

Case Report Article

Identification of a Novel Mutation in *CNNM4* Gene in an Iranian Family with Jalili Syndrome

Mohammad Ghofrani¹ , Mohammad Keramatipour^{2*} 

¹Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

²Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**
Mohammad Keramatipour; Department of Medical Genetics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
keramatipour@sina.tums.ac.ir

Received: 28 Nov, 2018
Accepted: 27 Aug, 2019

Abstract

Background and Objectives: Jalili syndrome is a rare autosomal recessive genetic disorder, which so far, only 33 families with this disorder have been reported worldwide. Patients with this disease simultaneously develop cone-rod retinal dystrophy (CRD) and amelogenesis imperfecta (AI). In this study, a mutation causing Jalili syndrome, was investigated in an Iranian family.

Case Report: The cases were two brothers with Jalili syndrome in an Iranian family, in whom, the sequence of causative gene (*CNNM4*), was identified. Their parents were not consanguineous and lived in a small village in East Azerbaijan, northwest of Iran. Both patients had enamel destruction since childhood. Ocular symptoms began in their adolescence and eventually led to photophobia, color blindness, and central vision loss amelogenesis imperfecta from childhood. Ocular symptoms began in adolescence with photophobia, achromatopsia, and central vision loss, which their vision gradually deteriorated in dim light and at night. Currently, the patients have very limited vision. In electroretinography of the proband, cone-rod degeneration, was diagnosed. A novel variant (c.1220G>T) was found by Sanger sequencing of *CNNM4* in proband, which is segregated in the pedigree. This change may be due to replacement of arginine 407 with leucine (Arg407Leu). Analysis by pathogenesis predictive softwares, confirmed the involvement of this change in the development of Jalili syndrome in this family (this variation was not reported in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) and 1000 genome databases. Arginine 407 has been conserved in several species.

Keywords: Jalili syndrome; *CNNM4* protein; Human; Cone-rod dystrophy; Amelogenesis Imperfecta; Iran.

DOI: 10.29252/qums.13.8.73

شناسایی یک جهش جدید در ژن *CNNM4* در خانواده ایرانی مبتلا به سندرم جلیلی

محمد غفرانی^۱، محمد کرامتی پور^{۲*}

چکیده

زمینه و هدف: سندرم جلیلی، یک بیماری ژنتیکی بسیار نادر با وراثت اتوزومی مغلوب است که تاکنون تنها در ۳۳ خانواده در جهان گزارش شده است. مبتلایان به این بیماری همزمان دچار اختلالات شبکه‌ای از نوع دیستروفی مخروطی - استوانه‌ای و اختلالات دندانی از نوع آمیلوژنز ایمپرکتا می‌شوند. در این مطالعه به شناسایی یک مورد جهش ایجادکننده سندرم جلیلی در خانواده ایرانی پرداخته شده است.

معرفی مورد: مورد دو برادر مبتلا به سندرم جلیلی در یک خانواده ایرانی هستند که به وسیله روش سانگر، توالی ژن دخیل در ایجاد این بیماری (*CNNM4*) در آن‌ها مشخص گردید. والدین غیرهم‌خون بوده و در یک روستای کوچک آذربایجان شرقی واقع در شمال غربی ایران سکونت داشتند. هر دو فرد مبتلای خانواده از دوره کودکی دچار تخریب مینای دندان شده بودند. علائم چشمی در آنان از دوره نوجوانی آغاز و در نهایت منجر به فوتوفوبیا، کوررنگی و از دست دادن دید مرکزی شده بود که با گذر زمان دید مبتلایان در شب و در نور کم، کاهش یافته بود، ولی در حال حاضر بیماران بینایی بسیار محدودی داشتند. در بررسی الکترورتینوگرافی پروباند، تخریب شبکه‌ای از نوع دیستروفی مخروطی - استوانه‌ای تشخیص داده شد. تعیین توالی بیماران با روش سانگر به شناسایی یک تغییر جدید (c.1220G>T) منجر گردید که در شجره سگريگیت می‌گردد. این تغییر در اثر تبدیل اسیدآمینه آرژنین موقعیت ۴۰۷ به اسیدآمینه لوسین (Arg407Leu) ایجاد می‌شود. بررسی با نرم‌افزارهای پیشگویی‌کننده بیماری‌زایی، تأییدکننده دخالت این تغییر در ایجاد سندرم جلیلی در این خانواده بود. بررسی پایگاه‌های داده ExAc و 1000 genomes نشان داد، این تغییر گزارش نشده است. آرژنین جایگاه ۴۰۷ نیز از جهت تکاملی در چندین گونه محافظت شده باقی مانده است.

