مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۴، شماره ۴/ مهر و آبان ۱۳۹۱/ ۹۵-۸۸

گزارش موردی

گزارش جهش جدید در ژن Retinoblastoma1 (*RB1*) در یک بیمار ایرانی مبتلا به رتینوبلاستوما و تاثیر آن روی پیرایش mRNA

علی آهنی[۱،۲]، دکتر حمیدرضا خرم خورشید[۱،۳]، بابک بهنام[۱،۴]، دکتر محمد تقی اکبری[۲]*

[۱]گروه ژنتیک، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاه ابن سینا، تهران، ایران؛ [۲]گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران؛ [۴]گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۰ اصلاح نهایی: ۹۱/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: **رتینوبلاستوما شایع ترین تومور جامد درون چشمی در کودکان زیر شش سال است. جهش در هر دو نسخه ژن Retinoblastoma1 (*RB1*) مسئول شکل گیری این بیماری می باشد. طیف وسیعی از جهش ها تاکنون در سرتاسر ژن *RB1* گزارش شده است. بسیاری از جهش های نقطه ای گزارش شده در ژن های انسان، علی رغم نوع آنها، وضعیت پیرایش را دستخوش تغییر می کنند. در این مطالعه جهش جدید در ژن *RB1* در یک بیمار مبتلا به رتینوبلاستوما معرفی و تاثیر آن روی پیرایش mRNA بیان می شود.**

گزارش مورد: **در مطالعه حاضر، آنالیز جهش ژن *RB1* بر روی یک بیمار ایرانی مبتلا به فرم تک گیر و یک طرفه رتینوبلاستوما (دختر بچه ٤ ساله) با استفاده از تعیین توالی نواحی کد کننده و همچنین Multiplex Ligation dependent of Probe Amplification (MLPA) انجام گرفته است. در ادامه با استفاده از روش RT-PCR وضعیت پیرایش mRNA ژن RB1 نیز مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه این بررسی ها یک جهش هم معنی (g.70320C>T) در نزدیکی انتهای اگزون ۱۲ شناسایی شد. این تغییر نوکلئوتیدی، توالی مورد توافق یک عنصر افزاینده پیرایش، که محل اتصال پروتئین SC-35 می باشد را از بین می برد. بررسی ساختاری cDNA این بیمار نشان دهنده اختلال در فرایند پیرایش و حذف اگزون ۱۲ از رونوشت بالغ ژن *RB1* است.**

نتیجه گیری: **بر اساس یافته های این مطالعه می توان تغییر هم معنی فوق را تحت عنوان یک جهش پاتوژن جدید در نظر گرفت، همچنین برای اولین بار وجود یک توالی مورد توافق افزاینده پیرایش، در اگزون ۱۲ ژن *RB1* گزارش می شود.**

واژه های کلیدی: پیرایش، جهش ژن *RB1*، رتینوبلاستوما.

مقدمه:

رتینوبلاستوما (OMIM 180200) شایع‌ترین تومور جامد درون چشمی در کودکان زیر سن شش سال می باشد و در سلول‌هایی ایجاد می‌شود که هر دو نسخه ژن Retinoblastoma1 (*RBI*) در آنها دچار جهش شده است. شیوع بیماری در جمعیت های مختلف بین ۱ در ۱۵۰۰۰ تا ۱ در ۲۸۰۰۰ متغیر می باشد (۱). تنها دلیل بروز بیماری رتینوبلاستوما جهش در ژن *RBI* عنوان شده است و تا به امروز تاثیر هیچ عامل دیگری در شروع بیماری گزارش نشده است. حدود ۴۰ درصد از بیماران جهش اول را به صورت رده زایا (gemline) به ارث می برند. در بخش عمده ای از این افراد، جهش دوم به صورت سوماتیک در تعدادی از سلول های شبکیه رخ می دهد و غالباً منجر به شکل گیری فرم دوطرفه بیماری می شود. این افراد می توانند بیماری را به صورت یک صفت اتوزومی غالب با نفوذ بالا به نسل بعد انتقال دهند (۳،۲). در ۶۰ درصد باقی

نویسنده مسئول: *تهران- بزرگراه جلال آل احمد-دانشگاه تربیت مدرس- گروه ژنتیک پزشکی- تلفن: ۸۲۸۸٤٥۱۷-۰۲۱*

E-mail:mtakbari@modares.ac.ir

مانده بیماران هر دو فرآیند جهشی مسئول بیماری به صورت سوماتیک و در یک سلول شبکیه رخ می دهد و منجر به شکل گیری فرم یکطرفه بیماری می شود.

