 باقی ماند (شکل ۳).

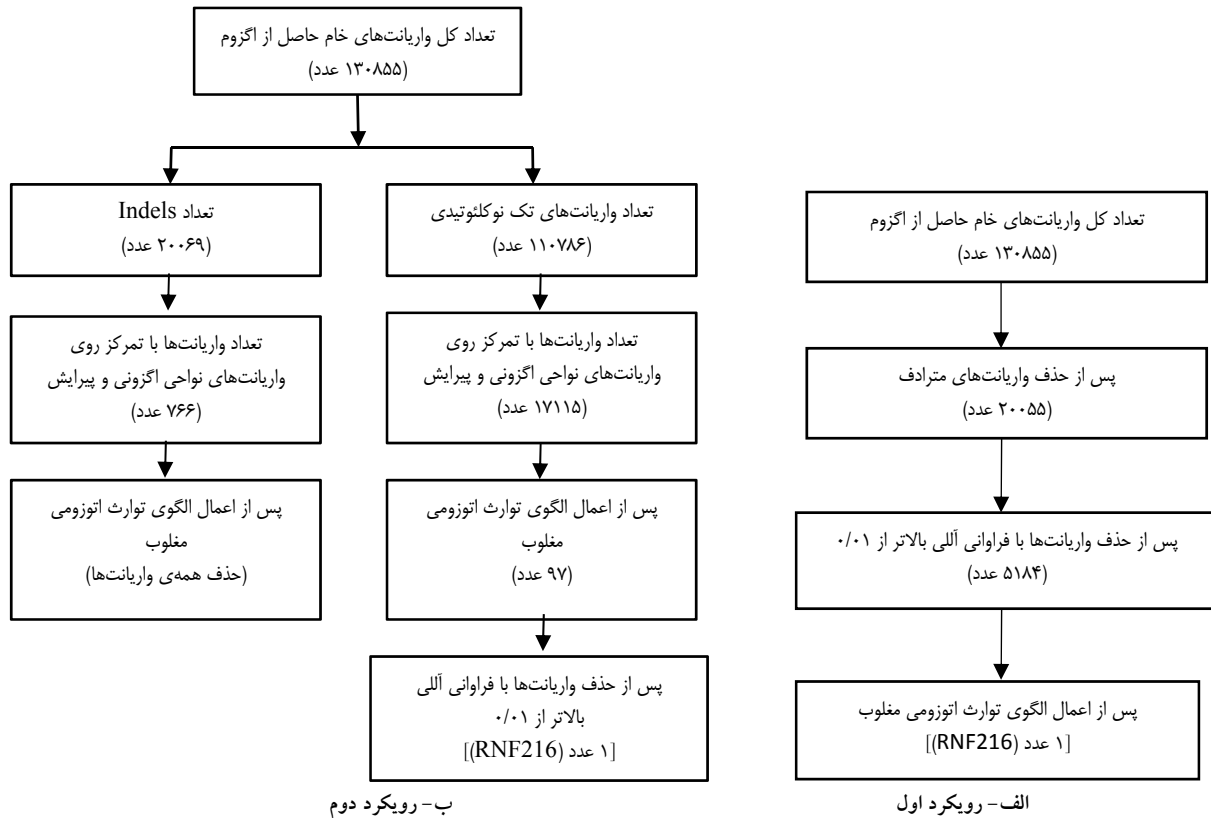
ژن RNF216 (NM_207111.3)، روی کروموزوم شماره‌ی ۷ قرار دارد. در اگزون ۴ این ژن در موقعیت ژنومی ۵۷۸۰۷۹۴، تغییر G>A رخ داده است (NM_207111.3(RNF216): (g.5780794G>A), (c.854C>T)). نتایج حاصل از توالی‌یابی یکی از افراد مبتلا که ژنوتیپ آن در توالی‌یابی اگزوم مشخص نشده بود، تفکیک این واریانت در خانواده را تأیید نکرد (شکل ۴).

