Archive of SID

تعیین وفور نسبی جهش های ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان غیرسندرومی جسمی مغلوب استان لرستان

میترا سپهوند[1]، کیمیا کهریزی[2]، احمد دانشی[3]، مرضیه محسنی[4]، یاسر ریاض‌الحسینی[4]، نیلوفر بزاززادگان[4]، حسین نجم آبادی[5]

۱- پزشک عمومی مرکز مشاوره ژنتیک سازمان بهزیستی استان لرستان
۲- متخصص، مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران
۳- استاد، مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی و جراحی سر و گردن بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران
٤- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران
٥- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران

یافته / دوره هشتم / شماره ۲ / تابستان ۸۵ / مسلسل ۲۸

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱۱/۱۹، پذیرش مقاله: ۸۵/۲/۷

★ مقدمه: ناشنوایی مادرزادی که علل ژنتیکی و محیطی بسیاری دارد، یک از هر هزار نوزاد تازه متولد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. جهش های ژن GJB2 که رمز کننده کانکسین ۲۶ پروتئین تشکیل دهنده اتصال باز است به عنوان اساس ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب شناخته شده است.

★ مواد و روش ها: هدف ما در این مطالعه تعیین وفور نسبی جهش های ژن GJB2 در جمعیت ناشنوای غیرسندرومی جسمی مغلوب استان لرستان با استفاده از تکنیک DHPLC، ARMS، PCR و تعیین توالی مستقیم بود.

★ یافته ها: در این مطالعه ۱۰۶ کروموزوم (از ۵۳ فرد بیمار) مورد بررسی قرار گرفت، ۱۸ کروموزوم (۱۷٪) در ژن GJB2 جهش داشتند. جهش 35delG در ده کروموزوم (۹/۴٪) (چهار بیمار هموزیگوت و دو بیمار هتروزیگوت بود) تشخیص داده شد. سایر جهش هایی که در این منطقه دیده شد، شامل: V95M، W24X، 3170G>A، 512insAACG 35delG، 314del14 و 510insCGAA بودند. همچنین پلی مورفیسم V153I در سه فرد بصورت هتروزیگوت دیده شد و آخرین جهش(510insCGAA) یک جهش جدید می باشد که وجود آن تاکنون در جمعیتهای دیگر جهان گزارش نشده است،

★ نتیجه گیری: نتایج این مطالعه در مقایسه بافراوانی جهش ژن کانکسین ۲۶که عامل بیش از ۵۰٪ ناشنوایی های غیر سندرمی در جمعیتهای مختلف جهان می باشد، بسیار اندک بوده و فقط ۱۷٪ موارد را شامل می شود، ازطرفی دراین مطالعه جهش(510insCGAA) یک جهش جدید می باشد که وجود آن تا کنون در جمعیتهای دیگر جهان گزارش نشده است. این نتایج نشان می دهد که در جمعیت ما احتمالا" ژن های دیگری عامل ایجاد ARNSHL می باشد.

واژه های کلیدی: ناشنوایی غیر سندرومی جسمی مغلوب، جهش، کانکسین ۲۶، GJB2

آدرس مکاتبه: خرم آباد، چهارراه بانک،کوچه پشت بانک ملی مرکزی ،مرکز مشاوره خانواده وژنتیک

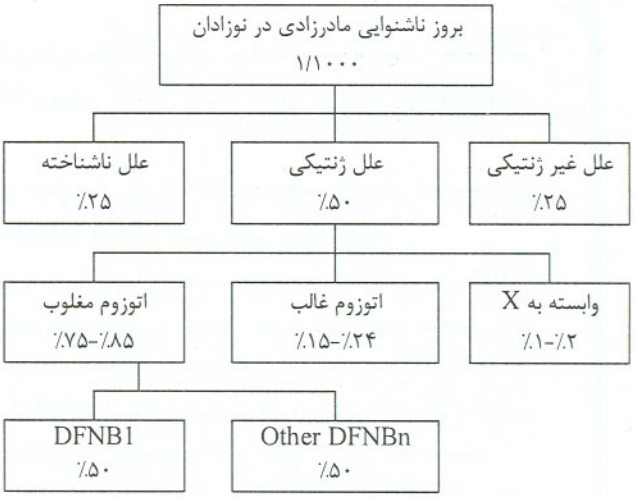
www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