ژن Retinoblastoma1 (*RBI*) پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) را کد می‌کند که یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سرکوبگر تومور در چرخه سلولی به شمار می رود. pRb در چرخه سلول نقش کنترلی مهمی را بر عهده دارد، در مرحله G1 (یا G0) از چرخه سلول پروتئین pRb به صورت هیپو فسفریله وجود دارد و در این حالت قدرت اتصالی بسیار زیادی به پروتئین های خانواده E2F دارد. اتصال pRB به E2F سبب مهار و عدم فعالیت این پروتئین می شود. در اواخر فاز G1 و زمانی که سلول آماده ورود به فاز S می باشد بر اثر عملکرد سایکلین D و کینازهای وابسته به آن (cdk 4 /6)، pRb در برخی موقعیت‌های خود فسفریله می شود و پس از هیپرفسفریلاسیون pRb قدرت اتصالی آن به E2F کاهش می یابد، به این ترتیب E2F به راحتی از آن جدا شده و شروع به فعالیت می‌کند. E2F ها فاکتور های رونویسی درون هسته ای هستند و بر اثر فعالیت آنها طیف وسیعی از ژن ها، که برای سنتز DNA و پیشرفت سلول در طول فاز S لازم هستند بیان می شوند. به این ترتیب سلول از مرز G1/S عبور کرده و وارد مراحل بعدی و در نهایت میتوز خواهد شد. در بسیاری از بافت ها علاوه بر مسیر کنترلی pRb ژن های سرکوبگر تومور دیگری نیز وجود دارند که همراه با pRb چرخه سلول را کنترل می کنند ولی در تعدادی از بافت ها و سلول ها، از جمله سلول های نابالغ شبکیه چشم، pRb یک نقش کلیدی بر عهده دارد و فقدان عملکرد این پروتئین می تواند منجر به رشد بی رویه سلول‌ها و تبدیل شدن آنها به سلول‌های هایپرپلاستیک شود. در این حالت سلول ها با سرعت بیشتری تکثیر شده و وضعیت رتینوما (پیش ساز رتینوبلاستوما) را ایجاد می‌کند. اعتقاد بر این است که وقوع تغییرات جهشی بیشتر در سایر ژن های کنترلی (خصوصاً ژن های حد واسط چرخه pRb و p53) همانند P16INK4A و خانواده MDM، برخی از سلول‌های رتینوما بدخیم شده و تبدیل به رتینوبلاستوما می شوند (۴).

