

תכנית-מחקר המוגשת לאישור כתוכנית לעבודת דוקטור

12-07-2009

תאריך הגשת התוכנית: 07/09

שם התלמיד: לינה ביזה, Lina Bida.

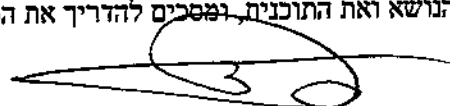
שם המדריך: ד"ר דרור שרון.

**איתור ואפיון גנים הגורמים למחלות רשתית תורשתיות עם**

**מעורבות תאי ה-cones באוכלוסייה הישראלית**

**Identification and Characterization of Genes Causing  
Inherited Retinal Diseases with Cone Involvement in  
the Israeli Population**

הריני מאשר את הנושא ואת התוכנית, ומסכים להדריך את המועמדת בביצוע עבודה זו.



## 1. תקציר המחקר

הרשתית הינה רקמה עיצבית שתפקידה לקלוט את קרני האור שחדרות מבעד לעדשה ולהפוך את הסיגנל לאות חשמלי שעובר למוח ויוצר את התמונה שאנחנו רואים. הרשתית מורכבת ממספר סוגי תאים האחראים על התהליך הביוכימי של הראייה, עיבוד ראשוני של המידע והעברת האותות שהתקבלו למח וחקלקם מהווים תאים תומכים. התאים המבצעים הינם ה-photoreceptors אשר קולטים את גל האור וממירים אותו לאות חשמלי. ברשתית ישנם שני סוגי פוטורצפטורים, ה-cones וה-rods. תאי ה-rods מכילים את פיגמנט הרודופסין ואחראים על ראיית הלילה. תאים אלו נמצאים בעיקר ברשתית ההיקפית ורגישים מאוד לאור, לכן בשעות היום או במצב שבו יש תאורה רבה התאים עוברים רוויה ואינם פעילים. ברשתית האנושית תאי ה-cones מתחלקים לשלושה סוגים, הכחולים האדומים והירוקים, כתלות בסוג הפיגמנט שהם מכילים, כאשר הצבע מייצג את אורך הגל שבו התא יגיב בצורה מירבית. תאי ה-cones אחראים על ראיית הצבעים שלנו ועל חדות הראיה. הם נמצאים בכל הרשתית בריכוז נמוך יחסית ובריכוז גבוה מאוד במרכז הראיה. אזור מרכז הראיה ממוקם בדיוק מול העדשה ובו מתרכזות רוב קרני האור שמגיעות לעין. אזור זה מכונה ה-macula כאשר במרכזו במקולה, נמצאת ה-fovea שמהווה אזור קטן בטוול תאי rods שאחראי על חדות הראיה. קבוצת המחלות התורשתיות של הרשתית הינה אחד הגורמים לעיוורון ומוגבלות ראייה בגיל הצעיר. באוכלוסיה הישראלית טרם בוצע מחקר מקיף שמטרתו לאפיין את הגנים הייחודיים לאוכלוסיה זו, שגורמים למחלות אלו. מטרת המחקר שלי הן:

1. איתור גנים חדשים המעורבים בתהליך הראיה. עד כה אותרו כ-200 לוקוסים וגנים בגנום האנושי שידועים כגורמים למחלות רשתית (retina international), ולמרות המאמצים הרבים עוד לא נמצאו כל הגנים. האוכלוסיה הישראלית מאופיינת בקהילות קטנות וסגורות ובאהוזים גבוהים של נישואי קרובים שמקנים יתרון למחקר גנטי בקרב האוכלוסיה.
2. לאפיין את הגנים הגורמים למחלות רשתית תורשתיות באוכלוסיה יהודית שלנו, כאשר המחקר שלי שם דגש על מחלות שמערבות את תאי ה-cones, בין אם בצורה בלעדית ובין אם רק בתחילת התהליך הפתולוגי.
3. לאפיין את החלבונים שנוצרים מהגנים שאיתרנו, על מנת להבין את המנגנונים הביוכימיים שעומדים בבסיס מנגנון הראיה והמנגנון הפתולוגי של המחלה והן ע"מ לאתר גנים נוספים שיכולים להיות קנדידטים כגורמים למחלות.

## 2. רקע

סקר גאלוף שבוצע בסוף המאה הקודמת ושמטרתו הייתה לבחון מה הן המחלות שאנשים בריאים תופסים כהרסניות ביותר, איבוד ראייה הגיע למקום השני, אחרי מחלת הסרטן<sup>24</sup>. חוש הראייה הוא החוש העיקרי שעליו סומכים בני האדם. תהליך הראייה מבוסס על האיבר הקולט, העין, שממיר את גלי האור לאות חשמלי שעובר למרכז הראייה במח בעזרת עצב הראייה. הרקמה האחראית להמרת גלי האור היא הרשתית שהינה רקמה עצבית המורכבת ממספר שכבות תאים, חלקם עיצביים וחלקם תאים תומכים. צפיפות התאים והיחס בין תאי הקולטנים (פוטורצפטורים) לתאי הגלגיון משתנה באזורי הרשתית השונים וקובע את חדות הראייה. הפוטורצפטורים הם תאים הרגישים לאור ומתחלקים לשני סוגים, ה-rods וה-cones. תאי ה-rods מכילים את פיגמנט הרודופסין ורגישים מאוד לכל גירוי ע"י אור ולכן אחראים על ראיית הלילה ואילו תאי ה-cones מכילים אחד משלושת הפיגמנטים (כחול, אדום וירוק) ולכן אחראים לראיית יום ואבחנה בין צבעים.

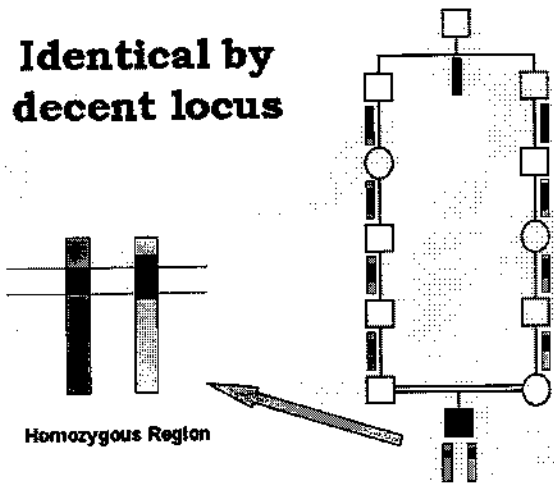
מרכז הרשתית מכיל אזור המכונה מקולה שהינו בעל חשיבות מכרעת לאיכות הראייה. אזור זה מכיל ריכוז גבוה של תאי פוטורצפטורים והיחס בינם לבין תאי הגלגיון הוא הגבוה ביותר ברשתית ולכן חדות הראייה באזור זה גבוהה פי 10 מחדות הראייה ברשתית ההיקפית. במרכז המקולה מצויה ה-fovea בה תאי cones בלבד, המצויים בצפיפות הגדולה פי 100 מצפיפות תאים אלו בהיקף הרשתית.

