Archive of SID

غربالگری ناشنوایان غیر سندرومی اتوزومال مغلوب برای جهش های ژن GJB2 (استان مازندران)

چکیده

مقدمه : کاهش شنوایی ۱ نفر از هر ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ کودک تازه متولد شده را تحت تاثیر قرار می دهد. بیش از ۵۰٪ از این موارد را به عوامل ژنتیکی نسبت میدهند. کاهش شنوایی غیر سندرمی بیش از ۷۰ درصد از موارد ناشنوایی ارثی است که ۸۵ درصد از آن را وراثت جسمی مغلوب دارندو تا کنون بیش از یکصد جایگاه (locus) برای این نوع ناشنوایی برآورد شده است. ژن های مختلفی با این ناشنوایی در ارتباط هستند که عمده ترین آنها جهش در ژن کانکسین ۲۶ (GJB2) می باشد که در جمعیت های مختلف وجود دارد. موتاسیون در این ژن سبب کاهش شنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب (Autosomal recessive non syndromic hearing loss) می شود.

مواد و روش تحقیق :

هدف در این مطالعه غربالگری بیماران برای جهش های ژن GJB2 بود.در این تحقیق از تکنیک ARMS/PCR استفاده شد ,نمونه هائیکه با این روش برای 35delG هموزیگوت بودند کنار گذاشته شدند و سپس نمونه هائیکه هتروزیگوت و یا منفی بودند با روش DHPLC و Direct sequencing بررسی شدند.

یافته ها :

در این تحقیق۷۶ کروموزوم(۳۸ فرد بیمار) بررسی شد: ۳۲ کروموزوم (۴۲٪) در ژن GJB2 جهش داشتند که بالاترین شیوع به جهش 35delG مربوط است. سایر جهش ها که در این منطقه دیده شد شامل W24X , R127H, R32H, -3170G>Aبودند .همچنین پلی مورفیسم V153I درسه فرد بیمار(۳۸) تشخیص داده شد.

بحث و نتیچه گیری : این آمار با سایر آمارجهان مشابهت چندانی ندارد و بیانگر وجود احتمالی ژن ها و لوکوس های دیگر دخیل در این منطقه می باشد.

