غربالگری ناشنوایان غیر سندرومی اتوزومال مغلوب برای جهش‌های ژن GJB2

دکتر عاطفه خوش آئین
پزشک عمومی

دکتر فاطمه پور فاطمی
پزشک عمومی

***دکتر کیمیا کهریزی**
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
کارشناس ارشد
زیست شناسی سلولی و مولکولی

نوشین نیک ذات
کارشناس ارشد ژنتیک

دکتر حسین نجم آبادی
دانشیار دانشگاه
علوم بهزیستی و توانبخشی
*Email: kkahrizi@uswr.ac.ir

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 وراثت جسمی مغلوب دارندو تا کنون بیش از یکصد جایگاه (locus) برای این نوع ناشنوایی برآورد شده است. ژن‌های مختلفی با این ناشنوایی در ارتباط هستند که عمده ترین آنها جهش در ژن کانکسین ۲۶ (GJB2) می‌باشد که در جمعیت‌های مختلف وجود دارد. موتاسیون در این ژن سبب کاهش شنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب می شود.

مواد و روش تحقیق: هدف در این مطالعه غربالگری بیماران برای جهش‌های ژن GJB2بود. در این تحقیق از تکنیک ARMS/PCR استفاده شد، نمونه هائی که با این روش برای 35delG هموزیگوت بودند کنار گذاشته شدند و سپس نمونه هائی که هتروزیگوت و یا منفی بودند با روش DHPLC و توالی یابی مستقیم بررسی شدند.

یافته ها: در این تحقیق ۷۶ کروموزوم (۳۸ فرد بیمار) بررسی شد: ۳۲ کروموزوم (۴۲٪) در ژن GJB2 جهش داشتند، بالاترین شیوع به جهش 35delG مربوط است. سایر جهش ها که در این منطقه دیده شد شامل، A>G-3170، R32H، R127H، W24X بودند. همچنین پلی مورفیسم V1531 در سه فرد بیمار (۳/۸) تشخیص داده شد.

نتیجه گیری: این آمار با سایر آمار جهان مشابهت چندانی ندارد و بیانگر وجود احتمالی ژن ها و لوکوس‌های دیگر دخیل در این منطقه می باشد.

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

مقدمه

ناشنوایی اختلالی هتروژن است که علت های محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد (۲)نقص شنوایی ژنتیکی شایعترین اختلال حسی عصبی ارثی است که تقریبا ۲۰۰۰-۱/۱۰۰۰ کودک تازه متولد را تحت تاثیر قرار می دهد (۳و۴). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی های ژنتیکی غیرسندرمی 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(۶).

در سالهای اخیر پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در شناسایی ژن‌های 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). از میان آنها DFNB1 به تنهایی مسئول ۵۰٪ از ناشنوایی‌های جسمی مغلوب می باشد که توسط جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ (CX26) و ژن کانکسین ۳۰ (CX30) 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 می باشد اگزون ۲ است(۶و۷). پروتئین کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده کانال اتصال باز بتا ۲[1] می باشد (که بعد از این با نام کانکسین ۲۶ خوانده می شود) این پروتئین مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است که اجازه انتقال به مولولهای کوچک می دهد(شکل ۲).

در جمعیت‌های 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 (۱۳و۱۴).

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

مواد و روش تحقیق

ابتدا از افراد کم شنوا و یا ناشنوایی که برای مشاوره ژنتیکی به مرکز بهزیستی شهرستانهای استان مراجعه کردند استفاده نموده و با تکمیل پرسشنامه و ترسیم شجره برای آنها پرونده تشکیل گردید. آدیوگرام‌های مربوطه نیز ضمیمه پرونده می گردد. سپس با اخذ رضایت از ۳۸ بیمار مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب ۱۰-۵سی سی خون جهت استخراج DNA ژنومی گرفته شد و برای جلوگیری از لخته شدن در لوله‌های حاوی EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) نگهداری شد. DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع (Salting out) استخراج گردید و سپس کیفیت و کمیت آن توسط روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهت تشخیص جهش 35delG از روش ARMS / PCR[2] و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۸٪ با ولتاژ ۲۰۰ ولت استفاده شد (شکل ۳). 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 زیر است:

35 NOR 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAG 3'
35 MUT 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAT 3'
35 COM 5' GAAGTAGT GATCGTAGCACACGTTCTTGCA3'
ControlA5' CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG3'
ControlB5' GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG3'

تاکنون 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 آمینه شماره ۱۳ می‌شود (۱۰). در ژن کانکسین ۲۶ شش تکرار از باز گوانین در موقعیت ۳۵-۳۰ منطقه کد کننده وجود دارد که حذف یکی از این نوکلئوتیدها باعث ایجاد جهش 35delG یا 30delG می گردد(۱۱). این جهش اولین بار توسط زلانته 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.