ژن *RBI* در موقعیت کروزومی 13q14 قرار دارد و ناحیه ای معادل ۱۸۰ Kb را به خود اختصاص داده است. این ژن از ۲۷ اگزون تشکیل شده که محصول رونویسی از آن یک mRNA با طول ۴۸۴۰ نوکلئوتید است و توسط آن، پروتئینی به طول ۹۲۸ آمینو اسید ساخته می شود. تاکنون بیش از ۹۰۰ جهش مختلف در ژن *RBI* گزارش شده است (۱۲-۵) که این جهش ها در سرتاسر ژن پراکنده هستند. جهش های مشاهده شده طیف بسیار وسیعی را شامل می شوند و در بین آنها حذف و اضافه های بسیار بزرگ، انواع جهش های نقطه ای (تغییر در چارچوب، بی معنی، بد معنی و جهش در جایگاه های پیرایشی) گزارش شده است (۱۲). بیش از ۷۰ درصد از مجموع جهش های نقطه ای گزارش شده در این ژن منجر به شکل گیری کدون پایان زودرس و ساخته شدن پروتئین های ناقص می شود (۶) ولی در کنار این جهش ها که اغلب نفوذ کامل دارند، جهش های دیگری نیز وجود دارد که بسیاری از آنها نفوذ کاهش یافته ای دارند. این گروه اغلب شامل جهش‌های بدمعنی و یا جهش در جایگاه های پیرایشی را شامل می‌شود. ناقلین اینگونه جهش ها در موارد زیادی به فرم یکطرفه بیماری مبتلا می‌شوند (۱۳،۱۲،۱۰). بررسی مولکولی جهش های ژن *RBI* تا حد زیادی می تواند سبب بهبود در روند کنترل و اداره بیماری شود و به این ترتیب سایر افراد در معرض خطر، در خانواده فرد بیمار نیازی به انجام آزمایشات دردناک و پرهزینه ای که تحت بیهوشی انجام می شوند را ندارند و صرفاً بررسی های لازم بر روی افرادی انجام خواهد شد که حامل جهش در ژن *RBI* هستند (۶).

حذف شدن صحیح و به موقع اینترون ها از پیش‌ساز mRNA برای بیان شدن یک ژن بسیار ضروری می‌باشد. از طرفی در بسیاری از موارد اطلاعات و توالی های

موجود در نقاط حساس پیرایشی از جمله گیرنده و دهنده پیـرایش (Acceptor and donor splicing site) و همچنین توالی نقطه انشعاب قدرت کافی را برای مشخص کردن محل دقیق اینترون و اگزون ها را ندارند (۱۴). در این گونه موارد عناصر cis –acting و کمکی که در نزدیـــکی نقـــاط پیـــرایشی وجـــود دارند به کمک فـــرآیند پیرایش می شتـــابند. این عنـــاصر به دو شکل کلی عناصر افزاینده پیرایش (Splicing enhancer elements=ESE) و عناصر خاموش کننده پیرایش (Splicing silencer elements=ESS) عمل می کنند (۱۵). محل قرار گیری این عناصر ممکن است در داخل اینترون ها و یا در درون اگزون ها باشد.

تعداد فراوانی از جهش های بیماری زای گزارش شده در انسان منجر به اختلال در فرآیند پیرایش می شوند (۱۵). بسیاری از این جهش ها به صورت مستقیم نقاط اصلی پیرایش را هدف قرار می دهند و یا تغییر در نزدیکی این نقاط رخ می دهد و سبب فعال شدن یک جایگاه پیرایشی پنهان (cryptic) می شود، به همین ترتیب برخی جهش ها نیز عناصر کمکی پیرایشی را تغییر می دهند. دیدگاه رایج در مورد جهش های نقطه ای تغییر دادن یک آمینو اسید در ساختار پروتئین و یا ایجاد یک کدون پایان زودرس می باشد؛ اما باید توجه داشت که برخی جهش ها علاوه بر موارد ذکر شده می توانند توالی عناصر اگزونی موثر در پیرایش (Exonic splicing enhance= ESE) را نیز دچار تغییر سازند. بنابر این، حتی تغییرات هم معنی در ژنها که سبب تغییر توالی پروتئین نمی شوند، ممکن است باعث اختلال در فرآیند پیرایش شوند (۱۵).

در مطالعه حاضر اثر عملکردی یک تغییر هم معنی در ژن *RBI* و تاثیر آن بر فرآیند پیرایش رونوشت این ژن مورد بررسی قرار گرفته است.

