غربالگری جهش‌های ژن GJB۲ در ناشنوایان غیر سندرمی جسمی مغلوب در استان خوزستان

دکتر کیمیا کهریزی[۱]، دکترعلی سجادی[۲]، مرضیه محسنی[۳]، یاسر ریاض الحسینی[۳]، نیلوفر بزاززادگان[۳]، * دکتر حسین نجم آبادی[۴]

چکیده

هدف: کاهش شنوایی ۱ نفر از هر ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ کودک تازه متولد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بیش از ۵۰٪ از این موارد را به عوامل ژنتیکی نسبت می‌دهند. کاهش شنوایی غیر سندرمی بیش از ۷۰ درصد از موارد ناشنوایی ارثی را شامل می‌شود که ۸۵ درصد از آن را وراثت جسمی مغلوب تشکیل می‌دهد و تاکنون بیش از یکصد جایگاه (locus) برای این نوع ناشنوایی برآورد شده است. ژن‌های مختلفی با این ناشنوایی در ارتباط هستند که عمده‌ترین آنها جهش در ژن کانکسین ۲۶ (CX26) می‌باشد که در جمعیت‌های مختلف وجود دارد. جهش در این ژن سبب کاهش شنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب می‌شود. هدف این مطالعه غربالگری بیماران برای جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در ناشنوایان استان خوزستان با استفاده از تکنیک ARMS /PCR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تحلیلی از افراد ناشنوا یا کم شنوای مراجعه کننده به مراکز بهزیستی شهرستانهای استان خوزستان به منظور مشاوره ژنتیک، ۵۰ نفر بطور تصادفی انتخاب و ۱۰-۵ میلی لیتر خون از آنها گرفته شد و پس از استخراج DNA کیفیت و کمیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهش ۳۵ del G با روش ARMS/PCR مشخص و نمونه‌های هموزیگوت آن کنار گذاشته شد. نمونه‌هایی که هتروزیگوت یا منفی بودند با روش DHPLC و Direct Sequencing بررسی شدند.

یافته‌ها: در این تحقیق ۱۰۰ کروموزوم (۵۰ فرد بیمار) بررسی شد: ۱۳ کروموزوم (۱۳٪) در ژن GJB۲ جهش داشتند که بالاترین شیوع به جهش ۳۵ del G مربوط می‌شد. سایر جهش‌ها که در این منطقه دیده شد شامل: R۱۲۷H، ۳۰del۲(AT)، R۳۲H و R۱۸۴P بودند. همچنین پلی مورفیسم V۱۵۳I در ۳ کروموزوم شناسایی گردید و پلی مورفیسم V۵۲V نیز در یک خانواده مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این آمار با آمار سایر کشورهای جهان مشابهت چندانی ندارد و بیانگر وجود احتمالی ژن‌ها و لوکوس‌های دیگر دخیل در ایجاد ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب در این منطقه می‌باشد.

کلید واژه‌ها: ناشنوایی غیر سندرمی/ وراثت جسمی مغلوب / GJB ۲/ توالی یابی مستقیم / غربالگری / جهش ژنی / جایگاه ژن

۱- متخصص اطفال، دانشیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک
۲- پزشک عمومی، مرکز مشاوره ژنتیک سازمان بهزیستی استان خوزستان
۳- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و ملکولی، مرکز تحقیقات ژنتیک
۴- دکترای ژنتیک، استاد دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۴/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۲۰

*آدرس نویسنده مسئول:
تهران، اوین، بلوار دانشجو، بن بست کودکیار، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک
تلفن: ۲۲۴۲۳۲۵۰ داخلی ۳۱۰
* E-mail: hnajm@uswr.ac.ir

Archive
www.SID.ir

مقدمه

ناشنوایی اختلالی هتروژن است که علت‌های محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد(۱). نقص شنوایی ژنتیکی شایعترین اختلال حسی عصبی ارثی است که تقریباً یک نفر از هر ۲۰۰۰-۱۰۰۰ کودک تازه متولد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد(۳، ۲). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی‌های ژنتیکی غیرسندرمی‌است که در آن فرد ناشنوا هیچ اختلال دیگری ندارد(۲). کاهش شنوایی حسی عصبی جسمی مغلوب غیر سندرمی[1](ARNSHL) شایعترین فرم کاهش شنوایی ارثی از نوع شدید است(۴) که ۸۵٪ موارد ناشنوایی را به خود اختصاص می‌دهد(۵).