بحث

صرع، جدی‌ترین اختلال عصبی در دنیا و فراوانی آن ۱-۲ درصد است (۱۵) و یکی از مشکلات مهم سلامت در کشورهای در حال توسعه و به ویژه در ایران می‌باشد (۱۶). عوامل مختلفی مانند ژنتیک و محیط، می‌توانند در بروز صرع دخیل باشند (۱۵).

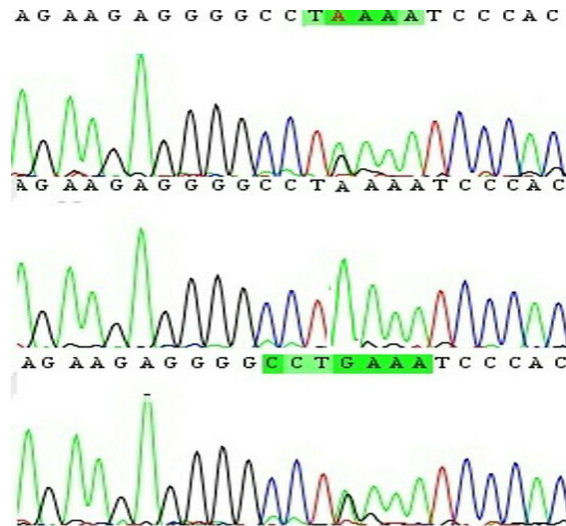
تعداد کل واریانت‌ها، ۱۳۰۸۵۵ مورد بود. از این میان، ۱۱۰۷۸۶ مورد (۸۴/۶۶ درصد) از نوع تغییرات تک نوکلئوتیدی (SNVs) یا Single nucleotide variants) و ۲۰۰۶۹ مورد (۱۵/۳۴ درصد) از نوع Indels بودند (شکل ۲-الف). از نظر جایگاه جهش، ۳۹/۷ درصد در نواحی بین ژنی و اینترونی، ۳۱ درصد در نواحی 3',5'UTR و مابقی (۲۹/۳ درصد) در نواحی اگزونی و جایگاه پیرایش ایجاد شده بودند (شکل ۲-ب). در پایگاه داده‌ی ExAC و ۱۰۰۰ ژنوم، به ترتیب ۳/۸ درصد و ۳/۴ درصد واریانت‌ها، فراوانی آللی کمتر از ۰/۰۱ و ۴۱/۲ درصد و ۶۸/۸ درصد، فراوانی آللی بیشتر از ۰/۰۱ داشتند و در ۵۵/۰ درصد و ۲۷/۸ درصد، فراوانی آللی نامشخص بود (شکل ۲-ج و د).

در رویکرد اول، با حذف واریانت‌های مترادف و تمرکز روی واریانت‌های نامترادف نواحی اگزونی، تعداد واریانت‌ها از ۱۳۰۸۵۵ به ۲۰۰۵۵ کاهش یافت. سپس، با حذف واریانت‌هایی با فراوانی آللی بیشتر از ۰/۰۱، تعداد واریانت‌ها به ۵۱۸۴ رسید. در آخر، با اعمال الگوی توارث اتوزومی مغلوب، تنها واریانت NM_207111.3(RNF216): (g.5780794G>A), (c.854C>T) ژن RNF216 باقی ماند (شکل ۳). در رویکرد دوم، برای هر دو گروه واریانت‌های بد معنی و