گزارش مورد:

بیمار مورد بررسی در این مطالعه یک دختر بچه چهار ساله بود که در سن ۳۵ ماهگی به دلیل لوکوکوریا و انحراف چشم چپ به کلینیک مراجعه نموده و برای وی تشخیص بالینی رتینوبلاستوما داده شد. چشم راست بیمار کاملاً سالم بوده و تا زمان نگارش این مقاله بیماری حالت یک طرفه دارد. همچنین در طول این مدت بیمار شش دوره شیمی درمانی با استفاده از پروتکل درمانی VEC (وینکریستین، اتویساید و کربوپلاتین) دریافت نموده و علاوه بر عدم تخلیه چشم تا حدی بینایی چشم درگیر نیز حفظ شده است. پدر و مادر کودک مبتلا، کاملاً طبیعی بوده و از نظر بیماری های درون چشمی نیز مورد بررسی قرار گرفته و هیچ ناهنجاری یا بدخیمی مرتبط با رتینوبلاستوما در آنها دیده نشد. همچنین فرد مورد مطالعه فرزند دوم خانواده می باشد، وی دارای یک خواهر ۹ ساله و کاملاً سالم است که بیماری رتینوبلاستوما در مورد او گزارش نشده است. قبل از شروع مطالعه، والدین بیمار مورد مشاوره ژنتیک قرار گرفته و پس از اخذ فرم رضایت نامه آگاهانه، نمونه خون محیطی کودک بیمار و سایر افراد خانواده وی گرفته شد. تمامی فرآیند های آزمایشگاهی و نمونه برداری که در طی این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته اند در کمیته اخلاق پزشکی و مطالعات انسانی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین گروه اخلاق در علوم پزشکی پژوهشگاه ابن سینا مورد بررسی و تایید قرار گرفت.

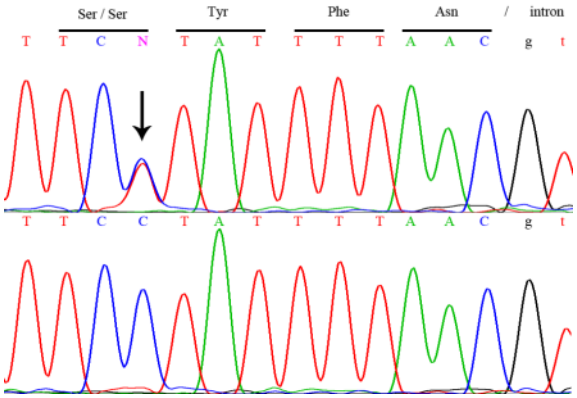
بررسی جهش در ژن RBI توسط PCR و تعیین توالی:

تمامی ۲۷ اگزون و پروموتر ژن *RBI* در بیمار با استفاده از ۲۵ واکنش PCR تکثیر و تعیین توالی شد. برای این منظور تمامی نواحی کد کننده ژن *RBI* در فرد بیمار ۲۵ جفت پرایمر با توجه به اطلاعات ارائه شده توسط Braggio و همکاران طراحی و ساخته شد (۱۶). پرایمر ها به گونه ای انتخاب شدند که حداقل ۵۰ bp از نواحی اینترونی کناری هر اگزون را نیز تکثیر نمایند. نتایج تعیین توالی در ۲۶ اگزون و پروموتر کاملاً طبیعی بوده و مغایرتی با توالی مرجع ژن *RBI* مشاهده نشد. در محل نزدیک به انتهای اگزون ۱۲ بیمار یک تغییر نوکلئوتیدی C

به T (g.70320C>T) در وضعیت هتروزیگوت مشاهده گردید (تصویر شماره ۱). با توجه به اینکه جهش فوق در نمونه DNA به دست آمده از خون محیطی بیمار شناسایی شده است، به عنوان یک جهش رده زاینده (Germline) در نظر گرفته می شود. این تغییر در واقع هم معنی (Samesense) بوده و سبب تغییر آمینواسیدی در پروتئین نمی شود. در ادامه برای بررسی ساختاری ژن RBI از روش Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) استفاده شد و برای این کار از کیت SALSA MLPA P047-RB (MRC-Holland) استفاده شد. نتایج روش MLPA نیز نشان دهنده سالم بودن ساختار ژنی بوده و هیچ موردی از حذف یا اضافه در آن دیده نشد. به منظور اطمینان از صحت مراحل کار واکنش PCR مربوط به اگزون ۱۲ بیمار تکرار شده و پس از تعیین توالی با استفاده از پرایمر برگشتی مجدداً جهش مذکور مشاهده گردید. همچنین نتیجه بررسی نمونه DNA والدین و خواهر بیمار نشان داد که هیچ کدام از آنها حامل این جهش نیستند.