מחלות רשתית תורשתיות זו קבוצה מאוד הטרגית של פנוטיפים שניתן לסווג לתת קבוצות על פי מספר מאפיינים, כגון זמן הופעת הסימפטומים, אופן הורשה, או המנגנון הפתולוגי של המחלות. במחקר שלי בחרנו לשים דגש על מחלות לפי סוג התא הנפגע ואופן ההורשה שלהן. המחקר שלי מתמקד במחלות הפוגעות בתאי ה-cones בלבד או תחילה בתאים אלו ורק מאוחר יותר בתאי ה-rods ובעלות אופן הורשה אוטוזומלי רצסיבי.

מחלות ה-cones מתחלקות לשתי קבוצות עיקריות: מחלות פרוגרסיביות<sup>1</sup> כגון מחלת סטרגרדט (Stargardt) וניון cones>rods (CRD) ומחלות סטטיות כגון אכרומטופסיה. המחלה הנפוצה ביותר בקרב המחלות הללו היא מחלת הסטרגרדט, שנגרמת ע"י מוטציות בגן ABCA4<sup>2</sup>. מוטציות בגן זה מסבירות כ-80-30% מכלל המקרים<sup>3</sup>, הסיבה לכך יכולה להיות משום שהסריקה אינה מלאה והמוטציות מתחבאות באזורים שלא נסקרו או משום שיתכן ויש גנים נוספים שגורמים למחלה. חשוב לציין שעד לתחילת מחקר זה, גן ה-ABCA4 הוא הגן היחיד שגורם למחלת ה-arCRD, ומסביר בין 30-60% מהמקרים<sup>4,5</sup>. ההנחה לכן היא ש-ABCA4 הוא לא הגן היחיד הגורם למחלת ה-CRD, ומספר לוקוסים נוספים דווחו בעבר<sup>3,6,7</sup>. לעיתים קיים קושי באבחון קליני מדויק של המחלה עקב מחלות עם מופע קליני דומה, כמו במקרה של מחלת האכרומטופסיה ומחלת ה-cone dystrophy.

נכון להיום, כ-200 לוקוסים וגנים שונים אותרו כגורמים למחלות רשתית<sup>25</sup>, בעלי כל אופני ההורשה. ריבוי הגנים הקושי להגיע לאבחנה חד-משמעית במקרים רבים בגלל חפיפה מקשים על איתור הגן האחראי למחלה. השיטה העיקרית לאיתור גנים גורמי מחלות באוכלוסייה הישראלית הינה מיפוי הומוזיגוטי<sup>8</sup> (homozygosity mapping). שיטה זו הינה כלי יעיל במיוחד בקרב האוכלוסיות שנמצאות הארץ וזאת בשל ריבוי נישואי קרובים<sup>9,10</sup>. בבסיס השיטה עומד העיקרון שבחולים הלוקים במחלות אוטוזומליות רצסיביות והם תוצאה של נישואי קרובים קיים סיכוי רב לכך שהמקור של הלוקוס שמכיל את האלל הפגום או

### Identical by decent locus



המוטציה הוא באב קדום יחיד – Identical by decent locus (IBD), ראה איור מס' 1.

אזור ה-IBD יהיה הומוזיגוטי בחולה כפי שמוצג באיור משמאל ולכן סביר להניח שבלוקוס מסוג זה יופיע הגן הגורם למחלה.

מתוך מאגר של כ-800 משפחות שבהן יש מחלת רשתית וגוייסו למחקר הגנטי במעבדתנו, 201 הן משפחות שבהן המחלה מערבת

**איור מס' 1: תיאוריית ה-IBD.** הכרומוזום שמכיל את הגן שגורם למחלה מורש משני ההורים לאחר שעבר שבירות ע"י רקומבינציות לאורך הדורות ולבסוף רק תלק קטן ממנו יהיה הומוזיגוטי בחולה.

בעיקר את תאי ה-cones, ב-144 משפחות מתוכן דרך ההורשה

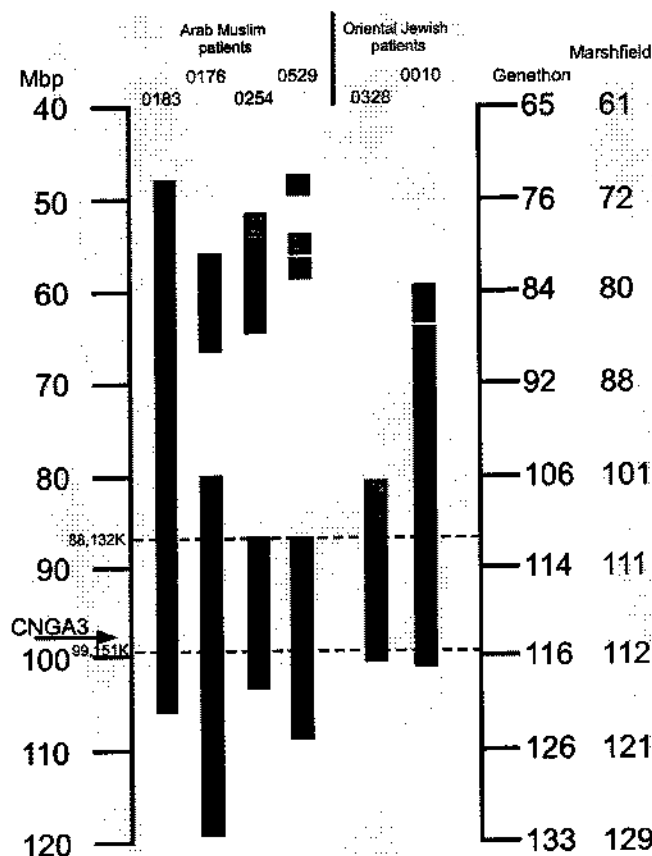
משוערת כאוטוזומלית רצסיבית. מתוך אלו 95 (כ-66%) הן משפחות שבהן ידוע על קרבת משפחה, וב-66 משפחות (כ-70%) ההורים הם בני דודים ראשונים.