شکل ۳. رویکردهای فیلتر کردن واریانتهای و تعداد آنها پس از هر مرحله فیلتراسیون

امروزه، به دنبال موفقیت در انجام پروژه‌های ژنوم انسان، می‌توان ژن عامل صرع ژنتیکی را شناسایی کرد. این کار، نیازمند مطالعه‌ی خانواده‌هایی با چند عضو مبتلا می‌باشد که بیماری آن‌ها به خوبی تشخیص داده شده باشد. در این نوع صرع، توارث مندلی کلاسیک دیده می‌شود (اتوزومال غالب، مغلوب یا وابسته به X)، و در گروه صرع‌های ایدوپاتیک قرار می‌گیرند (۱۷). صرع‌های ایدوپاتیک مندلی، نادرند و همگی آن‌ها مسؤول کمتر از ۱ درصد تمام موارد صرع می‌باشند (۹). نقش عوامل ژنتیکی در ایجاد این نوع صرع با بروز خانوادگی و هم‌خوانی کلینیکی در مطالعات دوقلوها آشکار شده است (۱۷). شناسایی ژن‌های مسؤول، بینش باارزشی درباره‌ی مکانیسم مولکولی عامل صرع ایجاد می‌کند و مطالعه‌ی آن‌ها برای پیشبرد دانش ما از اساس پاتوژنز صرع ایدوپاتیک ضروری است (۹). تا کنون بیشتر موارد صرع‌های ایدوپاتیک مندلی مورد مطالعه، صفات اتوزومی غالب با نفوذ کاهش یافته و تظاهرات کلینیکی متغیر را نشان داده‌اند. این مطالعات، منجر به شناسایی ژن‌های عامل صرع می‌شوند و اغلب آن‌ها زیر واحدهای کانال یونی عصبی هستند (۱۸). موارد اتوزومی مغلوب، در ابتدا برای زیر مجموعه‌ای از خانواده‌های مبتلا به صرع رولاندیک خانوادگی پیشنهاد و با روش پیوستگی



شکل ۴. نتایج حاصل از تأیید واریانتهای (c.854C>T), (g.5780794G>A) ژن RNF216 به ترتیب از بالا به پایین در مادر (III:3)، یکی از افراد مبتلا با ژنوتیپ مشخص (IV:1) و فرد مبتلا با ژنوتیپ نامشخص (IV:3). مادر، ژنوتیپ AG و فرد IV:1، ژنوتیپ AA دارند، پس از توالی‌یابی سنگر (Sanger sequencing) فرد IV:3، ژنوتیپ AG را نشان داد که با الگوی توارث اتوزومی مغلوب مطابقت نداشت.

ناحیه‌ی ۱۵q برای آن‌ها شناسایی شد. به علاوه، در یک خانواده‌ی بزرگ برای مبتلایان به صرع‌های میوکلونیک و تونیک-کلونیک عمومی با توارث اتوزومی مغلوب، ناحیه‌ی ۱۶p۱۳ نقشه‌یابی شد. همچنین، در مطالعه‌ای در کشور ترکیه، یک لوکوس برای صرع‌های ایدیوپاتیک در ناحیه‌ی ۳۳-۹p۳۱ شناسایی شد (۱۸).

می‌توان گفت که مطالعه در زمینه‌ی صرع‌های ایدیوپاتیک اتوزومی غالب نسبت به شکل مغلوب، بسیار بیشتر است و از آن جایی که تنها چند لوکوس برای برخی از انواع صرع‌های اتوزومی مغلوب گزارش شده و هیچ ژنی به عنوان عامل این نوع صرع‌ها شناسایی نشده است، پاتوژنز این اختلالات هنوز ناشناخته باقی مانده است. بنابراین، مطالعه بر روی اشکال اتوزومی مغلوب صرع‌های ایدیوپاتیک خانوادگی بسیار حایز اهمیت است. از این رو، در مطالعه‌ی حاضر، به جستجوی عامل ارثی صرع اتوزومی مغلوب در موارد خانوادگی پرداخته شد.

امروزه، NGS توانایی شناسایی همه‌ی انواع تغییرات ژنتیکی در سرتاسر ژنوم انسان در حد جفت باز در یک آزمایش منفرد را دارد. این روش بسیار سریع‌تر و کارآمدتر از روش‌های سنتی است (۱۹) و توانایی بی‌نظیری در شناسایی واریانت‌های نادر دارد (۲۰). توالی‌یابی اگزوم، یکی از کاربردهای NGS است و به سرعت به ابزاری جهت مطالعه‌ی عوامل ژنتیکی بیماری‌های مندلی تبدیل شده است (۲۱). بسیاری از واریانت‌های عامل بیماری‌های مندلی شامل سندرم Miller (۲۲) و سندروم Kabuki به این روش شناسایی شده‌اند (۲۳).