PCR طبق شرایط زیر صورت گرفت:

۹۵ درجه	۵ دقیقه
۳۴ سیکل با:	
۹۵ درجه	۴۰ ثانیه
۶۰ درجه	۳۰ ثانیه
۷۲ درجه	۱ دقیقه (۱۴).

نمونه‌های هموزیگوت 35delG مشخص و کنار گذاشته شدند. در بقیه موارد پس از انجام DHPLC نمونه هایی که پروفایل غیر نرمال داشتند مستقیما تعیین توالی[3] شدند.

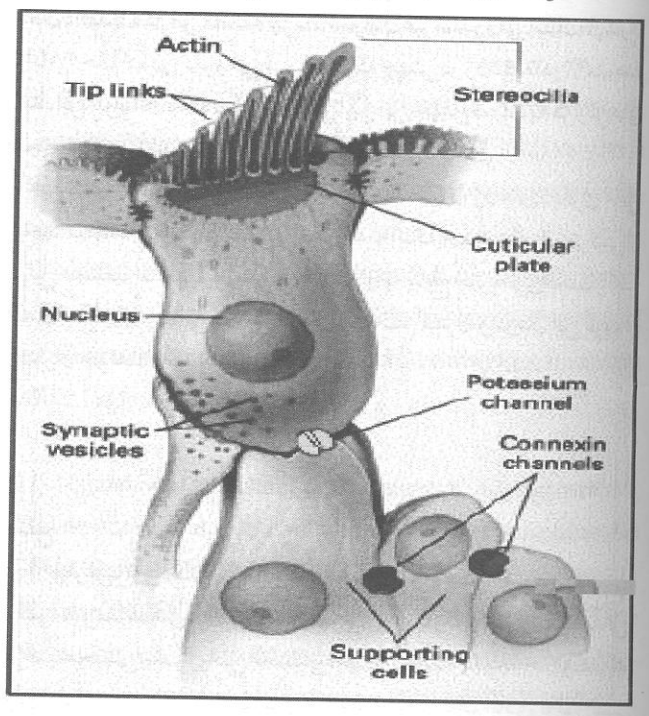
1- Gap Junction Beta2 (GJB2)
2- Allele Refraction Mutation System / Polymerase Reaction Chain
3- Direct sequencing

یافته ها

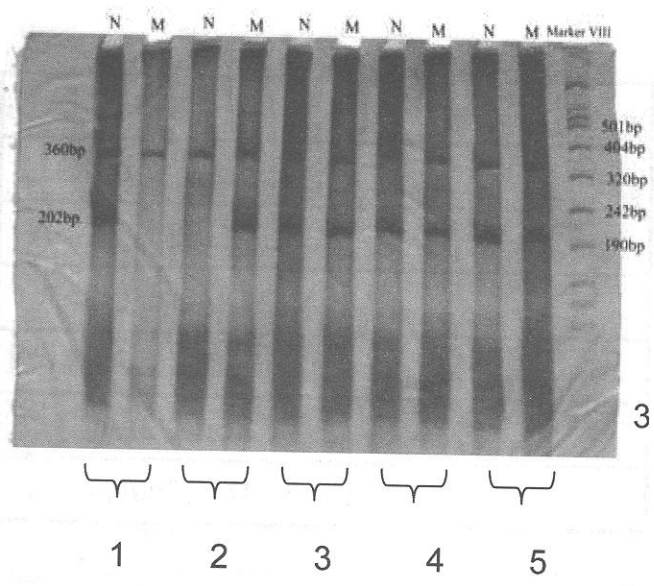
براساس معیارهای مورد نظر ما ۳۸ بیمار از ۳۸ خانواده مطالعه شدند (۷۶ کروموزوم). ۳۲ کروموزوم (۴۲٪) حاوی جهش در ژن کانکسین ۲۶ بودند فراوانی جهش 35delG برابر ۳۵/۵٪ از ل آلل های مورد بررسی بود. جهش 35delG در بین سایر جهش های ۸۴٪ GJB2 را به خود اختصاص داده بود.