کلید واژه ها : GJB2 ، کاهش شنوایی غیر سندرومی اتوزومی مغلوب ، کانکسین ۲۶

دکتر عاطفه خوش آئین
مرکز مشاور ژنتیک ، سازمان بهزیستی استان مازندران

نوشین نیک ذات
کارشناس ارشد ژنتیک

دکتر فاطمه پور فاطمی
مرکز مشاور ژنتیک ، سازمان بهزیستی استان مازندران

دکتر حسین نجم آبادی

www.SID.ir

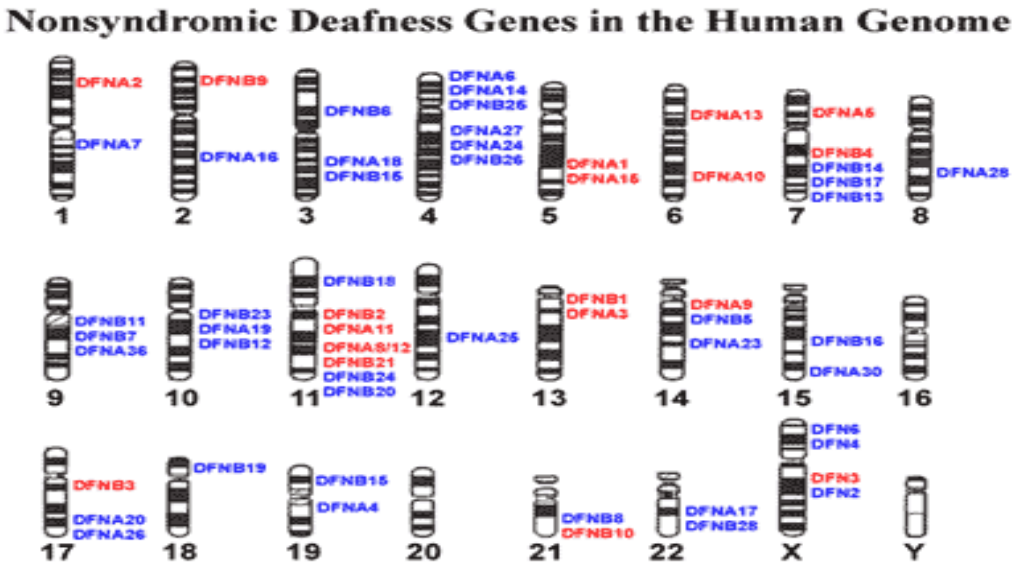
Archive of SID

دکتر کیمیا کهریزی دانشیاردانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
استادیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
یاسر ریاض الحسینی
کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی
مرضیه محسنی
کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی
نیلوفر بزاززادگان
کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی

مقدمه

ناشنوایی اختلالی هتروژن است که علت‌های محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد (۱) نقص شنوایی ژنتیکی شایعترین اختلال حسی عصبی ارثی است که تقریباً ۱/۱۰۰۰-۲۰۰۰ کودک تازه متولد را تحت تاثیر قرار می دهد (۳و٤). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی‌های ژنتیکی غیرسندرومی است که در آن فرد ناشنوا هیچ اختلال دیگری ندارد (۳). کاهش شنوایی حسی عصبی جسمی مغلوب غیر سندرمی (ARNSHL) شایعترین فرم کاهش شنوایی ارثی از نوع شدید است (۵)که ۸۵٪ موارد ناشنوایی را به خود اختصاص می دهد(٦).

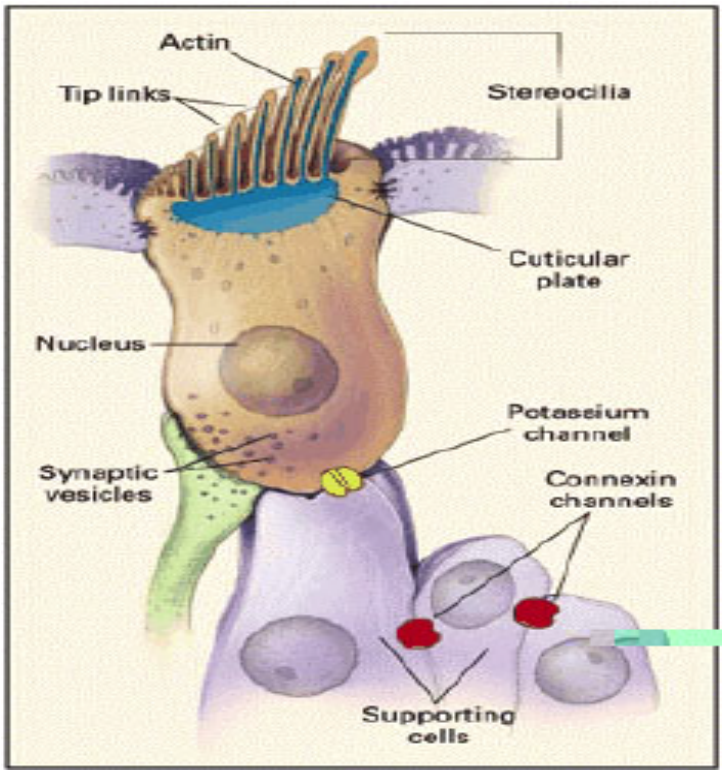
در سالهای اخیر پیشرفت های قابل ملاحظه ای در شناسایی ژن های دخیل در ناشنوایی غیرسندرمی به وقوع پیوسته است. ژن های مختلفی باعث این اختلال می شوند که در نهایت ۱۰۰ لوکوس برای آن تخمین زده شده است (شکل ۱). از میان آنها DFNB1 به تنهایی مسئول ۵۰٪ از ناشنوایی های جسمی مغلوب می باشد که توسط جهش های ژن کانکسین ۲٦ (CX26) و ژن کانکسین ۳۰ (CX30) اتفاق می افتد. کانکسین۲٦ ژن کوچکی است که بر روی کروموزوم شماره ۱۳ قرار گرفته است.طول این ژن ۵/۵ کیلو باز بوده و از دواگزون تشکیل شده است که بوسیله یک اینترون از هم جدا میشوند. اما تنها توالی از GJB2 که دارای کد برای سنتز پروتئین کانکسین ۲٦ می باشد اگزون ۲ است.(٦و۷).پروتئین کانکسین ۲٦ عضوی از خانواده کانال اتصال باز بتا ۲ (Gap Junction Beta 2)(GJB2) می‌باشد (که بعد از این با نام کانکسین ۲٦ خوانده می شود) این پروتئین مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است که اجازه انتقال به مولکولهای کوچک می دهد(شکل۲).