تمایز واریانت‌های عامل بیماری از میان تعداد زیاد واریانت‌های ژنومی، چالش بزرگی است که از طریق یک سری مراحل فیلتر کردن ممکن می‌شود (۲۰). بر اساس نوع و جایگاه جهش، می‌توان واریانت‌ها را اولویت‌بندی کرد. جهش‌های تغییر چارچوب، ایجادکننده‌ی کدون پایان و جایگاه پیرایش، نسبت به سایر واریانت‌ها اثر بیشتری دارند (۲۴). در این مطالعه، بر روی واریانت‌های نامترادف نواحی اگزونی تمرکز شد. یکی دیگر از مراحل فیلتر کردن، در نظر گرفتن فراوانی آللی واریانت‌ها در پایگاه‌های داده‌ی عمومی است (۲۳). در این مطالعه، واریانت‌هایی با فراوانی آللی بالاتر از ۰/۱ در پایگاه‌های داده‌ی ExAC و ۱۰۰۰ ژنوم، حذف شدند. الگوی توارث بیماری نیز در فیلتر کردن واریانت‌ها بسیار حایز اهمیت است؛ با این فرض، پدر و مادر برای واریانت عامل بیماری، ناقل اجباری و افراد مبتلا، هموزیگوت موتان هستند (۲۴).

یکی از محدودیت‌های توالی‌یابی اگزوم در شناسایی واریانت‌های عامل بیماری، این است که با این روش، تنها مطالعه‌ی ۱ درصد ژنوم انسان (نواحی کد شونده به پروتئین) امکان پذیر می‌باشد (۲۵، ۲۶). به علاوه، نتایج حاصل از طرح ENCODE نشان می‌دهد که نواحی غیر کد شونده‌ی زیادی وجود دارند که عملکرد بیولوژیکی مهمی دارند و می‌توانند نقش مهمی در ایجاد بیماری‌ها داشته باشند (۲۵). بنابراین، در صورتی که واریانت عامل بیماری در نواحی غیر کد شونده‌ی ژنوم باشد، امکان شناسایی آن از طریق توالی‌یابی اگزوم وجود ندارد. همچنین، ممکن است یک واریانت ژنومی ساختاری یا یک Indel بزرگ، طی توالی‌یابی اگزوم شناسایی نشود.

به علاوه، محدودیت‌های تکنیکی و آنالیز واریانتی مانند فقدان پوشش برخی واریانت‌ها، تفسیر نادرست آن‌ها و مباحث بیوانفورماتیک مربوط به خوانش واریانتی در توالی‌یابی اگزوم، می‌تواند مانعی برای شناسایی واریانت عامل بیماری محسوب شود. از طرفی، وجود هتروژنی کلینیکی، تشخیص نادرست بیماری و فنوکپی، ممکن است روی راهبرد فیلتر کردن واریانت‌ها اثر بگذارد و باعث از دست رفتن برخی واریانت‌ها شود (۲۶). همه‌ی این عوامل، می‌توانند دلیل عدم موفقیت در شناسایی واریانت عامل بیماری در این خانواده باشد. در نهایت، با وجود این محدودیت‌ها، عواملی مانند مقرون به صرفه بودن این روش نسبت به توالی‌یابی کامل ژنوم و تمرکز آن روی حجم مهم‌تری از ژنوم (اگزوم) (۲۷)، پیشنهاد کردند که توالی‌یابی کامل اگزوم، رویکرد آزمایشگاهی مناسب‌تری جهت مطالعه‌ی واریانت‌های عامل بیماری در این خانواده است.