کلیدواژه‌ها: سندرم جلیلی؛ پروتئین *CNNM4*؛ آمیلوژنز ایمپرکتا؛ انسان؛ دیستروفی مخروطی - استوانه‌ای؛ ایران.

^۱مرکز تحقیقات سلولی مولکولی،
دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

^۲گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده
پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران،
تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمد کرامتی پور؛ گروه ژنتیک
پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم
پزشکی تهران، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
keramatipour@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۷

تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ghofrani M, Keramatipour M. Identification of a novel mutation in *cnm4* gene in an Iranian family with jalili syndrome. Qom Univ Med Sci J 2019;13(8):73-79. [Full Text in Persian]

مقدمه

سندرم جلیلی (MIM # 217080)، یک بیماری نادر ژنتیکی است که مبتلایان به آن همزمان دچار دیستروپی مخروطی - استوانه‌ای (Cone-Rod dystrophy; CRD) و آملوژنیز ایمپرکتا (Amelogenesis Imperfecta) می‌شوند. الگوی وراثتی آن اتوزومی مغلوب بوده و نخستین بار توسط جلیلی و همکاران در یک خانواده بزرگ از شهر غزه گزارش شد (۱). دیستروپی‌های مخروطی - استوانه‌ای (MIM #120970)، بیماری‌های تخریب سلول‌های گیرنده نور در شبکیه هستند. علائم بالینی این بیماری شامل: فوتوفوبیا، از دست دادن دید مرکزی، کوررنگی، نیستاگموس پاندولی و تخریب پیشرونده ماکولا، در اوایل زندگی خود را نشان می‌دهند (۲). آملوژنیز ایمپرکتا (MIM #204700) نیز مشکل از گروه هتروژنی از بیماری‌های ژنتیکی است که در آن‌ها شکل‌گیری مینای دندان‌های شیری و دائمی دچار مشکلاتی از نوع هیپوپلازی، تکامل ناکافی، و هیپوکلسیفیکاسیون شده که در نهایت، منجر به از دست رفتن دندان‌ها می‌شود (۳،۴).

ژن دخیل در ایجاد سندرم جلیلی:

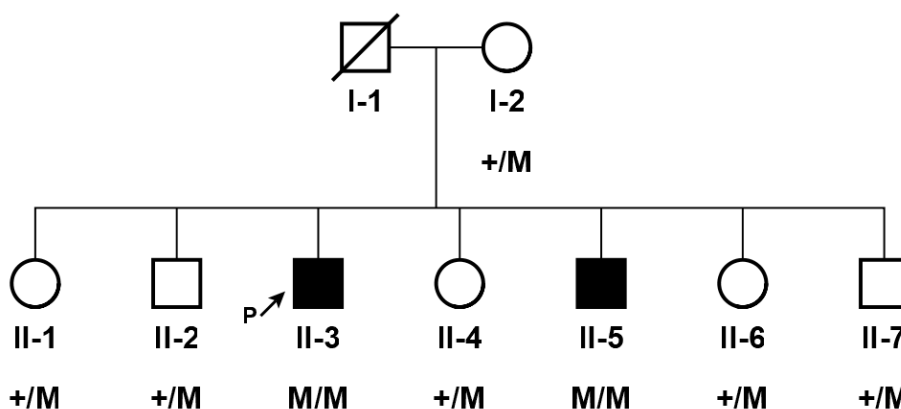
(Cyclin and CBS Domain Divalent Metal Cation Transport Mediator 4, CNNM4; MIM #607805) نام دارد.

این ژن در 2q11.2 قرار گرفته و از هفت اگزون تشکیل شده است و پروتئینی به طول ۷۷۵ اسیدآمینو تولید می‌کند. محل قرارگیری این پروتئین در غشای پلاسمایی است (۵)، و در فرآیند انتقال یون‌های فلزی، به‌ویژه منیزیم ایفای نقش می‌کند. پروتئین CNNM4 در چندین بافت از جمله شبکیه و مینای دندان بیان می‌شود. این پروتئین در شبکیه طی فرآیند آبشار فوتوترانسدکشن (تبدیل‌کننده نور به محرک الکتریکی) نقش دارد؛ درحالی‌که در مینای دندان در شکل‌گیری هیدروکسی آپاتیت طی فرآیند مینرالیزاسیون ایفای نقش می‌کند (۸-۶).