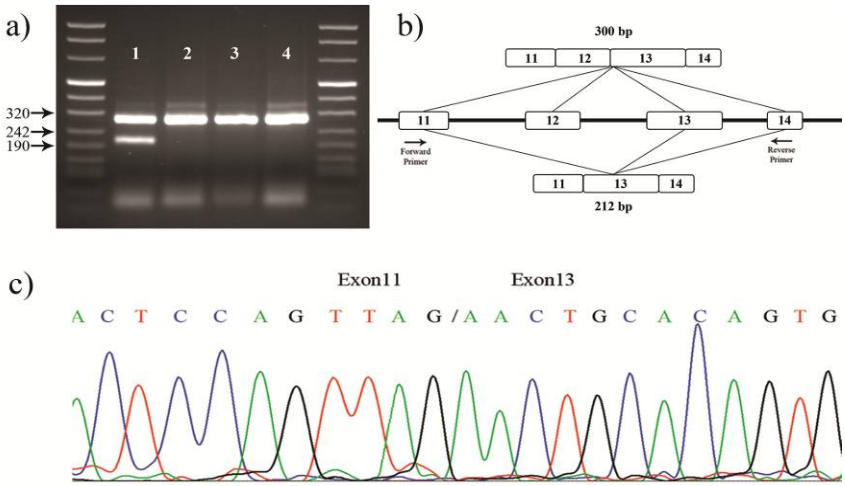
RT-PCR برای بررسی وضعیت پیرایش mRNA

برای اطمینان از پاتوژن بودن جهش شناسایی شده و مشاهده تأثیر آن در سطح mRNA، مجدداً از بیمار ۳ میلی لیتر نمونه خون محیطی تازه گرفته شد و بلافاصله با استفاده از TRIzol از آن Total RNA استخراج گردید (۱۸،۱۷). پس از استخراج RNA بلافاصله مراحل سنتز cDNA با استفاده از کیت QuantiTect Rev Transcription (QIAGEN) انجام شـــد. به منظـــور بررسی وجود حذف یا اضافه در ساختار cDNA ژن *RBI*، واکنش RT-PCR با استفاده از پـرایمرهای زیـــر انجـــام گردید: پرایمر رفت 3´TGAAACACAGAGAACACCAC5´ و پرایمر برگشت CGAACTCCAAGTTTGTATCG. پرایمر رفت در محل اگزون ۱۱ و پرایمر برگشت در محل اگزون ۱۴ قرار دارند. محصولات RT-PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و باند های مشاهده شده از ژل بریده شدند و سپس با استفاده از کیت AccuprepTM gel extraction (Bioneer) از ژل استخراج شده و تعیین توالی شدند. بررسی cDNA فرد بیمار با روش RT-PCR نشان داد که در فرد بیمار دو قطعه متفاوت با طول ۳۰۰ و ۲۱۲ جفت باز ایجاد می شود، در حالی که در نمونه های مربوط به افراد طبیعی تنها یک باند با طول ۳۰۰ جفت باز مشاهده می شود. تعیین توالی قطعات فوق نشان داد که قطعه ۲۱۲ bp فاقد توالی های اگزون ۱۲ می باشد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: نتیجه تعیین توالی جهش جدید g.70320C>T، مشاهده شده در فرد بیمار در مقایسه با توالی طبیعی

محل وقوع جهش با پیکان مشخص شده است



تصویر شماره ۲: محصولات RT-PCR، تصویر شماتیک و کروماتوگرافی تعیین توالی برای بررسی وضعیت پیرایش mRNA فرد

a) محصولات RT- PCR تفکیک شده بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪: ستون ۱ فرد بیمار و ستون های ۳،۲ و ٤ نمونه های مربوط به افراد طبیعی می باشد. b) تصویر ایجاد یک قطعه ۳۰۰ bp اتصال اگزون های ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ١٤ در mRNA افرد سالم که حذف اگزون ۱۲ از این ساختار قطعه ای با طول ۲۱۲ bp ایجاد خواهد نمود. c) کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی قطعه ۲۱۲ bp که نشان دهنده اتصال توالی های اگزون ۱۱ و ۱۳ می باشد.

