مقاله پژوهشی

فراوانی بالای جهش 35delG در ژن GJB2 مرتبط با ناشنوایی غیرسندرمی در استان اصفهان

حلیمه رضایی، صادق ولیان بروجنی*، رضوان موحدی

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک، اصفهان، ایران

چکیده

مطالعات انجام شده در نواحی مختلف ایران نشان‌دهنده اهمیت نقش جهش 35delG در ژن GJB2 است. اما وضعیت جهش مزبور و اهمیت آن در بروز ناشنوایی غیرسندرمی با توارث اتوزومی مغلوب (ARNSHL) در جمعیت اصفهان ناشناخته است. در این مطالعه فراوانی جهش مزبور در جمعیت ناشنوایان غیرسندرمی استان اصفهان مطالعه شده است. ٦٣ بیمار غیرخویشاوند اصفهانی با ناشنوایی غیرسندرمی اتوزومی مغلوب بررسی شدند. سپس غربالگری جهش 35delG ژن GJB2 که مسؤول بروز برخی از موارد این نوع ناشنوایی دانسته می‌شود، با استفاده از روش مولکولی ARMS/PCR (Allele Refraction Mutation System/Polymerase Chain Reaction) و تعیین توالی انجام شد. از ١٢٦ کروموزوم مطالعه‌شده، جهش 35delG در ٣٩ کروموزوم (٣١/٠٪) شناسایی شد. جهش 35delG در بیشتر نقاط ایران، خصوصاً در نواحی شمال و شمال غرب، فراوانی بالایی دارد و جمعیت اصفهان نیز در رده جمعیت هایی قرار می‌گیرد که این جهش در انها شایع است.

واژه‌های کلیدی: ناشنوایی؛ کانکسین ٢٦؛ اتوزومی مغلوب؛ اصفهان

مقدمه

ناشنوایی مادرزادی اختلالی ناهمگون است که حدود ۱ نفر از هر ۱۰۰۰ کودک تازه متولدشده را درگیر می‌کند (۱). عوامل ژنتیکی علت نیمی از موارد و عوامل اکتسابی دلیل نیمی دیگر از این عارضه است. اختلال در شنوایی ممکن است همراه با مجموعه علائم دیگری بروز کند (ناشنوایی سندرمی) و یا تنها نشانه بیماری باشد (ناشنوایی غیرسندرمی) (۲). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی های ژنتیکی غیرسندرمی هستند و الگوی توارث اتوزومی مغلوب (۸۵٪)، اتوزومی غالب (۱۵-۱۲٪) یا وابسته به X (۳-۱٪) دارند (۳تا۵). ژن های بسیاری در ناشنوایی دخالت دارند که یکی از مهم‌ترین آن ها ژن GJB2 است که پروتئین کانکسین ۲۶ (Cx26) را رمزگذاری می‌کند. این ژن بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۱۳ قرار گرفته و از ۲ اگزون و ۱ اینترون تشکیل شده است. اگزون ۲ تنها توالی ژن GJB2 است که

* صادق ولیان بروجنی، Ph.D
بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، اصفهان، ایران
تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲٤٥٥ فاکس: ۰۳۱۱-۷۹۳۲٤٥٦ / E.mail: svallian@biol.ui.ac.ir
تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲٤ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲٤

Archive of SID
www.SID.ir

توالی لازم برای تولید پروتئین کانکسین ۲۶ را دارد. پروتئین کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده کانال اتصالات باز بتا ۲ است. این اتصالات ساختارهایی را در غشاء سلولی سلول های مجاور در موجودات چندسلولی ایجاد می‌کند و اجازه می‌دهد مولکول های کمتر از ۱۰۰۰ دالتون (مانند یون‌ها و برخی از متابولیت ها) میان سلول‌ها عبور کنند (۶و۷). پروتئین کانکسین ۲۶ در حلزون گوش درونی حضور دارد. پس از تحریک سلول های مویی، این اتصالات نقش بازگرداندن یون های پتاسیم را از راه سیناپس های موجود در قاعده این سلول ها و هم‌چنین سلول های محافظ و فیبروبلاست ها به سمت اندولنف (حاوی پتاسیم بالا) در حلزون گوش درونی به عهده دارند (۸). در موقعیت ۳۰ تا ۳۵ ژن GJB2 شش تکرار نوکلئوتیدی گوانین وجود دارد که حذف هر نوکلئوتید در این ناحیه باعث ایجاد شایع ترین جهش، به‌نام 35delG یا 30delG، می‌شود. این جهش اولین بار توسط زلانت[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش شد (۹). علت عمده ناشنوایی های مادرزادی تک گیر و وراثتی در جمعیت سفیدپوستان جهش 35delG است. فراوانی ناقلان این جهش در شمال اروپا ۱/۲۶٪ و در جنوب اروپا ۱/۹۶٪ گزارش شده است (۱۰). مقالات و گزارش‌های مختلفی از سراسر جهان نشان می دهند که جهش های ژن GJB2 در مناطق جغرافیایی و اقوام گوناگون با هم متفاوت هستند. جهش 35delG در جمعیت های اروپایی و سفیدپوستان آمریکایی، جهش 167delT در یهودیان اشکنازی و جهش 235delC در شرق آسیا بیشترین شیوع را دارند. نکته قابل ملاحظه این است که جهش 35delG در بیشترین نقاط جهان گسترده شده است (۱۱،۶و۱۲).