### 3. תוצאות ראשוניות

הגנטיקה של מחלת האכרומטופסיה באוכלוסייה הישראלית – אכרומטופסיה הינה מחלת עיניים המורשת באופן אוטוזומלי רצסיבי וגורמת לפגיעה קשה ומולדת בחדות הראייה, עיוורון צבעים, פוטופוביה וככלל לא מלווה בממצאים בקרקעית העין. נכון להיום המחלה נגרמת ע"י מוטציות בשלושה גנים *CNGA3*, *CNGB3* ו-*GNAT2*<sup>11</sup>. שלושת הגנים מבטאים חלבונים שמעורבים בתהליך ה-*phototransduction* ויחודיים לתאי ה-cones ולכן הפגיעה במחלה זו היא בתאים אלו בלבד. הגן המרכזי למחלה זו באוכלוסייה המערבית הוא ה-*CNGB3* בעיקר עקב מוטציה אחת, *c.1148delC*, הנפוצה ביותר בכל האוכלוסיות שנבדקו עד כה<sup>3</sup>. בכדי לחקור את הגנטיקה של המחלה באוכלוסייה הישראלית, גויסו למחקר 13 משפחות עם אכרומטופסיה, 16 משפחות עם *CRD/CD* (נבדקו גם חולים עם אבחנה שאינה אכרומטופסיה בשל הקושי לאבחן את המחלה באופן חד משמעי). בניגוד לממצאים באוכלוסיות אחרות בעולם הגורם המרכזי למחלה באוכלוסייה הישראלית הוא הגן *CNGA3*. מתוך כלל החולים במאגר החולים שלנו שאבחנתם היא אכרומטופסיה (31) הצלחנו לאתר את גורם המחלה ב-28 חולים, כאשר כ-89% מהחולים נמצאה מוטציה בגן

CNGA3. במסגרת המחקר איתרנו 10 מוטציות בגן CNGA3 מתוכן 2 חדשות: המוטציה c.126\_147dup22 אותרה בשתי משפחות מוסלמיות ללא קשר משפחתי, והמוטציה delG@D432 אותרה במשפחה יהודית. שתי מוטציות היו נפוצות במיוחד: המוטציה delATC@I314 נמצאה בקרב 9 משפחות מוסלמיות עם אותו שם משפחה אבל ללא קרבה ידועה בין המשפחות השונות. מוטציה נוספת, c.1585G>A, נמצאה ב-9 משפחות משני מוצאים שונים, מוסלמים מאזור מזרח ירושלים ויהודים ממוצא מזרחי (איראן, עירק, כורדיסטאן).

המוטציה c.1585G>A דווחה בעבר במספר מצומצם של חולים<sup>12</sup>. היא אותרה בשלוש משפחות ממוצא אירופאי ושתי משפחות אמריקאיות. במחקר שלנו שכיחות המוטציה בקרב חולי האכרומוטופסיה הייתה גבוהה מאוד וכמו שציניתי היא הופיעה בחולים ממוצאים אתניים שונים. מוטציות שמשותפות אך ורק ליהודים ומוסלמים לא דווחו עד כה בספרות למרות שמחקרים על DNA מיטוכונדריאלי וסמנים על כרומוזום Y הראו ששתי הקבוצות הללו קרובות מבחינה גנטית<sup>13-15</sup>. אנחנו בחרנו להתמקד במוטציה זו ולנסות להבין האם מדובר במוטציית מייסד פן-אתנית או



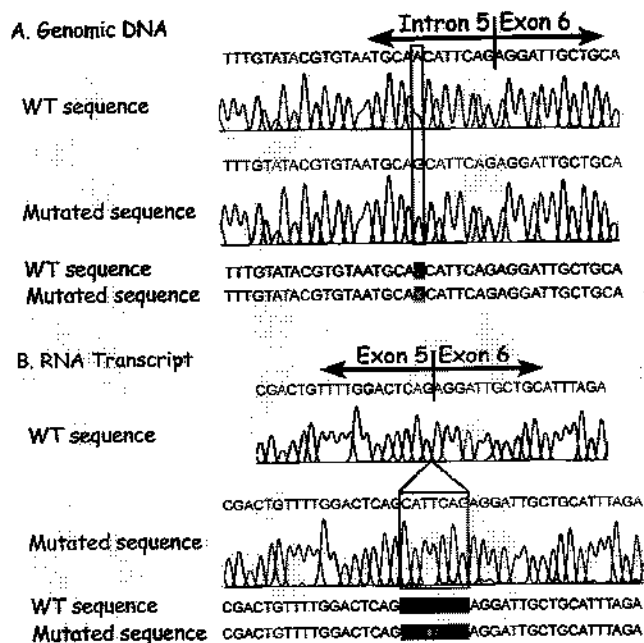
שמדובר במוטציה יהודית שמשותפת ליהודים ולמוסלמים. לצורך כך בנינו הפלוטיפ של שלושה SNP שנמצאים בתוך הגן בחולים ממוצא יהודי, מוסלמי ואירופאי הנושאים את המוטציה. להפתעתנו גילינו כי לכל החולים היהודים והמוסלמים שנשאו את המוטציה c.1585G>A היה הפלוטיפ זהה ושונה מההפלוטיפים שנראה במשפחות האירופאיות. בכדי לאמת תוצאה זו ולבצע מחקר מעמיק יותר, ביצענו סריקה נרחבת יותר של הלוקוס ע"י ביצוע של Whole genome SNP arrays של 250K סמנים בחולים ההומוזיגוטים למוטציה. אנליזה זו הראתה שלכל החולים היהודים והמוסלמים שנושאים מוטציה זו יש אזור הומוזיגוטי משותף בגודל של כ-

**איור מס' 2:** לוקוס הומוזיגוטי בחולי אכרומוטופסיה נושא המוטציה c.1585G>A. החלק המשותף לחולים היהודים והמוסלמים מסומן ע"י קו מקווקו ומיקום הגן CNGA3 מסומן ע"י חץ.