بحث:

در این مطالعه برای اولین بار در ایران آنالیز مولکولی ژن *RBI* در یک بیمار ایرانی انجام گرفته و در نتیجه آن یک جهش جدید (g.70320C>T) در بیمار مورد مطالعه مشاهده شد.

در حدود ۸۰ تا ۸۵ درصد بیماران نوع یکطرفه رتینوبلاستوما (۱۹،۱۲،۶) هر دو جهش به صورت سوماتیک رخ می دهند و بنابراین پیش فرض، از ابتدای شروع بررسی مولکولی این بیمار احتمال یافتن جهش در نمونه خون بیمار بسیار کم بود. پس از تعیین توالی تمامی ژن و بررسی ساختاری ژن با استفاده از MLPA تنها تغییر نوکلئوتیدی که در این بیمار مشاهده گردید یک تغییر هم معنی بود که در انتهای اگزون ۱۲ قرار داشت. در طی این تغییر نوکلئوتیدی کدون TCC به TCT تبدیل شده است که هر دوی این کدون ها اسید آمینه سرین را کد می کنند. با توجه به این موضوعات در ابتدا گمان بر این بود که تغییر مشاهده شده یک واریانت نرمال است و تاثیری در بروز بیماری این فرد نداشته است، همچنین این احتمال داده شد که جهش های اصلی مسئول بیماری هر دو به صورت سوماتیک و در درون سلول های شبکیه فرد بیمار رخ داده اند و جهش وضعیت رده زایا ندارد. بر این اساس پایگاه‌های اطلاعاتی Human Gene Mutation Database (HGMD) و پایگاه LOVD ژن *RBI* (RBGMD یا *RBI* Gene Mutation Databse، مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه جستجو ها نشان دهنده این امر بود که تاکنون چنین تغییر نوکلئوتیدی در این پایگاه ها ثبت نشده است. بر این اساس برای تأیید پاتوژن بودن این جهش مطالعات بیشتری با استفاده از برخی ابزارهای بیوانفورماتیکی صورت گرفت. با توجه به اینکه محل وقوع جهش در نزدیکی انتهای اگزون ۱۲ قرار دارد و تنها ۹ جفت باز بین محل وقوع جهش و نقطه شروع اینترون ۱۲ فاصله وجود دارد این احتمال داده شد که جهش مذکور می تواند سبب اختلال در فرآیند پیرایش mRNA شود. مطالعه بیوانفورماتیکی توالی ناحیه وقوع

جهش با نرم افزارهایی همانند ESE finder V2.0 نشان داد که توالی ATTTCCTA (C نشان دهنده محل وقوع جهش است) یک جایگاه اتصالی بالقوه برای پروتیین افزاینده پیرایش، SC35، است (۲۰). مطالعاتی که قبلاً در زمینه نقش این پروتیین در پیرایش و تاثیر جهش در جایگاه اتصالی آن بر روی عملکرد پروتیین انجام شده بود در تمامی موارد نشان می داد که نتیجه جهش از کار افتادن فرآیند پیرایش در دو طرف اگزون محل جهش است که بر اثر آن اگزون جهش یافته نمی تواند به درستی پیرایش شود و حذف می شود (۲۲،۲۱). با توجه به این فرضیه برای مطالعه تاثیر احتمالی جهش دو پرایمر رفت و برگشتی در دو طرف اگزون ۱۲ (در محل اگزون های ۱۱ و ۱۴) طراحی شد و cDNA فرد بیمار مورد مطالعه قرار گرفت که نشان دهنده حذف اگزون ۱۲ می باشد. بر این اساس می توان با قطعیت تغییر نوکلئوتیدی g.70320C>T را یک جهش پاتوژن به شمار آورد.