شرح مورد

شناسایی تنوع‌های بالینی در ژن CNNM4 می‌تواند به درک بهتر از نقش این ژن در فرآیند بیماریزایی سندرم جلیلی کمک کند. از طرف دیگر، شناسایی جهش ایجادکننده بیماری در هر خانواده نیز در تصمیم‌گیری‌های مربوط به انتخاب همسر و فرزندآوری به اعضای آن خانواده کمک‌کننده است.

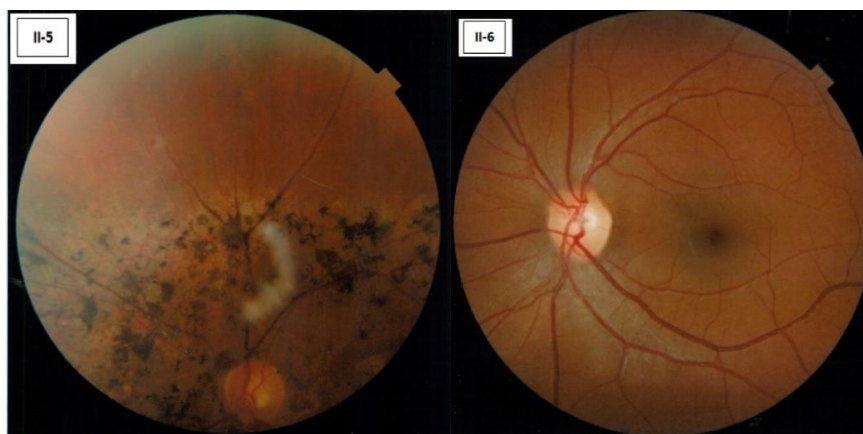
در این مطالعه یک مورد سندرم جلیلی در یک خانواده با دو فرد مبتلا مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۱). این خانواده اصالتاً متعلق به یک روستای بسیار کوچک با جمعیت کمتر از ۲۰ خانوار در اطراف بستان‌آباد آذربایجان شرقی بودند. براساس گفته‌های اعضای خانواده، والدین هیچ نسبت خونی با همدیگر نداشتند. پروباند، متولد سال ۱۳۵۱ و فرد II-5، متولد سال ۱۳۵۵ بود. هر دو فرد مبتلای خانواده همزمان دچار دیستروپی مخروطی - استوانه‌ای و آملوژنیز ایمپرکتا شده بودند. اولین مشکلات دندانی در دوره کودکی با زرد شدن دندان‌های شیری شروع شد. با گذر زمان دندان‌های دائمی نیز دچار پدیده زردشدن و تخریب مینای دندان شده بود که در نتیجه بیماران در اوایل دهه سوم زندگی مجبور به استفاده از پروتز دندانی شده بودند. اختلال چشمی در هر دو فرد بیمار خانواده از دوره نوجوانی (در زمان تحصیل در دوره تحصیلی راهنمایی) و با حساسیت به نور آفتاب شروع شده بود. در هر دو فرد علاوه بر فوتوفوبیا علائم شایع دیگری مانند دیستروپی مخروطی - استوانه‌ای همچون کوررنگی و از دست دادن دید مرکزی دیده می‌شد که با گذر زمان به تدریج بینایی این دو فرد در شب و نور کم رو به کاهش گذاشته بود، ولی تا به امروز، هیچ‌یک از دو بیمار بینایی خود را به‌طور کامل از دست نداده‌اند.



شکل شماره ۱. شجره خانواده مورد مطالعه. ژنوتیپ اعضای خانواده. + نشان دهنده ژنوتیپ طبیعی و M نشان دهنده جهش (c.1220G>T; Arg407Leu) می باشد.

هیچ کدام از دو فرد مبتلای خانواده به جز دیستروپی مخروطی - استوانه‌ای، آملوژنیز ایمپرکتا و سایر عوارض ناشی از این دو بیماری، مشکل دیگری نداشتند.

بررسی پروباند با الکترورتینوگرافی، مؤید تشخیص دیستروپی مخروطی - استوانه‌ای بود. در بررسی فوندوس فوتوگرافی علائم تخریب شبکیه به صورت واضح مشاهده گردید (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: تصویر فوندوس فوتوگرافی فرد II-5 (بیمار) و فرد II-6 (سالم).