11Mbp (ראה איור מס' 2). אזור זה גדול מהצפוי בעבור מוטציית founder המשותפת לשתי אוכלוסיות שנפרדו אחת מהשנייה לפני אלפי שנה. בהינתן שהזמן שעבר מאז הפיצול הוא 2000-4000 שנה גודל האזור המשותף הצפוי הוא 0.313-0.625cM (מחושב ע"פ מס' המיחות  $X=100$ , כאשר זמן דור נחשב כ-25 שנה). הסיבה העיקרית לכך שהאזור הפיזי שהתקבל הוא גדול, היא סמיכות הגן לצנטרומר של כרומוזום 2 ולכן האזור ההומוזיגוטי כולל את הגן

וכן את הצנמטרומר שלא עובר רקומבינציה. בשלב הבא ביקשנו לנסות לתארך את גיל המוטציה היות וכעת נראה שמדובר למעשה במוטצית founder. לצורך כך בחרנו 9 מיקרוסטליטים סביב הגן וקבענו את גודל האללים של כל אחד מהסמנים בחולים ו-42 ביקורות מהמוצא המתאים. נתונים אלו הוכנסו לתוכנת ה-DMLE<sup>16</sup> שבצורתה נקבע גיל המוטציה. התוצאה הראתה כי, בממוצע, עברו 210 דורות (95% CI of 130-280) מהרגע שהופיעה המוטציה לראשונה, כלומר בערך 5,250 שנה. הנתונים שהוצגו בפסקה זו נשלחו לפרסום בעיתון *European Journal of Human Genetics*.

איתור הגן ADAM9 כגורם חדש למחלת רשתית – בעזרת homozygosity mapping שביצעתי על משפחות עם CD או CRD הצלחתי לאתר שתי משפחות (MOL0277 משפחה מוסלמית ו-MOL0172 משפחה יהודית ממוצא טוניסאי) שאחד מעשרת האזורים הכי גדולים שלהם נופל על הלוקוס CORD9. לוקוס זה היה ידוע כמעורב במחלת ה-CRD משנת 2001. בחינה של הגנים שנמצאים בלוקוס כפי שהוגדר מחדש ע"י האנליזה שביצענו הצביעה על כמה גנים קנדידיטים. הגנים HTRA4 ו- PLEKHA2 נסרקו לשינויים פתולוגיים ונשללו לאחר שלא אותרו כאלה. הגן הבא המועמד לסריקה היה הגן ADAM9. תוצאות אלו הוצגו בכנס המרכזי בנושא חקר הראיה ARVO2008 ובעקבות זה התחלנו שיתוף פעולה עם מעבדה בבריטניה שאיתרה במחקר מקביל מוטציות בגן זה בשתי משפחות אחרות. סריקת



**צילום 3: המוטציה c.411-8 A>G שאותרה במשפחה MOL0277.**  
 A. כרומוסוגרמה שמציגה את רצף ה-DNA של החולה מול ה-WT. B. ריצוף התוצר ברמת ה-RNA וההשפעה של המוטציה על רצף ה-RNA.

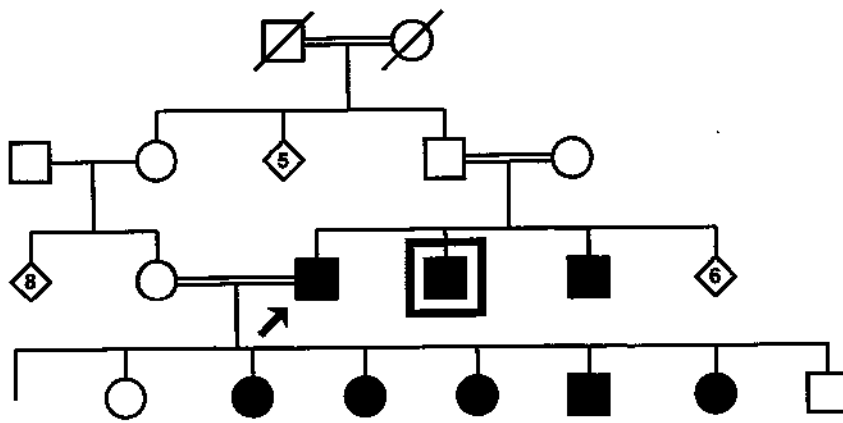
הגן למוטציות במשפחות שלנו הובילה לאיתור של שינויים באקסון 6 בשתי המשפחות. במשפחה MOL0172 נמצא שינוי של חומצת אמינו ארגנין לקודון stop. במשפחה MOL0277 נמצא שינוי באינטרון שלפני האקסון. שימוש בתוכנות הבדקות אתרי שחבור הראה כי השינוי יכול לגרום ליצירת אתר splicing חדש שיגרום להתארכות האקסון ב-7bp ובעקבות כך ייווצר frame shift ו-stop קודון מוקדם. בכדי לבדוק השערה זו, הפקתי RNA מהדם הפריפרי של החולים בעזרת קיט מיוהד שנקרא PaxGENE וביצעתי RT-PCR וריצוף תוצרי ה-PCR. בדיקה זו אכן הראתה כי ההשערה הייתה נכונה כפי שמוצג

באיור 3.

נתונים אלו פרסמו לא מכבר במאמר *Loss of the metalloprotease ADAM9 leads to cone-rod dystrophy*