www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱: جایگاه های ژنی ژنهای ناشنوایی غیر سندرمی در ژنوم انسان



شکل۲: تصویر شماتیک از جایگاه کانکسین۲۶ در حلزون گوش

www.SID.ir

Archive of SID

تا کنون بیش از ۹۰ جهش در ژن کانکسین ۲۶ کشف شده است(۹). 35delG شایعترین جهش در این ژن (در حدود ۷۰٪) می باشد که منجر به ایجاد کدون خاتمه زودرس در موقعیت اسید امینه ی شماره ۱۳ می شود (۱۰). در ژن کانکسین ۲۶ شش تکرار از باز گوانین در موقعیت ۳۰-۳۵ منطقه کد کننده وجود دارد که حذف یکی از این نوکلئوتیدها باعث ایجاد جهش 35delG یا30delG می گردد(۱۱) این جهش اولین بار توسط Zelante و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش شد بعد ها مشخص شد این جهش عمومی ترین علت ناشنوایی های مادرزادی اسپورادیک و ارثی است. این جهش شایع ترین نوع جهش در جمعیت سفید پوست است(۱۲).

مقالات و گزارشات مختلف از سراسر جهان نشان داده اند که جهش های ژن کانکسین ۲۶ در مناطق جغرافیایی و اقوام مختلف با هم متفاوت هستند.در جمعیت های اروپایی و سفید پوستان امریکایی جهشی به نام 35delG بیشترین شیوع را داراست در صورتی که در یهودیان اشکنازی جهش دیگری به نام 167delTشایع است نکته قابل ملاحظه این است که جهش 35delG در بیشتر نقاط جهان گسترده شده است (۱۳ و ۱٤) .

هدف کلی این پروژه تعیین میزان جهش های ژن کانکسین ۲۶ در افراد مبتلا به ناشنوایی غیر سندرومی با توارث جسمی مغلوب دراستان مازندران بوده است.

مواد و روش تحقیق:

ابتدا از افراد کم شنوا و یا ناشنوایی که برای مشاوره ژنتیک به مرکز بهزیستی شهرستانهای استان مراجعه کردند استفاده نموده و با تکمیل پرسشنامه و ترسیم شجره برای آنها پرونده تشکیل گردید. ادیوگرام های مربوطه نیز ضمیمه پرونده می‌گردد. سپس با اخذ رضایت از ۳۸ بیمار مبتلا به ناشنوایی غیر سندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب ۵-۱۰ سی سی خون جهت استخراج DNA ژنومی گرفته شد و برای جلوگیری از لخته شدن در لوله های حاویEDTA [٤](اتیلین دیامین ترا استیک اسید) نگهداری شد. DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع (Salting out) استخراج گردید و سپس کیفیت وکمیت آن توسط روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرارگرفت.جهت تشخیص جهش 35delG از روش ARMS/PCR (Reaction Chain Allele Refraction Mutation System/Polymerase) و الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ با ولتاژ ۲۰۰ ولت استفاده شد (شکل۳) . در این PCR از ۵ پرایمر استفاده شد که عبارتند از ۲ پرایمر کنترل داخلی(Control A, Control B)، پرایمرهای نرمال (N)، موتانت (M) و مشترک (COM) که توالی آنها به شرح زیراست:

35 NOR 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAG 3'
35 MUT 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAT 3'
35 COM 5' GAAGTAGT GATCGTAGCACACGTTCTTGCA3'

1- Ethylene- Diamine-Tetra-Acetic acid

www.SID.ir

Archive of SID

ControlA5' CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG3'
ControlB5' GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG3'

PCR طبق شرایط زیر صورت گرفت:

۹۵ درجه ۵ دقیقه

۳٤ سیکل با:

۹۵ درجه ٤۰ ثانیه

٦۰ درجه ۳۰ ثانیه

۷۲ درجه ۱ دقیقه (١٤).

نمونه های هموزیگوت 35delG مشخص و کنار گذاشته شدند .در بقیه موارد پس از انجام DHPLC نمونه هایی که پروفایل غیر نرمال داشتند مستقیما" تعیین توالی(Direct sequencing) شدند.

شکل (۳)

ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد مربوط به شناسایی جهش 35delG

N: باند نرمال

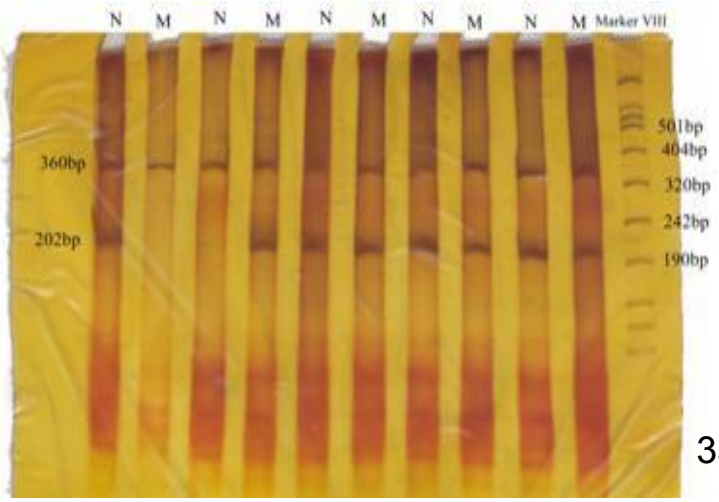
M: باند موتان

(۱): کنترل نرمال برای جهش 35delG

(۲) : کنترل هموزیگوت برای جهش35delG

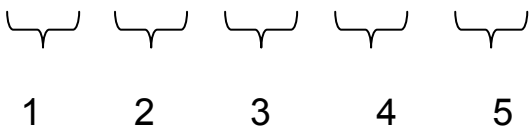
(۳) : کنترل هتروزیگوت برای جهش35delG

بیماران (۵، ٤) : هتروزیگوت برای جهش 35delG



www.SID.ir

Archive of SID



یافته ها: بر اساس معیارهای مورد نظر ما ۳۸ بیمار از ۳۸ خانواده مطالعه شدند (۷۶ کروموزوم). ۳۲ کروموزوم (۴۲٪) حاوی جهش در ژن کانکسین ۲۶ بودند فراوانی جهش 35delG برابر ۳۵/۵٪ از کل آلل های مورد بررسی بود. جهش 35delG در بین سایر جهش های GJB2 ۸۴٪ را به خود اختصاص داده بود.