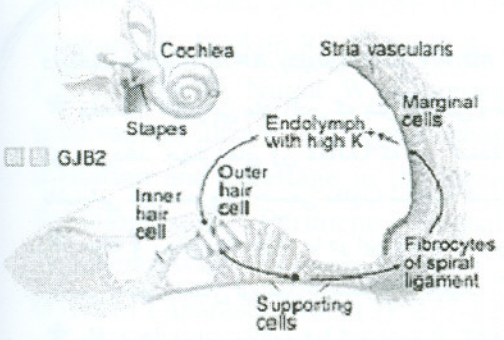
ناشنوایی اختلالی هتروژن است که علت‌های محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد(۱). نقص شنوایی ژنتیکی شایعترین اختلال حسی عصبی ارثی است که تقریباً ۱/۱۰۰۰-۱/۲۰۰۰ کودک تازه متولد را تحت تاثیر قرار می دهد (۲، ۳). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی‌های ژنتیکی غیرسندرومی است که در آن فرد ناشنوا هیچ اختلال دیگری ندارد(۲). کاهش شنوایی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

در سالهای اخیر پیشرفت های قابل ملاحظه ای در شناسایی ژن های دخیل در ناشنوایی غیرسندرمی به وقوع پیوسته است. ژنهای مختلفی باعث این اختلال می شوند که در نهایت ۱۰۰ لوکوس برای آن تخمین زده شده است (شکل ۱).



شکل شماره ۱ـ فراوانی انواع شنوایی

لوکوسهای مغلوب غیرسندرمی به صورت DFNBn نمایش داده میشوند که در آن DFN ناشنوایی، B مغلوب و n ترتیب شناسایی لوکوس مورد نظر است (مثلاً DFNB1 ژن رمز کننده GJB2 می باشد). از میان آنها DFNB1[2] به تنهایی مسئول ۵۰٪ از ناشنوایی های جسمی مغلوب می باشد که توسط جهش های ژن کانکسین ۲۶ (CX26) و ژن کانکسین ۳۰ (CX30) اتفاق می افتد.کانکسین۲۶ 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[3] که دارای کد برای سنتز پروتئین کانکسین ۲۶ می باشد اگزون ۲ است (۶و۷). پروتئین کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده کانال اتصال باز بتا ۲ می باشد (که بعد از این با نام کانکسین ۲۶ خوانده می شود) کانکسین ۲۶ یکی از مهمترین پروتئینهای دخیل در هموستاز یون پتاسیم در بخش حلزون گوش داخلی است که در سلولهای حفاظتی، فیبروبلاستهای لیگامنت مارپیچ و درون سلولهای مارپیچی لیمبوس وجود دارد. این پروتئین مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است که اجازه انتقال به مولکولهای کوچک را می دهد (شکل۲).



شکل شماره ۲ـ کانکسین ۲۶ یکی از مهمترین پروتئینهای دخیل در هموستاز یون پتاسیم در بخش حلزون گوش داخلی است.که در سلولهای حفاظتی ، فیبروبلاسنهای لیگامنت مارپیچ ودرون سلولهای مارپیچی لیمبوس وجود دارد.