به علاوه، حدود ۴۰ درصد انواع صرع، اساس ژنتیکی کمپلکس (پیچیده) دارند (۲۸). صرع‌های کمپلکس، اغلب به صورت اسپورادیک ظاهر می‌یابند و از الگوی توارث مندلی پیروی نمی‌کنند (۲۹). در شجره‌نامه‌ی مورد بررسی، چند مورد فرد مبتلا وجود داشتند و الگوی توارث اتوزومی مغلوب برای این خانواده محتمل‌تر بود. با این حال، نمی‌توان نوع توارث پیچیده را برای این شجره‌نامه به طور کامل رد کرد. از این رو، دلیل دیگر برای نرسیدن به جواب در این خانواده، می‌تواند همین قضیه باشد که عامل بیماری به طور الزامی از الگوی مغلوب (که پیش‌فرض این مطالعه بوده است)، تبعیت نمی‌کند و می‌تواند به شیوه‌ی غالب و یا غالب با نفوذ متغیر و یا حتی شیوه‌ی توارث پیچیده به ارث رسیده باشد. بنابراین، یکی از اقدامات بعدی، می‌تواند بررسی

در داده‌های خام اگزوم، ژنوتیپ برخی از افراد برای برخی واریانت‌ها تعیین نشده بود. یکی از این واریانت‌ها، واریانت NM_207111.3(RNF216): (g.5780794G>A), (c.854C>T) RNF216 است که ژنوتیپ آن برای یکی از افراد مبتلا مشخص نبود. از آن جایی که فراوانی آللی این واریانت در پایگاه داده‌ی ExAC و ۱۰۰۰ ژنوم، پایین‌تر از ۰/۱ و به ترتیب ۰/۰۱۸۹۴ و

ژنتیک پزشکی با شماره‌ی ۵۲د/۱۶۸۵ است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسید. بدین‌وسیله، نگارندگان مراتب قدردانی خود را از افراد خانواده به دلیل همکاری آن‌ها در اجرای این مطالعه ابراز می‌دارند.

واریانت‌هایی باشد که از الگوی غیر از الگوی مغلوب پیروی می‌کنند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی مصوب دکتری تخصصی

References

- Seyfried TN, Glaser GH. A review of mouse mutants as genetic models of epilepsy. *Epilepsia* 1985; 26(2): 143-50.
- Neligan A, Sander JW. The incidence and prevalence of epilepsy. In: Sander JW, Rugg-Gunn FJ, Smalls JE, editors. *Epilepsy 2009: from benchside to bedside. A practical guide to epilepsy*. Lecture notes from the Twelfth Epilepsy Teaching Weekend, 18-20 September 2009, St. Anne's College, Oxford. West Hartford, CT: International League Against Epilepsy (UK Chapter) and National Society for Epilepsy. p. 15-21.
- Niedermeyer E. *The Epilepsies. diagnosis and management*. Baltimore-Munich, Germany: Urban and Schwarzenberg, 1990.
- Goetz C. *Textbook of Clinical neurology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2007.
- Rowland LP, Pedley TA. *Merritt's neurology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2009.
- Ropper A, Samuels M, Klein J. *Adams and Victor's principles of neurology*. 10th ed. New York, NY: Mc Graw-Hill; 2014.
- Manford M. Assessment and investigation of possible epileptic seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70(Suppl 2): I13-I18.
- Parton M, Cockerell OC. Epilepsy-the etiology and pathogenesis. *The Pharmaceutical Journal* 2009, [Online]. Available from: URL: <http://www.pharmaceutical-journal.com/learning/learning-article/epilepsy-the-aetiology-and-pathogenesis/10976755.article>.
- Johnson MR. *The genetic contribution to epilepsy: the known and missing heritability*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2011.
- Alasvand ZM, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Palizvan MR. Anticonvulsant effect of bilateral injection of N6-cyclohexyladenosine into the CA1 region of the hippocampus in amygdala-kindled rats. *Epilepsy Res* 2001; 47(1-2): 141-9.
- Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnanian S. Epileptogenic insult causes a shift in the form of long-term potentiation expression. *Neuroscience* 2005; 134(2): 415-23.
- Koboldt DC, Larson DE, Sullivan LS, Bowne SJ, Steinberg KM, Churchill JD, et al. Exome-based mapping and variant prioritization for inherited Mendelian disorders. *Am J Hum Genet* 2014; 94(3): 373-84.
- Majewski J, Schwartzenuber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 2011; 48(9): 580-9.
- Stitzel NO, Kiezun A, Sunyaev S. Computational and statistical approaches to analyzing variants identified by exome sequencing. *Genome Biol* 2011; 12(9): 227.
- Lewis KD, Bear BJ. *Manual of School Health: A handbook for school nurses, educators, and health professional*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2008.
- Rodenburg R, Meijer AM, Dekovic M, Aldenkamp AP. Family factors and psychopathology in children with epilepsy: a literature review. *Epilepsy Behav* 2005; 6(4): 488-503.
- Arruda WO. Etiology of epilepsy a prospective study of 210 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 1991; 49(3): 251-4.
- Leppert MF, Singh NA. Nonsyndromic seizure disorders: epilepsy and the use of the internet to advance research. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003; 4: 437-57.
- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol* 2011; 12(9): 228.
- Heinzen EL, Depondt C, Cavalleri GL, Ruzzo EK, Walley NM, Need AC, et al. Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy. *Am J Hum Genet* 2012; 91(2): 293-302.
- Teer JK, Mullikin JC. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum Mol Genet* 2010; 19(R2): R145-R151.
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet* 2010; 42(1): 30-5.
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 2010; 42(9): 790-3.
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12(11): 745-55.
- ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; 489(7414): 57-74.
- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(5): 490-7.
- Lee S, Abecasis GR, Boehnke M, Lin X. Rare-variant association analysis: study designs and statistical tests. *Am J Hum Genet* 2014; 95(1): 5-23.
- Dibbens LM, Heron SE, Mulley JC. A polygenic heterogeneity model for common epilepsies with complex genetics. *Genes Brain Behav* 2007; 6(7): 593-7.
- Mulley JC, Scheffer IE, Harkin LA, Berkovic SF, Dibbens LM. Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum Mol Genet* 2005; 14(Spec No. 2): R243-R249.