در سالهای اخیر پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در شناسایی ژن‌های دخیل در ناشنوایی غیرسندرمی‌به وقوع پیوسته است. ژن‌های مختلفی باعث این اختلال می‌شوند که در نهایت ۱۰۰ لوکوس برای آن تخمین زده شده است. از میان آنها DFNB1 به تنهایی مسئول ۵۰٪ از ناشنوایی‌های جسمی مغلوب می‌باشد که توسط جهش‌های ژن کانکسین ۲۶(CX26) و ژن کانکسین ۳۲ (CX32) اتفاق می‌افتد. کانکسین ۲۶ ژن کوچکی است که بر روی کروموزوم شماره ۱۳ قرار گرفته است. طول این ژن ۵/۵ کیلو باز بوده و از دو اگزون تشکیل شده است که بوسیله یک اینترون از هم جدا می‌شوند. اما تنها توالی از GJB2 که دارای کد برای سنتز پروتئین کانکسین ۲۶ می‌باشد اگزون ۲ است(۷، ۶).

پروتئین کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده کانال اتصال باز بتا[2](GJB2) می‌باشد (که بعد از این با نام کانکسین ۲۶ خوانده می‌شود). این پروتئین مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است که اجازه انتقال به مولکولهای کوچک می‌دهد.

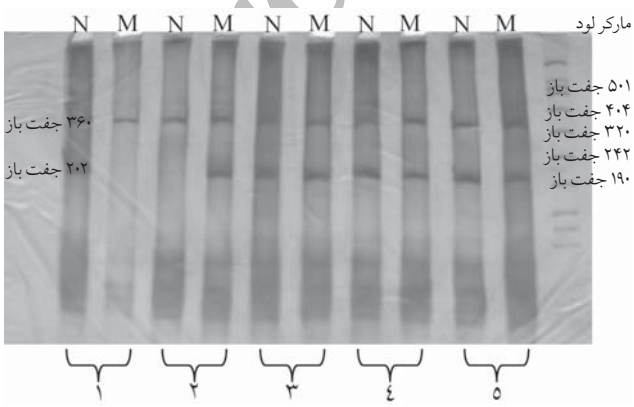
تاکنون بیش از ۹۰ جهش در ژن کانکسین ۲۶ کشف شده است(۸). 35del G شایعترین جهش در این ژن (در حدود ۷۰٪) می‌باشد که منجر به ایجاد کدون خاتمه زودرس در موقعیت اسید امینه شماره ۱۳ می‌شود(۹). در ژن کانکسین ۲۶ شش تکرار از باز گوانین در موقعیت ۳۵-۳۰ منطقه کدکننده وجود دارد که حذف یکی از این نوکلئوتیدها باعث ایجاد جهش 35del G یا 30 del G می‌شود(۱۰). این جهش اولین بار توسط زلانت و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش شد. بعدها مشخص شد این جهش عمومی‌ترین علت ناشنوایی‌های مادرزادی اسپورادیک و ارثی است. این جهش شایع‌ترین نوع جهش در جمعیت سفید پوست است(۱۱). مقالات و گزارشات مختلف از سراسر جهان نشان داده‌اند که جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در مناطق جغرافیایی و اقوام مختلف باهم متفاوت هستند.در جمعیت‌های اروپایی و سفید پوستان امریکایی جهشی به نام 35del G بیشترین شیوع را داراست در صورتی که در یهودیان اشکنازی جهش دیگری به نام 167del T شایع است. نکته قابل ملاحظه این است که جهش 35del G در بیشتر نقاط جهان گسترده شده است(۱۳، ۱۲).

هدف کلی این پروژه تعیین میزان جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در افراد مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی‌با توارث جسمی مغلوب در استان خوزستان بوده است.