تا کنون بیش از ۹۰ جهش در ژن کانکسین ۲۶ کشف شده است (۸). ۳۵delG شایعترین جهش در این ژن (در حدود ۷۰ درصد) می باشد که منجر به ایجاد کدون خاتمه زودرس در موقعیت اسید امینهٔ شماره ۱۳ می شود (۹). در ژن کانکسین ۲۶ شش تکرار از باز گوانین در موقعیت ۳۰-۳۵

1. Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss
2. Deafness Neurosensory Autosomal Recessive
3. Gap Junction Beta

www.SID.ir

Archive of SID

منطقه کد کننده وجود دارد که حذف یکی از این نوکلئوتیدها باعث ایجاد جهش 35delG یا 30delG می شود (۱۰). این جهش اولین بار توسط زلانت[1] 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 (۱۱).

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 167delT شایع است. نکته قابل ملاحظه این است که جهش 35delG در بیشتر نقاط جهان گسترده شده است (۱۲و۱۳).

مواد و روش ها

این مطالعه با استفاده از روش مطالعه توصیفی پس رویدادی انجام گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی شایعترین جهش در ژن کانکسین ۲۶ در ناشنوایان ژنتیکی جسمی مغلوب غیر سندرمی از نوع حسی ـ عصبی بود. بدین منظور از خانواده هایی که برای دریافت سمعک مراجعه می نمودند، متقاضیان کاشت حلزون، مراجعین متقاضی مشاوره ژنتیک، موارد تک موردی و... استفاده گردیده است. بیماران مورد بررسی دارای مشخصات زیر بودند:

۱- تست شنوایی را برای بررسی نوع کاهش شنوایی انجام داده بودند که معمولاً دارای انواع متوسط (۴۱ db)، عمیق (۷۰db)، شدید (۷۰-۵۶db) هستند که می توانند به صورت پیشرونده نیز باشند.

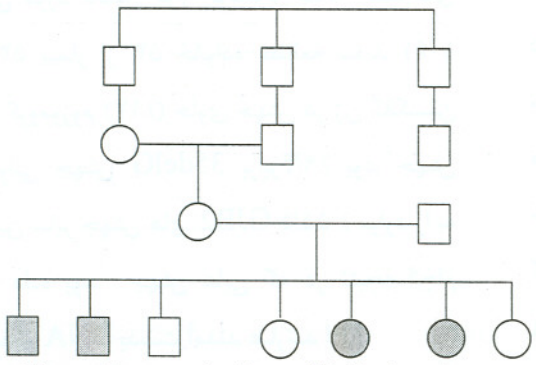
۲- کاهش شنوایی در افراد مورد بررسی با سایر مشکلات کلینیکی همراه نبود. این بررسی که به صورت معاینه بالینی و توسط پزشک صورت می گیرد، برای تشخیص غیر سندرمی بودن ناشنوایی به کار می رود. در صورت لزوم بیمار باید سایر تست های خونی، تصویربرداری و... را انجام دهد.

۳- اساس شجره نامه بر اساس اتوزومی مغلوب بود. یعنی بیماری به صورت افقی دیده شده و معمولاً در نسلهای قبلی به وفور زیاد دیده نمی شود.

شنوایی پدر و مادر نرمال بود و والدین عموماً با همدیگر نسبت خانوادگی داشتند. در این طرح، بیشتر افراد دارای ازدواج های فامیلی مد نظر بودند.

دو یا سه مورد نا شنوایی درهر خانواده دیده شد (شکل۳). 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 شدند.

سپس با اخذ رضایت از ۵۳ 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 حاوی EDTA[2] نگهداری شد. DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع[3] استخراج گردید و سپس کیفیت و کمیت آن توسط روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.