در مطالعه اولیه که توسط نجم‌آبادی و همکاران بر روی ۸۳ خانواده دچار ناشنوایی اتوزومی مغلوب انجام شد، در ۹ خانواده (۱۱٪) ناشنوایی وابسته به ژن GJB2 دیده شد و بیشترین ژنوتیپ نیز با جهش 35delG مرتبط بود. در مطالعه هاشم زاده و همکاران نیز فراوانی جهش های ژن GJB2 در چندین استان ایران بررسی شد و یافته‌ها نشان می‌داد این جهش در جمعیت ایرانی شایع است (۱۷تا۲۲). ناشنوایی از جمله بیماری های شایع در اصفهان است، اما تاکنون مطالعه‌ای بر روی جهش های مؤثر بر بروز ناشنوایی در جمعیت اصفهان گزارش نشده است. در این مطالعه، فراوانی جهش 35delG ژن GJB2 در افراد مبتلا به ناشنوایی غیرسندرمی اتوزومی مغلوب در اصفهان بررسی شده است.

روش کار

در این مطالعه ۶۳ فرد ناشنوا و کم شنوای مراجعه‌کننده به مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان بررسی شدند. این افراد غیرخویشاوند بودند. وضعیت بالینی افراد توسط پزشک متخصص بیماری‌های گوش، حلق و بینی تأیید شده بود. معیارهای گزینش افراد مورد مطالعه عبارت بودند از وجود ناشنوایی یا کم‌شنوایی غیرسندرمی با توارث اتوزومی مغلوب (تأییدشده توسط آزمون‌های شنوایی‌سنجی)، فقدان سایر اختلالات همراه و وجود حداقل دو فرد دچار این نوع ناشنوایی در خانواده.

پس از اخذ رضایت از بیماران، اطلاعات زمینه‌ای در پرسشنامه ثبت و شجره خانوادگی ترسیم شد. ادیوگرام بیماران نیز ضمیمه پرونده آنها شد. سپس ۱۰-۵ میلی‌لیتر خون وریدی جهت استخراج DNA ژنومی گرفته شد. نمونه‌ها، به‌منظور جلوگیری از لخته شدن، در لوله های حاوی EDTA نگهداری شدند. DNA ژنومی توسط روش استاندارد میلر استخراج شد (۲۳). جهت تشخیص جهش 35delG از روش ARMS/PCR با پرایمرهای اختصاصی و روش استاندارد استفاده شد (۲۴). در موارد مثبت، وجود جهش با تعیین توالی اگزون ۲ ژن GJB2 توسط دستگاه ABI ۷۳۷ تأیید شد:

35delGN: 5'TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAG3'
35delGM: 5'TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAT3'
35delGR: 5'GAAGTAGTGATCGTAGCACACGTTCTTGCA3'
CAAT3: 5'GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGGTG3'
CAAT4: 5'CCCACCTTTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG3'