in humans and retinal degeneration in mice, <sup>17</sup>AJHG, בעיתון

**ABCA4** – הגן ABCA4 הוא הגן היחיד שידוע כגורם למחלת סטרגרט המורשת באופן אוטוזומלי רצסיבי וידוע גם כמעורב ב-arRP-1 arCRD. אנחנו בדקנו עד כמה הגן הנ"ל נפוץ בקרב החולים שלנו. מצאנו שמוטציות בגן זה מהוות את הגורם העיקרי לכלל מחלות הרשתית התורשתיות: מתוך 169 משפחות שבהן נמצא הגן הגורם למחלה במעבדתנו, ABCA4 הוא הגורם למחלה ב-39 (23%) מהמשפחות. המוטציה הנפוצה ביותר בגן זה הינה G1961E שנמצאה ב-26 משפחות, 5 מתוכן במצב הומוזיגוטי. נתונים אלו מצביעים על שכיחות גבוהה של המוטציה בקרב האוכלוסייה שלנו, גבוהה בהרבה בהשוואה למחקרים שבוצעו באוכלוסיות אחרות. בעקבות זאת בדקנו מה היא שכיחות הנשאים למוטציה זו בקרב ביקורות משלוש עדות שונות, אשכנזים, מזרחים ויוצאי צפון אפריקה. בכל העדות שכיחות הנשאים התגלתה כ-1/18. בהנתן שכיחות נשאים זו צריכים להיות בארץ אלפי חולי STGD הומוזיגוטים למוטציה. נתון זה מעלה תהיות לגבי ההשפעה של שינוי זה על פעילות החלבון והאם אכן מדובר במוטציה. מחקרים קודמים ברמת החלבון (בדיקות תפקוד) הראו כי אכן לשינוי זה יש השפעה על תפקוד החלבון<sup>18</sup>. כלומר לא מדובר בפולימורפיזם. אך העדר חולים הומוזיגוטים למוטציה זו ברחבי העולם והשכיחות הגבוהה של המוטציה שהתגלתה במחקר שלנו מצביעים על כך שיתכן שהומוזיגוטיזציה למוטציה זו אינה גורמת למחלה. אם אכן זה המצב מה קורה לאנשים שהומוזיגוטים למוטציה זו? האם יתכן שהם נושאים מוטציה נוספת? או אולי מדובר במנגנון אחר? סרקנו שני חולים הומוזיגוטים לשינויים נוספים בגן ABCA4 אולם שום שינוי פתוגני אחר לא התגלה.



איור מס' 4: עץ המשפחה של משפחה של משפחה MOL0020. indexed patient (האב בטקסט) מסימן בן, האח החולה שעליו בוצע SNP array מסומן בריבוע. הפרטים החולים מיוצגים ע"י סמל שחור ואילו הפרטים הבריאים מיוצגים ע"י סמלים לבנים.

איתור פנוטיפ חדש לגן ידוע – כפי שצינתי קודם במאגר החולים שלנו ישנן משפחות רבות שבהן ידוע על קרבת משפחה בין ההורים, כאשר מידת הקרבה הנפוצה ביותר היא בני דודים מדרגה ראשונה. משפחות מסוג זה מתאימות לאיתור של גנים חדשים או הרחבה של הידוע לנו על

גנים שכבר דווחו בעבר. בחרתי להציג שני מקרים שמדגימים את הקושי העומד בפנינו כאשר אנחנו מנסים לאתר את הגורם הגנטי במשפחות שלנו.

**משפחה MOL0020:** משפחה זו הופנתה למעבדה בעקבות האבחנה של atypical CRD. לאחר שנשלל הגן ABCA4 שהוא הגן המרכזי ל-arCRD נכון להיום, התחלנו בחיפוש של גן אחר (חדש) שהוא המקור למחלה במשפחה. המבנה של המשפחה מתאים לאופן הורשה פסאודו דומיננטי, עם ריבוי נישואי קרובים (איור מספר 4).

במשפחה זו ביצענו מספר רב של whole genome SNP arrays היות ובכל אנליזה קיבלנו מידע חלקי בלבד. לבסוף ביצענו 7 SNP arrays מתוכם חמישה חולים ושני פרטים בריאים. על סדרה זו של arrays ביצענו אנליזה במטרה לאתר אזורים הומוזיגוטים בין כל החולים שלא יופיעו בפרטים הבריאים של המשפחה. לא הצלחנו לאתר לוקוס כזה, אבל הצלחנו למצוא אזור הומוזיגוטי גדול שעובר סגרגציה מלאה במשפחה הגרעינית ומכיל את הגן RDH12, שידוע כגורם ל-LCA<sup>19</sup>. אך כאשר בדקנו את הלוקוס בנתונים של האח החולה של האב ראינו כי הוא הומוזיגוט לאלל ששונה מזה המופיע אצל אחיו. בכל זאת בחרנו לסרוק את הגן לשינויים היות ולא היו בידינו שום נתונים קליניים לגבי מחלתו של האח ולמעשה הוא מעולם לא נבדק במחלקה שלנו. סריקה של הגן הראתה כי באקסון 2 שלו נמצאה מוטציה שדווחה בעבר במצב הטרוזיגוטי בחולה עם RP. המוטציה עוברת סגרגציה במשפחה הגרעינית אבל לא מופיע כלל באח החולה של האב (כפי שצפוי היה על סמך התוצאות של ה-SNP array). אנחנו מאמינים כי למעשה מדובר בבלבול בנתונים שנמסרו בראיון המקורי עם היועצת הגנטית, וכי למעשה האח אינו חולה כלל או חולה במחלה אחרת. דבר שאפשרי בהתחשב בכך שמדובר במשפחה עם הרבה דורות של נישואי קרובים.

**משפחה MOL0256:** משפחה נוספת שמדגימה את הקושי שתומן בחובו מחקר גנטי של מחלות הרשתית היא משפחה מס' 256. זו משפחה שהגיעה למעבדתנו עם אבחנה של ESCS. זו מחלה התפתחותית של הרשתית שבה כמעט ולא מתפתחים תאי cones שמכילים פיגמנט אדום או ירוק, ורוב תאי ה-cones ברשתית מכילים את הפיגמנט הכחול. הגן המרכזי שגורם למחלה הינו NR2E3 והוא נסרק ונשלל, כמו גם גנים נוספים שחשודים כגורמים למחלה. לאחר מכן שונתה האבחנה של המשפחה למחלת ה-RP ולבסוף רופאי העיניים החליטו שמדובר במחלת atypical CRD. על ה-DNA של המשפחה בוצע whole genome 10K SNP array, והאנליזה של התוצאות הראתה כי אחד האזורים ההומוזיגוטים הגדולים של המשפחה מכיל את הגן PROM1. גן זה דווח לא מכבר כגן הגורם ל-retinal degeneration אבל עד כה לא דווח כגן הגורם ל-CRD<sup>20</sup>. אנחנו סרקנו את הגן ומצאנו באקסון 11 שינוי מסוג nonsense, כלומר החלפה של נוקליאוטיד שיוצרת stop codon לפני הזמן ולכן או שלא נוצר חלבון כלל או שנוצר חלבון מקוצר ולכן סביר להניח שפעילותו תפגע.