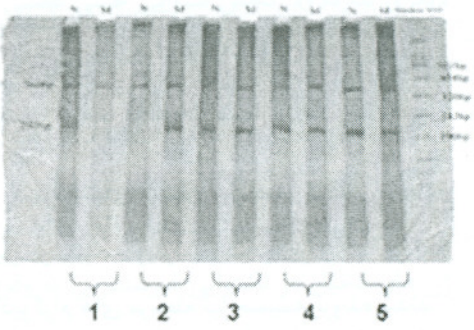
شکل شماره ۳ـ الگوی وراثت اتوزومی مغلوب در ناشنوایان مورد مطالعه که در آن بیماری بصورت افقی دیده می شود

1. Zelante
2. Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid
3. Salting out

www.SID.ir

Archive of SID

جهت تشخیص جهش 35delG از روش ARMS/PCR[1] و الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ با ولتاژ ۲۰۰ ولت استفاده شد (شکل۳). نمونه‌های هموزیگوت 35delG مشخص و کنار گذاشته شدند (شکل۴). در بقیه موارد پس از انجام DHPLC نمونه هایی که پروفایل غیر نرمال داشتند مستقیماً تعیین توالی[2] شدند.



N: نوار طبیعی
M: نوار جهش یافته
ردیف(۱): شاهد طبیعی برای جهش 35delG
ردیف (۲): شاهد هموزیگوت برای جهش35delG
ردیف (۳): شاهد هتروزیگوت برای جهش35delG
ردیف (۴ و۵): نمونه های مورد مطالعه (هتروزیگوت برای جهش 35delG)

شکل شماره ۴ـ نمونه جهش یافته ژن 35delG

یافته ها

داده های حاصل از پژوهش با استفاده از روش های آماری مطالعه توصیفی مورد تحلیل قرار گرفت.بر اساس معیارهای مورد نظر ما ۵۳ بیمار از ۵۳ خانواده مطالعه شدند (۱۰۶ کروموزوم). ۱۸ کروموزوم (۱۷٪) حاوی جهش در ژن کانکسین ۲۶ بودند. فراوانی جهش 35delG برابر۹/۴٪ بود. جهش 35delG در بین سایر جهش های GJB2 ۵۵/۵ ٪ موارد را به خود اختصاص داده بود. جهش هایی که در نتیجه انجام توالی یابی مستقیم DNA بدست آمدند عبارتند از:

V95M، 314del14، W24X، 510insCGAA، 512insAACG، 3170G>A که جهش های اتوزومی مغلوب در ژن CX26 می باشند. شایان ذکر است که 510insCGAA یک جهش جدید می باشد که وجود آن تاکنون در جمعیتهای دیگر جهان گزارش نشده است و همچنین در ۳ خانواده (۲/۸٪) پلی مورفیسم V153I مشاهده شد. ژنوتیپهای یافت شده در این بیماران در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱ـ ژنوتیپهای یافت شده در بیماران

ژنوتیپ	فراوانی
35delG/35delG	۴
314del14/314del14	۱
512insAACG/512insAACG	۱
35delG/W24X	۱
510insCGAA/-3170G>A	۱
35delG/V95M	۱

بحث

کاهش شنوایی ارثی[3] از جمله بیماریهای هتروژن است، با وجود این جهش در ژن کانکسین ۲۶ عامل عمده (ARNSHL) کاهش شنوایی حسی عصبی جسمی مغلوب غیر سندرمی می باشد. جهش در این ژن عامل نیمی از ناشنوایی ها از نوع خفیف تا شدید در جمعیت های مختلف است (۱۴و۱۵). در جمعیت های مختلف جهش های خاصی شایع است مثلا" در کشورهای شرق آسیا جهش 235delC و در یهودیان اشکنازی جهش 167delT و در کشورهای اروپایی 35delG ازبیشترین شیوع برخوردار است. جهش 35delG در بیشتر جمعیت های جهان با فراوانی های متفاوتی دیده می شود. در مطالعه اولیه ای که توسط دکتر نجم آبادی و همکاران انجام گرفت ۸۳ خانواده مطالعه شد که تنها در ۹ خانواده (۱۱٪) ناشنوایی وابسته به GJB2 تشخیص داده شد که بیشترین ژنوتیپ مربوط به 35delG بود به طوریکه ۴ تا از ۹ خانواده ژنوتیپ هموزیگوت 35delG داشتند (۱۶).