- جهش هایی که در نتیجه انجام توالی یابی مستقیم DNA بدست امده اند عبارتند از : 3170G>A,W24X,R127H,R32H که جهش های اتوزومی مغلوب در ژن CX26 می‌باشند و همچنین در ۳ خانواده (۷/۵٪) پلی مورفیسم V153I مشاهده شد. ژنوتیپهای یافت شده در این بیماران در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول ۱: ژنوتیپهای یافت شده در بیماران

ژنوتیپ	فراوانی
35delG/35delG	۱۲
35delG/-3170G>A	۱
W24X/-3170G>A	۱
35delG/R32H	۱
35delG/wt	۱
R127H/wt	۱

بحث و نتیجه گیری:

کاهش شنوایی ارثی[1](HHL) از جمله بیماریهای هتروژن است، با وجود این جهش در ژن کانکسین ۲۶ عامل عمده ARNSHL می باشد. جهش در این ژن عامل نیمی از ناشنوایی ها از نوع خفیف تا شدید در جمعیت های مختلف است. (۱۶و۱۷). در جمعیت های مختلف جهش های خاصی شایع است مثلا" در کشورهای شرق اسیا جهش 235delC و در یهودیان اشکنازی جهش 167delT و در کشورهای اروپایی 35delG ازبیشترین شیوع برخوردار است.و نیز اینکه در بررسی انجام شده در ترکیه منشاء دو جهش35delG و delE120 در ژن GJB2 را به آناتولیا نسبت داده اند (۱۸). جهش 35delGدر بیشترجمعیت های جهان با

1- Hereditary Hearing Loss

www.SID.ir

Archive of SID

فراوانی های متفاوتی دیده می شود. در بررسی انجام شده در پاکستان که بر روی ۱۹۶ خانواده بود میزان شیوع جهش های ژن GJB2 ۱۶/۶٪ گزارش شده است (۱۸).در مطالعه اولیه ای که توسط دکتر نجم ابادی و همکارانشان انجام گرفت ۸۳ خانواده مطالعه شد که تنها در ۹ خانواده (۱۱٪) ناشنوایی وابسته به GJB2تشخیص داده شد که بیشترین ژنوتیپ مربوط به 35delG بود به طوریکه ٤ تا از ۹ خانواده ژنوتیپ هموزیگوت 35delG داشتند (۱۹) . همچنین در مطالعه بعدی همین گروه در سال ۲۰۰۵ فراوانی این جهش در بین ناشنوایان ژنتیکی غیر سندرمی جسمی مغلوب ایران ۱۲/٦٪ گزارش شده است, از ٦٦٤ خانواده مورد مطالعه تنها ۱٦/۷٪ جهش در ژن GJB2 را نشان دادند (۲۱). به هر حال در این بررسی نیز شیوع جهش های ژن کانکسین ۲٦ در جمعیت ایران بسیار کمتر از جمعیت‌های غربی گزارش شد. از انجا که ایران از قوم های مختلفی تشکیل شده و نیز با توجه به اینکه شیوع الل های جهش دار در جمعیت های مختلف متفاوت است . ضروری به نظر می رسد که اقوام مختلف به صورت جدا بررسی شوند, در مطالعه ای که درکرمان بر روی ٦٥ فرد ناشنوای غیر سندرومی جسمی مغلوب توسط دکتر نجم آبادی و همکارانشا ن انجام شده است تنها ۳ کروموزوم (۲،۳٪) جهش 35delGرا نشان دادند(۱). در این مطالعه نیز ما ناشنوایان غیر سندرومی استان مازندران را با ۳۸ خانواده مورد بررسی قرار دادیم که جهش در ژن GJB2 در ٤۲٪ مشاهده شد . این امر نشان دهنده میزان شیوع پائین این جهش نسبت به گزارش های انجام شده در کشورهای غربی است (۲۲و۲۳و۲٤). این نتایج نشان می دهد که در جمعیت ما احتمالا" ژن های دیگری عامل ایجاد ARNSD می باشد. بنابراین با توجه به اینکه جمعیت ایرانی ترکیبی از قبایل مختلف است. با بررسی انها میتوان به نتایج جدیدتری دست یافت. که نهایتا" کمک شایانی به امر مشاوره ژنتیک , کنترل و درمان این گروه از بیماران خواهد کرد.