به ترتیب از نظر کمّی و کیفی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی آگزونها و نواحی اتصال آگزون - اینترون، همچنین نواحی بالادست آگزون اول و نواحی پایین دست آگزون هفتم ژن *CNNM4* با استفاده از PCR تکثیر شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش‌های PCR از یک مطالعه پیشین برداشته شدند (جدول شماره ۱).

در این مطالعه گزارش مورد، پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه مکتوب از تمامی اعضای خانواده، از آنان نمونه خون محیطی گرفته شد. DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت Blood SV Midi (شرکت Geneall به آدرس اینترنتی <http://www.geneall.com>) استخراج گردید و DNAهای به دست آمده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل

جدول شماره ۱: لیست پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن *CNNM4*

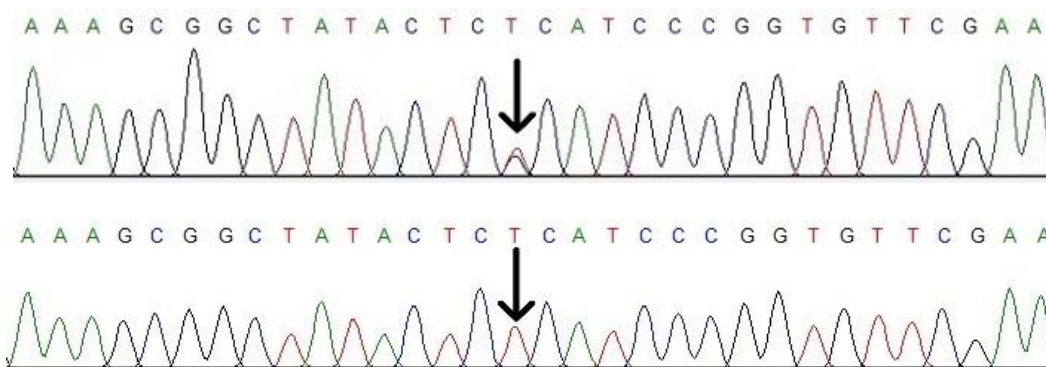
شماره آگزون	توالی پرایمر فوروارد (5'-3')	توالی پرایمر ریورس (5'-3')
۱ (بخش اول)	AGGAACGGCGTAGCTAGGAG	CACCTCGGTGAAGGAGATCAG
۱ (بخش دوم)	GCAACAAGTCGTGTGGGACG	CCCGGTTGTAAACAGTGCG
۱ (بخش سوم)	ACTACCTTCTCTGCTCGTTGC	ACCGCTCCAAAATCGTTCAC
۲ و ۳	CCCCATCCTGGTGACTTATG	CTGCAGCCCTCGTCCTATG
۴	CGGGAGTCGTCTGAGCAC	AGGAACAAGGGACAGTGGG
۵	GAGGTGCATGGCTTCCCT	CATGCTCAGTTCTGGTGTCTG
۶	CTTCCATGGGATGAGGTGAG	GAAAAAGGCATCTCGGGTTT
۷	GTCCCTGATCACAGCTACCC	TGTAAGGGCTTCCAGAGACG

پرایمرهای هر سه بخش اگزون شماره ۱ در طی این مطالعه طراحی شده‌اند، اما پرایمرهای اگزون‌های دیگر از مطالعه‌ای دیگر برداشته شده است (۷).

با استفاده از این پرایمرها تمام واکنش‌های PCR، به جز واکنش مربوط به اگزون اول با تغییر دادن زمان‌بندی و دمای مراحل واکنش، منجر به تکثیر توالی هدف شد. به منظور رفع مشکل عدم تکثیر اوزون اول، سه جفت پرایمر جدید با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شدند. توالی همه پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. محصولات PCR با کیت PCR SV Expin (شرکت Geneall) تخلیص و برای تعیین توالی ارسال شدند.

ارزیابی بیماری‌زایی تغییر شناسایی شده توسط نرم‌افزارهای Polyphen (http://sift.jcvi.org)، SIFT و CADD (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) و (https://cadd.gs.washington.edu/score) انجام گرفت.