לסיכום, בחלק זה של העבודה איתרנו מוטציות הגורמות ל-CRD בשני גנים שידועים כגורמי מחלות רשתית אחרות.

#### 4. מטרות המחקר והשלכותיהן/משמעותן

מטרתו העיקרית של מחקר זה הינה איתור הגנים הגורמים למחלות רשתית שבהן ישנה פגיעה משמעותית או בלעדית בתאי ה-cones. כמו כן היות והאוכלוסיה הישראלית לא נחקרה לעומק מבחינת המאפיינים הגנטיים שלה בהקשר של מחלות רשתית אנחנו רוצים גם לאפיין את הגנים העיקריים באוכלוסיה זו כולל תת האוכלוסיות הרבות שיש בה.



**מטרה 1.** איתור גנים חדשים המעורבים במחלות רשתית תורשתיות בדגש על מחלות המערבות cones.  
**מטרה 2.** איתור ואיפיון הגורמים העיקריים למחלות רשתית באוכלוסיה הישראלית. איתור המוטציות הנפוצות באוכלוסיות השונות יתבצע בכמה שלבים, תחילה איתור הגן המתאים ע"פ האבחנה במידה וניתן, ולאחר מכן סריקה של הגן או הגנים המתאימים לשינויים בעזרת ריצוף של תוצר PCR או ע"י חיתוך אנזימטי. בניה של מאגר נתונים מסוג זה יאפשר יעוץ גנטי יעיל ונוח למשפחות החולים.

**מטרה 3.** לאחר שהצלחנו למצוא גנים חדשים יש צורך לאפיין את החלבונים הנוצרים מגנים אלו ע"ל מנת להבין את מנגנון האחראי לראיה וכן ככלי לאיתור גנים נוספים ע"פ החלבונים שעוברים אינטראקציה עם חלבונים ידועים. איתור גנים חדשים יכול לעזור לנו להבין את אופן הפעולה של הרשתית, ואופן היצירה וההתפתחות של הרשתית. נוכל לנסות להבין את רשת האינטראקציות החלבוניות שקיימת ברקמה יחודית זו, ואולי אף פיתוח פיתרונות טיפוליים לאנשים שלוקים במחלות רשתית ושכיום אין בנמצא טיפול הולם או ממשי לאנשים אלו.

## 5. תוכנית המחקר

**מטרות 1+2.** גנים חדשים המעורבים במחלות רשתית תורשתיות בדגש על מחלות המערבות cones. היות ובעולם תחום המחקר הזה אינו חדש נבנה כבר מאגר נתונים גדול שמכיל לוקוסים וגנים שידועים במעורבים במחלות אלו. על מנת לאתר גנים חדשים יש צורך לבצע מספר שלבים:

**שלב א':** סריקה של החולים למוטציות הידועות כגורמות מחלות אלו. אחד הגנים המרכזיים הגורם למחלת ה-STGD וכן ל-CRD הוא הגן ABCA4. חברת ASPER האסטונית יצרה chip שבוערתו ניתן לסרוק חולה מסויים לכלל המוטציות הידועות בגן זה נכון להיום<sup>21</sup>. בפועל לאוכלוסיה שלנו שיעור גילוי המוטציות הוא נמוך מאוד, בפחות מ-44% מהמקרים ה-chip הצליח לאתר מוטציה בפרט חולה (17/39) לכן זאת אפשרות שקיימת אם כי לא מאוד פרקטית עבור האוכלוסיה שלנו בהתחשב בעלותה.

במקרים מסויימים, ניתן להשתמש בממצאים הקלינים לבחירת גן קנדידט למחלה או אף מוטציה מסויימת. דוגמה טובה לכך היא אבחנה חד משמעית של אכרומוטופסיה בשילוב עם מוצא יהודי מאזור עירק. בעקבות המחקר שביצעתי עד כה ומוצג בתוצאות הראשוניות, ניתן להתמקד במקרים אלו על מוטציה יחידה הנפוצה באוכלוסייה זו. במקרים בהם לא זוהה הגן בשלב א', אבצע מיפוי הומוזיגוט במשפחות עם נשואי קרובים כמתואר בשלב ב'.

**שלב ב':** ביצוע אנליזות homozygosity mapping על החולים שבהם ידוע על קרבת משפחה בין ההורים. כפי שצינתי, בכ-66% מכלל החולים במחלות cones אוטוזומליות רצסיביות באוכלוסיה הישראלית ידוע על קרבת משפחה בין ההורים. לאחר ביצוע whole genome SNP array אני אבצע חיפוש לאזורים הומוזיגוטים (בהתאם

לתיאוריית ה-IDB שהזכרתי קודם). אזורים הומוזיגוטים ניתן להגדיר בשלושה אופנים: ע"פ מספר סמנים הומוזיגוטים ברצף, אזור בעל גודל פיזי של מעל ל-X Mbp ו/או אזור בעל גודל של יותר מ-X cM. בהתאם לסוג ה-array והאופן שבו אני מבצעת את האנליזה, אקבע איך אני מגדירה אזור הומוזיגוטי. ב-array שמכיל כ-10K סמנים אני מבצעת את האנליזה עזרת סדרת פונקציות שמאוגדות תחת השם ExcludeAR, כאשר התוצאה המתקבלת מסתמכת על גודל האזור ההומוזיגוטי ב-cM. ב-array של 250K האנליזה מבוצעת ע"י כתיבה של פונקציות באקסל ומתבססת תחילה על מספר הסמנים ההומוזיגוטים המופיעים ברצף ומאוחר יותר מתווסף השיקול של גודל האזור. למרות ששני ה-arrays הם whole genome הפיזור של הסמנים לאורך הגנום אינו אחיד ולכן חייבים להתחשב גם בגודל האזור, בין אם הוא גנטי ובין אם הוא פיזי. במידה וקיימת אפשרות, עדיף לעשות את ה-arrays על יותר מבן משפחה אחד, אך אפשרות אחרת היא לאחר איתור אזור מעניין לבצע בדיקת סגרגציה לאזור ע"י בחירה של מספר מייצג של SNP בתוך האזור ובדיקה על בני משפחה נוספים או שימוש ב-array עם רזולוציה גבוהה יותר (מספר גבוה יותר של SNP) על מנת לנסות למפות בצורה טובה יותר או להקטין את האזור שאותר באנליזה הראשונית.