1. Allele Refraction Mutation System/Polymerase Chain Reaction
2. Direct sequencing
3. Hereditary Hearing Loss

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین در مطالعه بعدی همین گروه در سال ۲۰۰۴ فراوانی این جهش در بین(ARNSL) ناشنوایان ژنتیکی غیر سندرومی جسمی مغلوب ایران ۱۲/۶٪ گزارش شده است. از ۶۶۴ خانواده مورد مطالعه تنها ۱۶/۷٪ جهش در ژن GJB2 را نشان دادند (۱۷). به هر حال در این بررسی نیز شیوع جهش های ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت ایران بسیار کمتر از جمعیت های غربی گزارش شد. از آنجا که ایران از قوم های مختلفی تشکیل شده و نیز با توجه به اینکه شیوع آلل 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 ۶۵ فرد ناشنوای غیر سندرومی جسمی مغلوب توسط دکتر نجم آبادی و همکاران انجام شده است تنها ۳ کروموزوم (۲/۳٪) جهش 35delG را نشان دادند (۱۸). در این مطالعه نیز ما ناشنوایان غیر سندرومی استان لرستان را با ۵۳ خانواده مورد بررسی قرار دادیم که جهش در ژن GJB2 در ۹/۴٪ مشاهده شد. این امر نشان دهنده میزان شیوع پائین این جهش نسبت به گزارش های انجام شده در کشورهای غربی است (۱۹و۲۰و۲۱).

این نتایج نشان می دهد که در جمعیت ما احتمالاً ژن های دیگری عامل ایجاد ARNSHL می باشد. بنابراین با توجه به اینکه جمعیت ایرانی ترکیبی از قبایل مختلف است، با بررسی آنها میتوان به نتایج جدیدتری دست یافت که نهایتاً کمک شایانی به امر مشاوره ژنتیک، کنترل و درمان این گروه از بیماران خواهد کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Nance WE. The genetics of deafness. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2003; 9(2): 109-119
2. Zelante L,Gasparini P,Estivill X: 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 MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. Eur J Cell Biol 2000; 79(8): 564-574
4. Reardon W,Middleton HR,Sand kuijl L,et al: Genetic Deafness. J Med Genet 1992;29:521-526
5. 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
6. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL.Connexins,connexon,and intercellular communication.Annu Rev Biochem 1996;65:475-502
7. Kiang DT,Jin N,Tu ZJ,Lin HH.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 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
11. 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
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:180-184
14. Maw Ma: The contibution of the DFNB1 locus to neurosensory Deafness in Caucasian Population. Am J Hum Genet1995; 57: 629
15. Rabionet R, Lopes-Bigas N, Dagrumal. Molecular Basis of Childhood Deafness Resulting from Mutations in the GIB2 (connexin 26) Gene. Hum Genet 2000;106:40-44
16. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam. 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, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, GJB2 Mutations-Passage Through Iran.AJMed Genet 2004; 133A: 132-7

۱۸-بزاززادگان ن، میرحسینی ن، ضیاالدینی ح، اسدی ع، کهریزی ک، ارژنگی س، آستانی ا، محسنی م، ریاض‌الحسینی ی، نجات م، جلالوند خ، اسمیت ر، نیشیمیورا ک و نجم‌آبادی ح. وفور نسبی جهش (35delG) در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان

www.SID.ir

Archive of SID

غیرسندرومی جسمی مغلوب استان کرمان: مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره ۱۱، شماره ۳

19. Fuse Y,Doi K,Hasegawat T. Three Novel Connxin 26 Gene Mutations in Autosomal Recessive Non-Syndromic Deafness. NeuroReport 1999;10:1853-1857
20. Abe S,Usami S,Shinkawa H: Prevalent Connexin 26 Gene (GJB2) Mutations in Japanese Population. J Med Genet 2000; 37: 41-43
21. Kudo T,Ikeda K,Kure S: 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