فراوانی واریانت به‌دست آمده در پایگاه‌های داده Aggregation Consortium (ExAc) Exome به آدرس http://exac.broadinstitute.org و 1000 genomes به آدرس http://www.internationalgenome.org بررسی گردید. تعیین توالی ژن *CNNM4* در پروباند، وجود یک تغییر تک‌بازی (c.1220G>T) در اگزون اول را شناسایی کرد؛ درحالی که در سایر اگزون‌های این ژن هیچ تغییر دیگری مشاهده نشد. برای مشخص کردن وجود یا عدم وجود این تغییر در سایر اعضای این خانواده، ناحیه قرارگیری آن در همه اعضا تعیین توالی شد که در نتیجه مشاهده گردید این تغییر در خانواده موردبررسی سگريگیت (Segregate) می‌شود؛ مادر خانواده وضعیت هتروزیگوت داشت و هر دو برادر مبتلا برای این تغییر هموزیگوت بودند، ژنوتیپ تمامی خواهر/برادرهای سالم نیز هتروزیگوت بود (شکل شماره ۱ و ۳).



شکل شماره ۳: نمودار کروماتوگرام تعیین توالی ناحیه حاوی جهش شناسایی شده در یک فرد هتروزیگوت (بالا) و یک هموزیگوت جهش یافته (پایین).

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از بررسی تغییرات در مطالعه حاضر با نرم‌افزارهای سنجش بیماری‌زایی

DNA variant; Chromosomal position	Protein change	Grantham	SIFT	Polyphen	CADD score	ExAc	1000 genome	Mutation taster
c.1220G>T 97427956	p.Arg407leu	102	deleterious	Probably damaging	26.1	Absent	Absent	Disease-causing

بود (جدول شماره ۲). آرژنین جایگاه ۴۰۷ نیز از جهت تکاملی در چندین گونه محافظت شده باقی مانده است (جدول شماره ۳). بررسی پایگاه‌های داده ExAc و 1000 genomes نشان داد، این تغییر گزارش نشده است.

تغییر یافت شده جدید است و در هیچ‌یک از مطالعات پیشین گزارش نشده است. این تغییر باعث تبدیل اسیدآمینه آرژنین موقعیت ۴۰۷ به اسیدآمینه لوسین (Arg407Leu) می‌گردد. بررسی با نرم‌افزارهای پیشگویی‌کننده بیماری‌زایی، تأییدکننده احتمال دخالت این تغییر در ایجاد سندرم جلیلی در این خانواده

جدول شماره ۳: میزان تشابه اسید آمینه‌های ناحیه حاوی جهش پروتئین *CNNM4* انسانی و هومولوگ‌های آن در چندین گونه دیگر

گونه	موقعیت اسید آمینه آرژنین	همتراز سازی اسیدهای آمینه
انسان (Human)	۴۰۷	TMSEIMESGYT R IPVFEDEQSNIV
شامپانزه (Pan troglodytes)	۲۱۹	TMSEIMESGYT R IPVFEDEQSN I
میمون رزوس (Macaca mulatta)	۲۴۳	T R IPVFEDEQSN I
گره اهلای (Felis catus)	۳۴۵	TMSEIMESGYT R IPVFEDEQSN I
موش خانگی (Mus musculus)	۴۰۴	TMSEIMESGYT R IPVFEDEQSN I
مگس سرکه (Drosophila melanogaster)	۴۱۰	MNSGYS R IPVYDGD RKN I
سینورابتیدیس الکانس (Caenorhabditis elegans)	۴۲۴	TVMEIVKMGYT R IPVYQYGDKNNV
قورباغه پنجه‌دار غربی (Xenopus tropicalis)	۴۰۴	ESGYT R IPVYENERSNI

عدد ذکر شده در جدول فوق نشان‌دهنده موقعیت اسید آمینه آرژنین در پروتئین‌های مشابه پروتئین *CNNM4* انسانی در گونه‌های دیگر است.