במסגרת שלבים אלו אנו בונים כעת פרויקט חדש והוא אנליזה עדתית. כחלק מה-homozygosity mapping ביצעתי סריקה לאזורים הומוזיגוטיים ב-72 חולים מ-61 משפחות עם מחלות cones. ב-16.4% (10/61) מהמשפחות איתרתי את הגן הגורם למחלה, ובכ-31% האנליזה מצביעה על גן חשוד שכבר ידוע כגורם למחלה המתאימה. בשאר המשפחות (32) ערכתי אנליזה לאיזורים הומוזיגוטיים ובסיסי הנתונים הזה ישמש אותי בהמשך המחקר כפי שיתואר בהמשך. את שלושים ושתיים המשפחות שבהן אין אינדיקציה לגן ספציפי ניתן לחלק לקבוצות לפי אבחנות דומות, ולבצע אנליזה רוחבית על פי המוצא של המשפחות השונות. ריבוי נישואי קרובים וכן נישואים תוך עדתיים מגדילים את הסיכוי לכך שמספר מצומצם של מוטציות יהיה נפוץ בקרב האוכלוסייה ולכן ניתן לעשות אנליזה מסוג זה בניסיון למצוא את הגנים המעורבים במחלת הרשתית. כמו כן באופן זה ניתן לחפש אזורים הומוזיגוטים חופפים בין חולים שונים גם כאשר אין זהות בגנוטיפ אלא רק במיקום הלוקוס. שיטה זאת יכולה להיות יעילה במידה ומדובר במשפחות ממוצאים שונים ויכולה לעזור לאתר לוקוסים חדשים או לצמצם לוקוסים ידועים לגודל שאפשר לעבוד איתו כמו שעשינו במקרה של CORD9.

שלב ג': לאחר שאיתרתי את עשרת האזורים ההומוזיגוטים הגדולים ביותר אני יוצרת בעזרת בסיסי הנתונים שקיימים online רשימות של גנים שנמצאים בתוך האזורים שמצאתי. במידה ובאחד האזורים נמצא גן שידוע כגורם למחלת רשתית הוא יסרק ראשון. במידה ואין גן כזה או לחילופין הגן נסרק ולא נמצאו שינויים פתוגנים יש צורך לחזור לרשימה המקורית ולנסות לאתר גן קנדידט מתוך הרשימה שיצרנו. גן קנדידט יבחר ע"פ:

א. התיפקוד של החלבון המקודד מהגן, או שיוך למשפחה שידועה כבעלת תפקיד רלוונטי לעין.

ב. ביטוי ברקמת העין או רקמות נוירונליות.

ג. אינטראקציות של החלבון עם חלבונים אחרים, ביחוד כאלה שידועים כבעלי תפקיד בעין.

הגן המתאים ביותר יסרק לשינויים ע"י ריצוף. במידה והצלחנו לאתר שינוי יש צורך לבחון האם השינוי יכול

להיות פתוגני במידה ולא אותרו שינויים חוזרים לרשימה ומחפשים גן קנדידט חדש.

כאשר מאתרים שינוי צריך להוכיח כי מדובר בשינוי פתוגני ולא פולימורפיזם. על מנת לעשות זאת ננקוט בכמה שלבים:

**שלב ד':** מהות השינוי. במידה ומדובר בשינוי היוצר stop codon לפני הזמן או במידה והשינוי גורם להסטה של מסגרת הקריאה של הגן (ע"י החסרה או הוספה של נוקלאוטידים) ניתן להניח כי מדובר בשינוי פתוגני היות ולרוב שינויים מסוג זה יוצרים חלבון קטוע ועל כן פגוע באופן תיפקודו או לא יוצרים חלבון כלל בשל מנגנון ה-nonsense mediated decay שנמצא בתא. שינוי מסוג missense הינו שינוי שגורם להחלפה של חומצת אמינו אחת באחרת, לעיתים להחלפה מסוג זה יש השפעה דרמטית על התוצר החלבוני הסופי ולעיתים זה יכול להיות חסר השפעה. כדי לבדוק האם מדובר במוטציה או פולימורפיזם ניתן לעשות:

i. המיקום של השינוי ביחס לדומיינים בחלבון, שינוי שנמצא בדומיין כגון אתר פעילות אנזימית או אתר

קישור לחלבון אחר יכול להיות בעל משמעות כבדה יותר.

ii. בדיקה האם השינוי עובר סרגציה במשפחה.

iii. במידה וניתן, השוואה למינים אחרים ובדיקה של ביקורות.

3. מטרה 3. איפיון החלבון הנוצר מגן שמעורב במחלת רשתית. בסעיף הקודם הזכרתי מספר דרכים ע"מ לבחון האם שינוי מסויים הוא אכן מוטציה או שמא מדובר בפולימורפיזם. למרות שהתנאים שציינתי קודם מעלים את הסבירות כי מדובר בשינוי פתוגני הדרך היחידה להראות כי אכן מדובר במוטציה היא לבדוק האם שינוי זה יכול להשפיע על החלבון. ניתן לבחון האם שינוי זה משנה קונפורמציה של החלבון במידה וידוע מה המבנה של החלבון. כמו כן ניתן לבחון האם קיימת מערכת ניסויית שמטרתה לבדוק את תפקוד החלבון. במקרה של הגן ADAM9 אנחנו בדיוק נמצאים בשלב זה של המחקר. אנחנו מתכוונים להמשיך ולחקור את החלבון המקודד מהגן הנ"ל. ידוע שהחלבון הוא מטאלופורטאז שמקובע לממברנה הציטופלסמטית ויתכן ויש לו תפקיד בעיצוב מחדש ושינוי של ה-ECM. ידועים מספר חלבונים שעוברים אינטראקציה עם החלבון מצידו החוץ תאי כמו למשל האינטגרונים והלמינין. אנחנו מעוניינים למצוא את החלבונים איתם עובר החלבון אינטראקציה בצידו התוך תאי. לשם כך ניתן לנסות לבצע ניסוי כדוגמת ה-

yeast two hybrid system. וריאציה של מערכת מסוג זה פותחה במיוחד כדי למצוא חלבונים שעוברים אינטראקציה עם חלבונים ממברנלים, היא נקראת Ras-recruitment system (RRS)<sup>22,23</sup>.