منابع

۱- نیلوفربزاززادگان، دکتر نوشین میرحسینی، دکتر حسن ضیاالدینی، دکتر علیرضا اسدی، دکتر کیمیا کهریزی، ساناز ارژنگی، اکرم آستانی، مرضیه محسنی،یاسر ریاض‌الحسینی، مهدیه نجات، خدیجه جلالوند، دکتر ریچارد اسمیت، کارلا نیشیمیورا و دکتر حسین نجم‌آبادی :وفور نسبی جهش (35delG) در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان غیرسندرومی جسمی مغلوب استان کرمان:مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره ۱۱شماره۳: از صفحه ۱۳۶ تا ۱۴۰ (۱۳۸۳).

www.SID.ir

Archive of SID

2- Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003; 9(2): 109-119.

3- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N,,et al: Connexin 26 Mutations Associated with the Most Common Form of Non-Syndromic Neurosensory Sutosomal Recessive Deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Hum Mol Genet 1997;6:1605-1609.

4-Falk MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 2000; 79(8): 564-574.

5-Reardon W,Middleton HR,Sand kuijl L,et al: Genetic Deafness. J Med Genet 1992 ;29:521-526.

6-Lefebvre PP and Van De Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain res rev* 2000; 32(1): 159-162.

7-Goodenough DA,Goliger JA,Paul DL.Connexins,connexon,and intercellular communication.Annu Rev Biochem 1996;65:475-502

8-Kiang DT,Jin N,Tu ZJ,Lin HH.Upstrem genomic sequence of the human connexin 26 gene.Gene 1997;199:165-171

9-http://www.crg.es/deafness

10-Zelante L, Gasparini P,.Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans.Hum Mol Genet 1997;6:1605-1609

11-Kelley PM,Harris DJ.Novel mutations in the connexin 26 gene(GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss.Am J Hum Genet 1998;62:792-799

12-Park H.J, Hahn S.H, Chun Y.M, Park K and Kim H.N. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110: 1535-1538.

www.SID.ir

Archive of SID

13-Uyguner O,Emiroglu M. Frequencies of gap and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss.Clin Genet 2003;64:65-69

14-Maheshwari M,Vijaya R.Screening of families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment (ARNSHL) for mutations in GJB2 gene:Indian Scenario.Am J Med Genet 2003; 120A:180-4

15- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC and Smith RJ. Carrier rates in the Midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. JAMA 1999; 281(23): 2211-2216.

16- Maw Ma: The Contibution of the DFNB1 locus to neurosensory Deafness in Caucasian Population. Am J Hum Genet1995; 57:629-

17- Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G,,et al: Molecular Basis of Childhood DeafnessResulting from Mutations in the GIB2 (connexin 26) Gene. Hum Genet 2000;106:40-44.

18- Tekin M, Bogoclu G, Arican ST, Orman MN, Tastan H, Elsayed S, Akar N. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. Clin Genet. 2005 Jan;67(1):31-7.

19- Santos RL, Wajid M, Pham TL, Hussan J, Ali G, Ahmad W, Leal SM. Low prevalence of Connexin 26 (GJB2) variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. Clin Genet. 2005 Jan;67(1):61-8.

20- Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K,et al. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. Hum Mutat 2002; 19(5): 572.

21- Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M , et al .GJB2 Mutations-Passage Through Iran. Am J Med Genet A. 2005 Mar 1;133(2):132-7.

22- Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T. Three Novel Connxin 26 Gene Mutations in Autosomal Recessive Non-Syndromic Deafness. NeuroReport 1999;10:1853-1857.

23- Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. et al: Prevalent Connexin 26 Gene (GJB2) Mutations in Japanese. J Med Genet2000; 37:41-43.

www.SID.ir

Archive of SID

24-Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T. Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) Responsible for Childhood Deafness in the Japanese Population. Am J Med Genet. 2000; 90:141-145.

www.SID.ir