بحث

در مطالعه حاضر، یک خانواده ایرانی از استان آذربایجان شرقی با دو فرد مبتلا به سندرم جلیلی مورد بررسی قرار گرفت و یک جهش جدید شناسایی شد. تاکنون ۳۳ خانواده مبتلا به سندرم جلیلی از سراسر جهان شناسایی شده‌اند و در اکثر این موارد، بیماری از خاورمیانه گزارش شده است (۹). احتمالاً دلیل این پدیده، بالا بودن فراوانی ازدواج‌های هم‌خون در این منطقه نسبت به سایر مناطق دیگر می‌باشد (۱۰). پیشتر نیز دو گزارش از دو خانواده مبتلا به سندرم جلیلی در ایران منتشر شده بود. در مقاله نخست، یک شجره هم‌خون با چهار فرد مبتلا مورد بررسی قرار گرفت و جهش c.1-?_1403+?del آن‌ها به صورت هموزیگوت شناسایی گردید (۶). در مقاله دوم نیز یک خانواده با ۲۴ فرد مبتلا از مازندران بررسی شد و جهش c.1091delG در اگزون اول شناسایی گردید که این جهش موجب تغییر اسید آمینه گلايسين موقعیت ۳۶۴ به والین و ایجاد کدون خاتمه زودرس در پایین دست (p.G364Vfs*9) شده بود (۱۱). هیچ‌کدام از این جهش‌ها در مطالعات پیشین شناسایی نشده بودند. در مطالعه حاضر به عنوان سومین گزارش از ایران، خانواده‌ای با داشتن دو عضو مبتلا مورد بررسی قرار گرفت و یک تغییر تک بازی جدید شناسایی گردید.

این تغییر (c.1220G>T) از نوع بد معنی بوده و در اگزون اول ژن *CNNM4* قرار دارد که باعث تبدیل اسید آمینه آرژنین موقعیت ۴۰۷ به اسید آمینه لوسین می‌شود. اسید آمینه آرژنین از نوع اسیدهای آمینه دارای بار الکتریکی قلیایی است؛ در حالی که اسید آمینه لوسین فاقد بار و غیرقطبی بوده که احتمالاً این تغییر بار الکتریکی با تأثیر گذاری در عملکرد پروتئین *CNNM4* موجب ایجاد بیماری می‌شود. نرم‌افزارهای پیش‌بینی بیماریزایی بر بیماریز بودن این تغییر دلالت دارند و عدم وجود آن در پایگاه‌های تجمع داده‌های Whole genome و Whole exome نیز مؤید بیماریز بودن این تغییر است. براساس این یافته‌ها به نظر می‌رسد سندرم جلیلی در خانواده مورد بررسی به‌واقع ناشی از این جهش بوده است. مطالعه حاضر منجر به شناسایی جهش ژنتیکی ایجاد کننده بیماری در یک خانواده مبتلا به سندرم جلیلی از یک روستای کوچک شد که این نتایج علاوه بر افزایش اطلاعات در مورد ژنتیک این بیماری، می‌تواند به خانواده مذکور و اهالی ساکن در روستای آن‌ها برای تصمیم‌گیری در مورد ازدواج و فرزندآوری کمک کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از خانواده مذکور به دلیل همکاری بی‌دریغشان صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نمایند.

References:

1. Jalili IK, Smith NJ. A progressive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta: a new syndrome. *J Med Genet* 1988;25(11):738-40. PubMed
2. Hamel CP. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:1-7. [Link](#)
3. Aldred MJ, Savarirayan R, Crawford PJ. Amelogenesis imperfecta: A classification and catalogue for the 21st century. *Oral Dis* 2003;9(1):19-23. PubMed
4. Witkop CJ Jr. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol* 1988;17(9-10):547-53. PubMed
5. Gómez García I, Oyenarte I, Martínez-Cruz LA. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the CBS pair of the human metal transporter CNNM4. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2011;67(3):349-53. PubMed
6. Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, et al. Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2009;84(2):266-73. PubMed
7. Polok B, Escher P, Ambresin A, Chouery E, Bolay S, Meunier I, et al. Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2009;84(2):259-65. PubMed
8. Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, et al. Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across epithelia: a mouse model. *PLoS Genet* 2013;9(12):e1003983. PubMed
9. Maia CMF, Machado RA, Gil-da-Silva-Lopes VL, Lustosa-Mendes E, Rim PHH, Dias VO, et al. Report of two unrelated families with Jalili syndrome and a novel nonsense heterozygous mutation in CNNM4 gene. *Eur J Med Genet* 2018;61(7):384-7. PubMed
10. Romeo G, Bittles AH, Consanguinity in the contemporary world. *Hum Hered* 2014;77(1-4):6-9. PubMed
11. Rahimi-Aliabadi S, Daftarian N, Ahmadi H, Emamalizadeh B, Jamshidi J, Tafakhori A, et al. A novel mutation and variable phenotypic expression in a large consanguineous pedigree with Jalili Syndrome. *Eye (Lond)* 2016;30(11):1424-32. PubMed