یافته‌ها

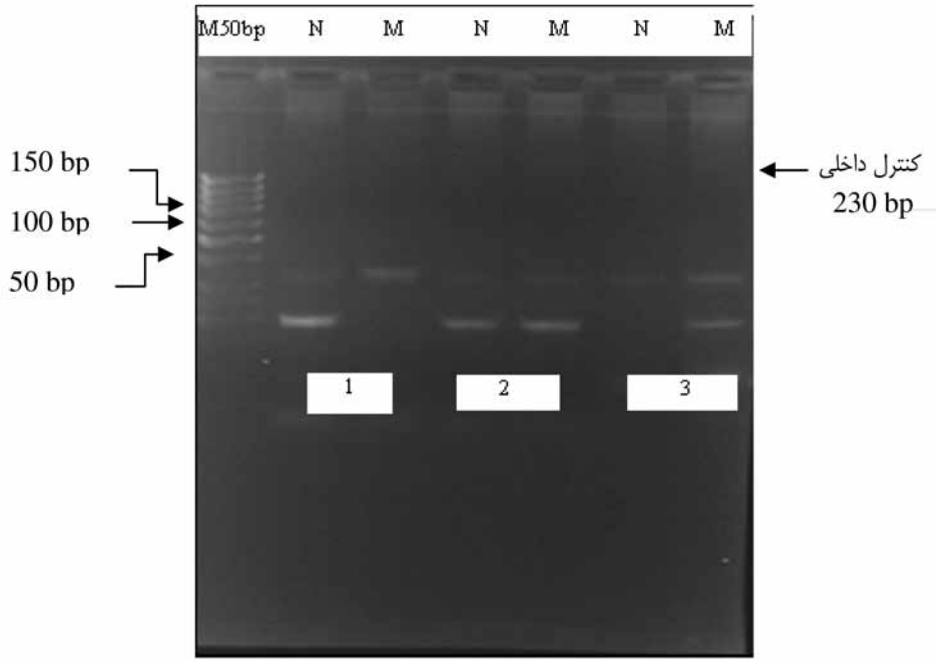
۱۲۶ کروموزوم از ۶۳ بیمار بررسی شد. جهش 35delG در ۳۹ کروموزوم (۳۱/۰٪) دیده شد. این کروموزوم ها متعلق به ۲۷ فرد بیمار بودند که شامل ۱۲ فرد هوموزیگوت (۲۴ کروموزوم) و ۱۵ فرد هتروزیگوت (۱۵ کروموزوم) می‌شدند (شکل ۱).

بحث

جهش های ژن GJB2 در بیشتر نقاط جهان عامل ایجادکننده حدود نیمی از موارد ناشنوایی خفیف تا شدید هستند. جهش های خاصی از این ژن در جمعیت های مختلف شایع است. برای مثال، در یهودیان اشکنازی جهش 167delT، در کشور های شرق آسیا جهش 235delC و در کشور های اروپایی جهش 35delG شیوع بالایی دارد. اما جهش 35delG در بیشتر جمعیت های جهان با فراوانی متفاوتی دیده می شود (۱۳و۱۴). ایران از اقوام گوناگونی تشکیل شده و با توجه به اینکه فراوانی جهش های ژن GJB2 در اقوام گوناگون متفاوت است (۱۴تا۱۶)، لازم است اقوام و نژادهای گوناگون ایران به‌صورت جداگانه بررسی شوند. در مطالعات اولیه که بر روی جمعیت ایرانی صورت گرفت، فراوانی جهش 35delG از ۰٪ (سیستان و بلوچستان) تا ۲۷/۱٪ (گیلان) متفاوت بوده است (جدول ۱).

1. Zelante

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱: ژل آگارز ۲٪ محصولات PCR. برای هر فرد دو ستون در نظر گرفته شده که در تمام ستون ها نوار ۲۳۰ جفت‌بازی شاهد داخلی وجود دارد. نوار ۱۰۰ جفت‌بازی، بسته به اینکه در ستون N (طبیعی) یا M (جهش‌یافته) یا هر دو باشد، به‌ترتیب نشان‌دهنده ژنوتیپ طبیعی، هوموزیگوت و یا هتروزیگوت برای جهش 35delG در بیمار است. شماره ۱ شاهد منفی (DNA فرد سالم که با پرایمر N و مشترک واکنش PCR را انجام داده است)، شماره ۲ مربوط به فرد هتروزیگوت و شماره ۳ فرد هوموزیگوت برای جهش 35delG هستند.

جدول۱: فراوانی آللی جهش 35delG در جمعیت ایران.

جمعیت مورد بررسی	فراوانی آللی جهش 35delG	منبع
آذربایجان شرقی	٪۱۸/۳	۲۶
اصفهان	٪۲۲/۵	این مطالعه
تهران	٪۱۳/۹	۲۶
چهارمحال و بختیاری	٪۶/۴	۲۶
خراسان	٪۱۱/۲	۱۸
خوزستان	٪۶/۲	۲۶
سیستان و بلوچستان	٪۰	۲۶
کردستان	٪۱۴/۷	۲۶
کرمان	٪۲/۳	۲۵
گلستان	٪۹/۱	۲۶
گیلان	٪۲۷/۱	۱۸
هرمزگان	٪۱/۵	۲۶
همدان	٪۱۱/۶	۱۶

www.SID.ir

فراوانی آللی این جهش در مطالعه حاضر ۳۱٪ بود که در مقایسه با کل ایران رقم بالایی است و فراوانی نزدیک به نواحی شمالی و شمال غرب ایران را نشان داده است. ایران کشوری گسترده با نژاد ها، فرهنگ ها و موقعیت جغرافیایی متفاوت است که مهاجرت و ازدواج از سایر استان ها نیز در آن دیده می شود. با در دست داشتن فراوانی این جهش، بررسی جهش های دیگر ژن GJB2 و یا سایر ژن های دخیل در این نوع ناشنوایی در بیشتر نقاط ایران، نیمرخ ژنتیکی این نوع ناشنوایی تکمیل می‌شود. این یافته‌ها در مشاوره ژنتیک، و نیز پیشگیری و درمان این گروه از بیماران مفید خواهد بود.