روش بررسی

در این مطالعه تحلیلی ابتدا برای افراد کم‌شنوا و یا ناشنوایی که برای مشاوره ژنتیک به مراکز بهزیستی شهرستانهای استان خوزستان مراجعه کرده بودند با تکمیل پرسشنامه و ترسیم شجره پرونده تشکیل گردید. ادیوگرام‌های مربوطه نیز ضمیمه پرونده گردید. سپس با اخذ رضایت از ۵۰ بیمار مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی‌با الگوی وراثتی جسمی مغلوب که بصورت تصادفی انتخاب شده بودند، ۱۰-۵ سی سی خون جهت استخراج DNA ژنومی گرفته شد و برای جلوگیری از لخته شدن، در لوله‌های حاوی EDTA[3] نگهداری شد. DNA ژنومی‌توسط روش نمک اشباع (Salting out) استخراج گردید و سپس کیفیت و کمیت آن توسط روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهت تشخیص جهش 35del G از روش ARMS/PCR[4] و الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ با ولتاژ ۲۰۰ ولت استفاده شد(شکل۱). نمونه‌های هموزیگوت 35del G مشخص و کنار گذاشته شدند. در بقیه موارد پس از انجام DHPLC[5] نمونه‌هایی که پروفایل غیر نرمال داشتند مستقیماً تعیین توالی (Direct Sequencing) شدند.

شکل۱



N : باند نرمال

(۱): کنترل نرمال برای جهش 35del G

(۳): کنترل هتروزیگوت برای جهش 35del G

M : باند موتان

(۲): کنترل هموزیگوت برای جهش 35del G

(۵، ۴): بیماران هتروزیگوت برای جهش 35del G

1- Autosomal Recessive Non – Syndromic Hearing Loss
2- Gap Junction Beta 2
3- Ethylene- Diamine-Tetra-Acetic acid
4- Amplification Refractory Mutation System / Polymerase Chain Reaction
5- Denaturation High polymorphic Liquid Chromatography

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

بر اساس معیارهای مورد نظر ما ۵۰ بیمار از ۵۰ خانواده مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۰۰ کروموزوم). ۱۳ کروموزوم (۱۳٪) حاوی جهش در ژن کانکسین ۲۶ بودند. فراوانی جهش ۳۵del G برابر ۸٪ از کل کروموزومهای مطالعه شده بود. جهش ۳۵del G در بین سایر جهش‌های GJB۲، ۶۱/۵٪ را به خود اختصاص داده بود.

جهش‌هایی که در نتیجه انجام توالی یابی مستقیم DNA بدست آمده‌اند عبارتند از: R۱۲۷H، ۳۰۰del۲(AT)، R۳۲H و R۱۸۴P که جهش‌های اتوزومی مغلوب در ژن کانکسین ۲۶ می‌باشند. جهش ۳۰۰del ۲(AT) یک جهش جدید است که فقط در جمعیت این استان دیده شده است. و همچنین در ۴ خانواده پلی مورفیسم‌های V۱۵۳I، V۵۲V مشاهده شد. ژنوتیپ‌های یافت شده در این بیماران در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول ۱ـ ژنوتیپ‌های یافت شده در بیماران

ژنوتیپ	فراوانی
۳۵del G /۳۵del G	۳
۳۵del G/wt	۲
۳۰۰del۲(AT)/wt	۱
R۳۲H/wt	۱
R۱۲۷H/wt	۱
R۱۲۷H/wt	۱

بحث

کاهش شنوایی ارثی از جمله بیماریهای هتروژن است. با وجود این، جهش در ژن کانکسین ۲۶ عامل عمده ARNSHL می‌باشد. جهش در این ژن عامل نیمی از ناشنوایی‌ها از نوع خفیف تا شدید در جمعیت‌های مختلف است(۱۵، ۱۴). در جمعیت‌های مختلف جهش‌های خاصی شایع است مثلاً در کشورهای شرق آسیا جهش ۲۳۵del C و در یهودیان اشکنازی جهش ۱۶۷del T و در کشورهای اروپایی ۳۵del G از بیشترین شیوع برخوردار است. جهش ۳۵del G در بیشترجمعیت‌های جهان با فراوانی‌های متفاوتی دیده می‌شود. در مطالعه اولیه‌ای که توسط دکتر نجم‌آبادی و همکارانشان انجام گرفت ۸۳ خانواده مطالعه شد که تنها در ۹ خانواده (۱۱٪) ناشنوایی وابسته به GJB۲تشخیص داده شد که بیشترین ژنوتیپ مربوط به ۳۵del G بود بطوریکه ۴ تا از ۹ خانواده ژنوتیپ هموزیگوت ۳۵del G داشتند(۱۶). همچنین در مطالعه بعدی همین گروه در سال ۲۰۰۴ فراوانی این جهش در بین ناشنوایان ژنتیکی غیر سندرومی‌جسمی مغلوب ایران ۱۲/۶٪ گزارش شده است. از ۶۶۴ خانواده مورد مطالعه تنها ۱۶/۷٪ جهش در ژن GJB۲ را نشان دادند(۱۷). به هر حال در این بررسی نیز شیوع جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت ایران بسیار کمتر از جمعیت‌های غربی گزارش شد. از آنجا که ایران از قوم‌های مختلفی تشکیل شده و نیز با توجه به اینکه شیوع الل‌های جهش دار در جمعیت‌های مختلف متفاوت است، بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که اقوام مختلف به صورت جدا بررسی شوند. در مطالعه‌ای که درکرمان بر روی ۶۵ فرد ناشنوای غیر سندرمی‌جسمی مغلوب توسط دکتر نجم‌آبادی و همکارانشان انجام شده است تنها ۳ کروموزوم(۲/۳٪) جهش ۳۵del G را نشان دادند(۱۸). در این مطالعه نیز ما ناشنوایان غیرسندرمی خوزستان را با ۵۰ خانواده مورد بررسی قرار دادیم که جهش در ژن GJB۲ در ۱۳٪ مشاهده شد. این امر نشان دهنده میزان شیوع پائین این جهش نسبت به گزارش‌های انجام شده درکشورهای غربی است(۲۱-۱۹).