در صورت وقوع جهش‌های رده زایا در بیماران رتینوبلاستوما احتمال درگیری هر دو چشم بیماران با بیماری بسیار محتمل می باشد. با توجه به اینکه بیمار مورد مطالعه تنها در یکی از چشمان خود بیماری را نشان داده می توان این فرضیه را مطرح کرد که جهش g.70320C>T در واقع نفوذ کاهش یافته ای در مقایسه با جهش های بی معنی و یا حذف و اضافه دارد به همین دلیل علی رغم وجود جهش در تمامی سلول های شبکیه بیمار تنها یک تومور رتینوبلاستوما در این بیمار ایجاد شده است. مرور منابع موجود در زمینه جهش های ژن *RBI* نیز موید همین موضوع می باشد (۱۲،۱۰). در اغلب این مقالات عنوان شده که بسیاری از جهش های بدمعنی و جهش های درگیر در پیرایش mRNA سبب شکل گیری آلل های ضعیف می گردند ولی ضعف این آلل ها به اندازه ای نیست که بتواند روند طبیعی رشد و تکثیر سلول ها را بر هم زده و باعث شروع سرطان گردد (۱۲). البته باید به این موضوع نیز توجه داشت که تا حدود سن شش سالگی احتمال بروز تومور های جدید رتینوبلاستوما در ناقلین جهش ها وجود دارد و بیمار مذکور در حال حاضر تنها چهار سال سن دارد.

نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر برای اولین بار وجود یک عنصر اگزونی افزاینده پیرایش (ESE) در ژن *RBI* گزارش می‌شود و همچنین جهش جدید g.70320C>T نیز در بیمار ایرانی مورد مطالعه، سبب از بین رفتن توالی فوق می شود و در نهایت سبب اختلال در فرآیند طبیعی پیرایش ژن *RBI* می گردد. بر این اساس در صورت مشاهده مجدد این تغییر در بیماران دیگر می توان آن را به عنوان یک جهش پاتوژن در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان، از کادر پزشکی بیمارستان محک به دلیل فراهم آوردن نمونه بیمار و همچنین پشتیبانی مالی از این طرح کمال تشکر را دارند. همچنین این طرح بخشی از مراحل رساله دکتری در رشته ژنتیک پزشکی بوده است که توسط پژوهشگاه فناوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا و دانشگاه تربیت مدرس تأمین اعتبار شده است.

منابع:

1. Vogel F. Genetics of retinoblastoma. Hum Genet. 1979 Nov; 52(1): 1-54.

2. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1971 Apr; 68(4): 820-3.

3. Comings DE. A general theory of carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1973 Dec; 70(12): 3324-8.

4. Harbour JW, Dean DC. Corepressors and retinoblastoma protein function. Curr Top Microbiol Immunol. 2001; 254: 137-44.

5. Tsai T, Fulton L, Smith BJ, Mueller RL, Gonzalez GA, Uusitalo MS, et al. Rapid identification of germline mutations in retinoblastoma by protein truncation testing. Arch Ophthalmol. 2004 Feb; 122(2): 239-48.

6. Richter S, Vandezande K, Chen N, Zhang K, Sutherland J, Anderson J, et al. Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. Am J Hum Genet. 2003 Feb; 72(2): 253-69.

7. Houdayer C, Gauthier-Villars M, Lauge A, Pagès-Berhouet S, Dehainault C, Caux-Moncoutier V, et al.Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF. Hum Mutat. 2004 Feb; 23(2): 193-202.

8. Lohmann DR, Brandt B, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. Am J Hum Genet .1996 May; 58(5): 940-9.

9. Lohmann DR. RB1 gene mutations in retinoblastoma. Hum Mutat. 1999; 14(4): 283-8.

10. Zhang K, Nowak I, Rushlow D, Gallie BL, Lohmann DR. Patterns of missplicing caused by RB1 gene mutations in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. Hum Mutat. 2008 Apr; 29(4): 475-84.

11. Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, et al. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. Hum Mutat. 2001 May; 17(5): 412-22.

12. Valverde JR, Alonso J, Palacios I, Pestana A. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. BMC Genet. 2005 Nov; 6: 53.

13. Mitter D, Rushlow D, Nowak I, Ansperger-Rescher B, Gallie BL, Lohmann DR. Identification of a mutation in exon 27 of the RB1 gene associated with incomplete penetrance retinoblastoma. Fam Cancer. 2009; 8(1): 55-8.

14. Sun H, Chasin LA. Multiple splicing defects in an intronic false exon. Mol Cell Biol. 2000 Sep; 20(17): 6414-25.

15. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 2002 Apr; 3(4): 285-98.

16. Braggio E, Bonvicino CR, Vargas FR, Ferman S, Eisenberg AL, Seuanez HN. Identification of three novel RB1 mutations in Brazilian patients with retinoblastoma by "exon by exon" PCR mediated SSCP analysis. J Clin Pathol. 2004 Jun; 57(6): 585-90.

17. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques. 1993 Sep; 15(3): 532-4, 6-7.

18. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc. 2006; 1(2): 581-5.

19. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2004 Aug; 129C(1): 23-8.

20. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. Nucleic Acids Res. 2003 Jul; 31(13): 3568-71.

21. Lam BJ, Hertel KJ. A general role for splicing enhancers in exon definition. RNA 2002 Oct; 8(10): 1233-41.

22. Liu HX, Chew SL, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR. Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. Mol Cell Biol. 2000 Feb; 20(3): 1063-71.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2012 Oct, Nov; 14(4): 88-95. . ***Case Report***

Report of a novel mutation in *RB1* gene from an Iranian retinoblastoma patient and its effect on splicing pattern of mRNA

Ahani A (PhD)[1,2], Khoramkhorshid HR (PhD)[1,3], Behnam B (PhD)[1,4], Akbari MT (PhD)[2]*

[1]Genetics Dept., Reproductive biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Tehran, I.R. Iran; [2]Medical Genetics Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran; [3]Genetics Research Center, Social Welfare and Rehabilitation Sciences University, Tehran, I.R. Iran; [4]Genetics & Molecular Biology Dept., Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

Received: 16/Aug/2010 Revised: 26/Feb/2011 Accepted: 7/Apr/2011

Background and aims: Mutations in *RB1* gene may lead to retinoblastoma which is the most common solid intraocular tumor in under-six year old children. To date, a wide spectrum of the mutations has been reported in the splicing of *RB1* which either affect splicing sequences or splicing regulatory elements. This report introduces a new mutation in *RB1*and its influence on the splicing of mRNA.

Case report: In the present survey, mutation analysis was done in an Iranian patient with sporadic unilateral retinoblastoma using direct sequencing and MLPA. Also, *RB1* gene splicing pattern was analyzed by RT-PCR method. As a result, a same-sense nucleotide change (g.70 320C>T) was found near the 5' end of exon 12. This alteration disrupts the consensus sequence of an exonic splicing enhancer and changes the binding site of SC-35 protein. Structural analysis of cDNA in this patient showed the disruption of normal splicing pattern and the skipping of exon 12 from the *RB1* transcript.

Conclusion: Based on these findings, it may be reasonable to conclude that the above nucleotide change could be a pathogenic mutation. Also, for the first time we report an evidence for the presence of an exonic splicing enhancer in the exon 12 of the *RB1* gene.

Keywords: **Retinoblastoma, *RB1* gen, Mutation, Splicing.**

Cite this article as: Ahani A, Khoramkhrshid HR, Behnam B, Akbari MT. Report of a novel mutation in RB1 gene from an Iranian retinoblastoma patient and its effect on splicing pattern. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 Oct, Nov; 14(4): 88-95.

*Corresponding author:
Medical Gentics Dept., Medical faculty, Tarbiat modares University, Jalal aleahmad highway, Tehran, I.R. Iran.
Tel: 00982182884517, E-mail: mtakbari@modares.ac.ir