References

1. Joseph AY, Rasool TJ. High frequency of connexin26 (GJB2) mutations associated with non syndromic hearing loss in the population of Kerala, India. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2009;73: 437-43.
2. Perea Y, Mato J, Amores I, et al. Study of six mutations in the gjb2 gene in Cuban patients with nonsyndromic sensorineural deafness. Biotechnologia Aplicada 2007; 24: 241-45.
3. Abidi O, Boulouiz R, Nahili H, et al. The analysis of three markers flanking GJB2 gene suggests a single origin of the most common 35delG mutation in the Moroccan population. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008;377: 971-4.
4. Yan D, Park HJ, Ouyang X. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians. Human Genetics 2003;114:44-50.
5. Mukherjee M, Phadke SR, Mittal B. Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss. Indian Journal of Human Genetics 2003;9(2):41-50.
6. Tekin M, Akar N, Blanton SH, et al. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. Human Genetics 2001;108:385-9.
7. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Human Molecular Genetics 1997;6(9):1605-9.
8. Habner CA, Jentsch TJ. Ion chennd disease. Hum Mol Genet 2002;11:2435-45.
9. Rothrock CR, Murgia Edi A, Sartorato L, et al. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. Human Genetics 2003;113:18-23.
10. D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, et al. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin 26 alleles. Biochemical and Biophysical Research Communications 2002; 296:685-91.
11. Tekin M, Bog Oclu G, Arican ST, et al. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. Clinical Genetics 2004;67:31-7.
12. Liu Y, Ke X, Qi Y, et al. Connexin26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population. Journal of Human Genetics 2002;47:688-90.
13. Kndo T, Ikeda K, Oshima T, et al. GJB2 (Connexin 26) mutations and child hood deafness in Thailand. Otology and Neurotology Journal 2001; 22:858-61.
14. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, et al. GJB2 mutation in Iranian with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. Human Mutation 2002;19:572-4.
15. Fuse Y, Dioi K, Hasegawa T, et al. Three novel connexin 26 gene mutations in autosomal recessive non–syndromic deafness. Neuro Report Journal 1999;10:1853-7.
16. Mahdieh N, Nishimura C, Ali-Madadi K, et al. The frequency of GJB2 mutations and the Δ (GJB6-D13S1830) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population. Clinical Genetics 2004;65:506-8.
17. Sadeghi A, Sanati MH, Alasti F, et al. Mutation analysis of connexin 26 gene and del(GJB6-D13S1830) in patients with hereditary deafness from two provinces in Iran. Iranian Journal of Biotechnology 2005;3(4):255-8.
18. Hashemzadeh Chaleshtori1 M, Dowlati M, Farhud DD, et al. Two Novel Mutations and Predominant 35delG Mutation in the Connexin 26 Gene (GJB2) in Iranian Populations. Iranian Journal Of Public Health 2004;33(2):14-19.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Sasanfar R, Tolouei A, Hoseinipour A, et al. Frequency of A Very Rare 35delG Mutation in Two Ethnic Groups of Iranian Populations. Iranian Journal Of Public Health 2004;33(4):26-30.
20. Hosseinipour A, Hashemzadeh Chaleshtori M, Sasanfar R, et al. Report of a New Mutation and Frequency of Connexin 26 gene (GJB2) Mutations in Patients from Three Provinces of Iran. Iranian Journal Of Public Health 2005;34(1):47-50.
21. Esmaeili M, Bonyadi M, Nejadkazem M. Common mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in affected families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss from Iran: Simultaneous detection of two common mutations (35delG/del(GJB6-D13S1830)) in the DFNB1-related deafness. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2007;71;869-73.
22. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farrokhi E, Shahrani M, et al. High carrier frequency of the GJB2 mutation (35delG) in the north of Iran. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2007;71:863-7.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.
24. Mustafa MW. Prevalence of the connexin 26 mutation 35delG in non-syndromic hearing loss in Egypt. International Journal of Otorhinolaryngology 2004; 3(1):420-28.
25. Bazaz-zadegan N, Mirhosseyni N, Ziaadini H, et al. Prevalence of 35delG mutation in GJB2 gene in non-syndromic heaving loss in kerman. Journal of KUMS 2005; 11:136-40.
26. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Familial and Sporadic GJB2-related Deafness in Iran: review of Gene Mutations. Iranian Journal of Public Health 2007;36:138-43.

Archive of SID

www.SID.ir