Investigation of Inherited Causes of Autosomal Recessive Non-syndromic Epilepsy in an Iranian Family Using Whole Exome Sequencing Method

Raziyeh Khalesi¹, Masoud Garshasbi², Mahmood Tavallaei³

Original Article

Abstract

Background: The cause of epilepsy in most of cases is unknown but inherited causes can play a role in its incidence. Recently, many researches have been conducted in the field of epilepsy. The aim of this study was to identify gene(s) responsible in an Iranian family with autosomal recessive non-syndromic epilepsy using whole exome sequencing (WES) method.

Methods: In this experimental study, genomic DNA was extracted from whole blood belonging to three affected persons and a healthy individual and whole exome sequencing was performed using Illumina Hiseq2000 platform. At first, variants classification were carried out based on mutation types, position of the mutation and their allele frequencies and then, prioritization was performed via two approaches. Sanger sequencing was carried out for RNF216 confirming the variant [NM_207111.3 (RNF216): (g.5780794G > A), (c.854C > T)].

Findings: From 130855 variants, 85% were single nucleotide variants and 15% were indels. One third of them located in intergenic and intronic regions, one third located in 3' and 5' UTRs and one third located in exonic and splice site regions. 3.8% and 3.4% of variants had allele frequencies below 0.01 in ExAC and 1000 genome project databases, respectively. By using the two prioritization approaches, a variant in RNF216 gene [NM_207111.3 (RNF216): (g.5780794G > A), (c.854C > T)] was selected as a prior candidate. However, this variant did not co-segregate with the disease in all of the members of this family.

Conclusion: Exome sequencing has been considered as a tool for studying genetic causes of Mendelian disorders; but it has some limitations. Mutation in the non-coding regions of the genome, clinical heterogeneity of disease, wrong clinical diagnosis, phenocopy, and technical and analytical limitations can be considered as a reason that we could not find gene(s) responsible for the disease in this family.

Keywords: Epileptic seizures, DNA sequencing, Candidate gene identification

Citation: Khalesi R, Garshasbi M, Tavallaei M. Investigation of Inherited Causes of Autosomal Recessive Non-syndromic Epilepsy in an Iranian Family Using Whole Exome Sequencing Method. J Isfahan Med Sch 2017; 34(407): 1362-8.

1- PhD Student, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Masoud Garshasbi, Email: masoudgarshasbi@modares.ac.ir