نتیجه‌گیری

این نتایج نشان می‌دهد که در جمعیت ما احتمالاً ژن‌های دیگری عامل ایجاد ARNSD می‌باشند. بنابراین با توجه به اینکه جمعیت ایرانی ترکیبی از قبایل مختلف است، با بررسی آنها می‌توان به نتایج جدیدتری دست یافت. که نهایتاًکمک شایانی به امر مشاوره ژنتیک، کنترل و درمان این گروه از بیماران خواهد کرد.

منابع:

1- Nance W E. The genetics of deafness. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2003; 9(2): 109-119.
2-Zelante L,Gasparini P,Estivill X,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.
3- Falk M M. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. Eur J Cell Biol 2000; 79(8): 564-574.
4-Reardon W,Middleton H R,Sand kuijl L,et al: Genetic Deafness. J Med Genet 1992 ;29:521-526.
5-Lefebvre PP, Van De Water T R. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. Brain res rev 2000; 32(1): 159-162.
6-Goodenough D A, Goliger JA, Paul D L. Connexins, connexon, and intercellular communication. Annu Rev Biochem 1996; 65: 475-502
7-Kiang D T, Jin N, Tu Z J, Lin H H. Upstrem genomic sequence of the human connexin 26 gene. Gene 1997;199: 165-171
8-http://www.crg.es/deafness
9-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
10-Kelley P M, Harris D J. Novel mutations in the connexin 26 gene(GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss.Am J Hum Genet 1998;62:792-799

Archive of SID
www.SID.ir

11-Park H J, Hahn S H, Chun Y M, Park K, Kim H N. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss. Laryngoscope 2000; 110: 1535-1538.
12-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
13-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
14- Maw M. The Contibution of the DFNB1 locus to neurosensory Deafness in Caucasian Population. Am J Hum Genet 1995; 57:629
15- Rabionet R, Lopes-Bigas N, Dagrumal A, et al: Molecular Basis of Childhood DeafnessResulting from Mutations in the GIB2 (connexin 26) Gene. Hum Genet 2000; 106:40-44.
16-Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, et al. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. Hum Mutat 2002; 19(5): 572.
17-Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, et al .GJB2 Mutations-Passage through Iran.AJMed Genet 2004
۱۸- بزاززادگان، ن. میرحسینی، ن. ضیاالدینی، ح. اسدی، ع. کهریزی، ک. ارژنگی، س. و سایر همکاران. وفور نسبی جهش (۳۵del G) در ژن GJB۲ در جمعیت ناشنوایان غیرسندرمی جسمی مغلوب استان کرمان: مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره ۱۱شماره۳
19- Fuse Y,Doi K,Hasegawat T,et al: Three Novel Connxin 26 Gene Mutations in Autosomal Recessive Non-Syndromic Deafness. NeuroReport 1999; 10:1853-1857.
20-Abe S, Usami S,Shinkawa H,et al: Prevalent Connexin 26 Gene (GJB2) Mutations in Japanese. J Med Genet2000; 37:41-43.
21-Kudo T,Ikeda K,Kure S,et al: Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) Responsible for Childhood Deafness in the Japanese Population. Am J Med Genet 2000; 90:141-145.

Archive of SID
www.SID.ir