איתור החלבונים שעוברים אינטראקציה עם החלבון שלנו מספק לנו שתי תת מטרות:

א. איתור חלבונים/גנים חדשים נוספים שיכולים להיות מעורבים במחלות רשתית.

ב. הבנה של המנגנון המולקולרי של תפקוד הרשתית ומה מהות הפגיעה שמהווה את המנגנון של המחלה.

## 6. חומרים ושיטות

1. הפקות DNA מדם פריפרי – נעשה ע"י קיט מסחרי של חברת Qiagen (cat#51204) לפי פרוטוקול החברה.
2. הפקת RNA מדם פריפרי – נעשה ע"י קיט מסחרי של חברת PreAnalytix (cat#762132), לפי פרוטוקול החברה.
3. פריימרים – הפריימרים תוכנו באמצעות התוכנה Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). ריכוז עבודה של 20pmol/ul. לאנליזה של Microsatellites הוזמנו פריימרים מיוחדים בהם קצה 5' היה סימון פלורוסנטי בצבע או של FAM או של HEX.
4. PCR – ריאקציית ה-PCR נעשתה בעזרת ready-mix של חברת Thermo (cat#AB-0575).
5. Microsatellites – בעזרת הפריימרים המיוחדים בוצעה ריאקציית PCR רגילה ותוצרי ה-PCR הורצו במכשיר ה-ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. התוצאות נותחו ע"י תוכנת Peak Scanner™ Software v1.0, שניהם תוצרת חברת Applied Biosystems Inc.
6. DNA - Whole genome SNP arrays גנומי בריכוז של  $\geq 50\text{ng/ul}$  נשלח להיברידיזציה ל-chips של חברת Affymetrix. ההיברידיזציה בוצעה על שלושה סוגי chis של 10K, 50K ו-250K סמנים. ההיברידיזציה של מערכי ה-10K נעשתה במעבדה בראשותו של Dr. Tim Strom בגרמניה. ההיברידיזציה של מערכי ה-50K וחלק ממערכי ה-250K בוצעו במכון ויצמן. יתר מערכי ה-250K נעשו במחלקה לגנטיקה של האדם, בית חולים הדסה עין-כרם. התוצאות נותחו באמצעות כלי ניתוח של SNP arrays בשם ExcludeAR ואנליזות נוספות ב-Excel.
7. ריצוף גנים וסריקתם - תוצרי ה-PCR נשלחו לריצוף בחברת Macrogen הקוריאנית בה מתבצע הריצוף באמצעות המכשיר 3730xl DNA analyzer. הרצפים שהתקבלו נותחו באמצעות חבילת התוכנות Staden Package.
8. תוכנת DMLE+(2.2) - תוכנה באמצעותה חושב גיל המוטציה בגן CNGA3.

## References

1. Merin, S. *Inherited Eye Diseases, Diagnosis and Management*, (Taylor & Francis, Boca Raton, 2005).
2. Allikmets, R. et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* **15**, 236-46 (1997).
3. Wissinger, B., Kohl, S., Langenbeck, U. *Genetics in Ophthalmology*, (Karger, Basel, 2003).
4. Maugeri, A. et al. Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* **67**, 960-6 (2000).
5. Hamel, C.P. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 7 (2007).
6. Danciger, M. et al. *CORD9* a new locus for arCRD: mapping to 8p11, estimation of frequency, evaluation of a candidate gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2458-65 (2001).
7. Khaliq, S. et al. Novel locus for autosomal recessive cone-rod dystrophy *CORD8* mapping to chromosome 1q12-Q24. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3709-12 (2000).
8. Sheffield, V.C., Nishimura, D.Y. & Stone, E.M. Novel approaches to linkage mapping. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 335-41 (1995).
9. Jaber, L., Bailey-Wilson, J.E., Haj-Yehia, M., Hernandez, J. & Shohat, M. Consanguineous matings in an Israeli-Arab community. *Arch Pediatr Adolesc Med* **148**, 412-5 (1994).
10. Zlotogora, J. What is the birth defect risk associated with consanguineous marriages? *Am J Med Genet* **109**, 70-1 (2002).
11. Kohl, S. et al. Mutations in the cone photoreceptor G-protein alpha-subunit gene *GNAT2* in patients with achromatopsia. *Am J Hum Genet* **71**, 422-5 (2002).
12. Wissinger, B. et al. *CNGA3* mutations in hereditary cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet* **69**, 722-37 (2001).
13. Nebel, A. et al. The Y chromosome pool of Jews as part of the genetic landscape of the Middle East. *Am J Hum Genet* **69**, 1095-112 (2001).

14. Nebel, A. et al. High-resolution Y chromosome haplotypes of Israeli and Palestinian Arabs reveal geographic substructure and substantial overlap with haplotypes of Jews. *Hum Genet* **107**, 630-41 (2000).
15. Bonne-Tamir, B., Johnson, M.J., Natali, A., Wallace, D.C. & Cavalli-Sforza, L.L. Human mitochondrial DNA types in two Israeli populations--a comparative study at the DNA level. *Am J Hum Genet* **38**, 341-51 (1986).
16. Reeve, J.P. & Rannala, B. DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics* **18**, 894-5 (2002).
17. Parry, D.A. et al. Loss of the metalloprotease ADAM9 leads to cone-rod dystrophy in humans and retinal degeneration in mice. *Am J Hum Genet* **84**, 683-91 (2009).
18. Sun, H., Smallwood, P.M. & Nathans, J. Biochemical defects in ABCR protein variants associated with human retinopathies. *Nat Genet* **26**, 242-6 (2000).
19. Perrault, I. et al. Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* **75**, 639-46 (2004).
20. Zhang, Q. et al. Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene. *Hum Genet* **122**, 293-9 (2007).
21. Jaakson, K. et al. Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. *Hum Mutat* **22**, 395-403 (2003).
22. Kohler, F. & Muller, K.M. Adaptation of the Ras-recruitment system to the analysis of interactions between membrane-associated proteins. *Nucleic Acids Res* **31**, e28 (2003).
23. Broder, Y.C., Katz, S. & Aronheim, A. The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr Biol* **8**, 1121-4 (1998).
24. The Gallup Organization, Public knowledge and attitudes concerning blindness: a survey sponsored by Research to Prevent Blindness, New York, NY, unpublished data, October 1965 and April 1976.
25. <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/sum-dis.htm#D-graph>