جهش هایی که در نتیجه انجام توالی یابی مستقیم DNA بدست آمده اند عبارتند از: R32H، R127H، W24X، «A-3170G» - که جهش های اتوزومی مغلوب در ژن CX26 می باشند و همچنین در ۳ خانواده (۷/۵٪) پلی مورفیسم V153I

شکل ۱- تصویر شماتیک از جایگاه کانکسین ۲۶ در حلزون گوش



شکل ۳: ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد مربوط به شناسایی جهش 35delG



N: باند نرمال

M: باند موتان

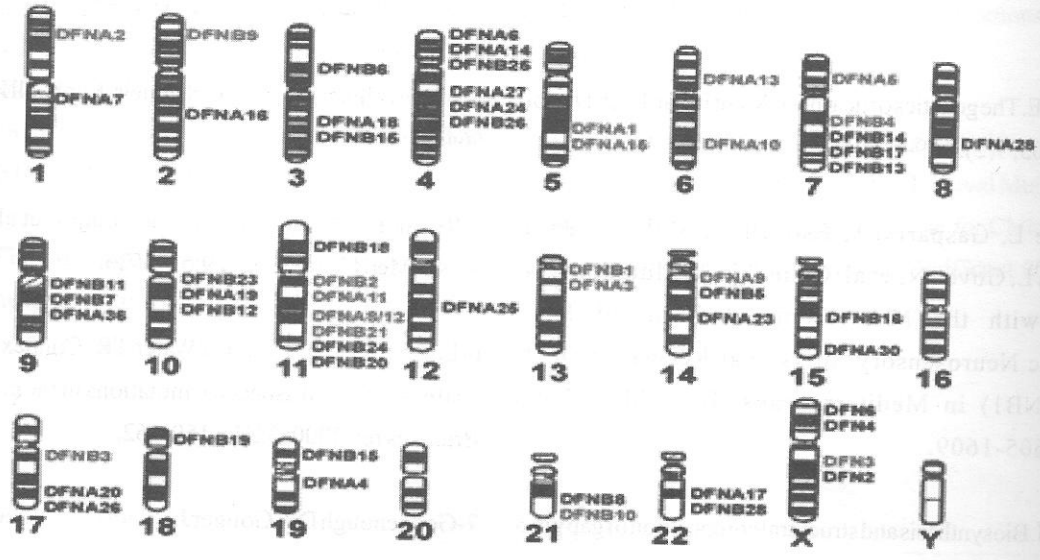
(۱): کنترل نرمال برای جهش 35delG

(۲): کنترل هموزیگوت برای جهش 35delG

(۳): کنترل هتروزیگوت برای جهش 35delG

(۴، ۵): هتروزیگوت برای جهش 35delG

شکل ۲: جایگاه‌های کروموزومی ژنهای ناشنوایی غیر سندرمی در ژنوم انسان



مشاهده شد. ژنوتیپهای یافت شده در این بیماران در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول۱: 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 (HHL)[1] 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 جمعیت‌های مختلف است. (۱۶و۱۷). در جمعیت‌های مختلف جهش‌های خاصی شایع است مثلا" در کشورهای شرق آسیا جهش 235delC و در یهودیان اشکنازی جهش 167delT و در کشورهای اروپایی 235delG از بیشترین شیوع برخوردار است. و نیز اینکه در بررسی انجام شده در ترکیه منشاء دو جهش 35delG و delE120 در ژن GJB2 را به آناتولیا نسبت داده‌اند (۱۸). جهش 35delG در بیشتر جمعیت‌های جهان با فراوانی‌های متفاوتی دیده می‌شود. در بررسی انجام شده در پاکستان که بر روی ۱۹۶ خانواده بود میزان شیوع جهش‌های ژن GJB2 ۱۶/۶٪ گزارش شده است (۱۹). در مطالعه اولیه ای که توسط دکتر نجم آبادی و همکارانشان 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 طوری که ۴ 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 ۱۲/۶٪ گزارش شده است، از ۶۶۴ خانواده مورد مطالعه تنها ۱۶/۷٪ جهش در ژن GJB2 را نشان دادند (۲۱). 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 قوم‌های مختلفی تشکیل شده و نیز با توجه به این که شیوع الل های جهش دارد در جمعیت‌های مختلف متفاوت است . ضروری به نظر می رسد که اقوام مختلف به صورت جدا بررسی شوند، در مطالعه ای که در کرمان بر روی ۶۵ فرد ناشنوای غیر سندرومی جسمی مغلوب توسط دکتر نجم آبادی و همکارانشان انجام شده است تنها ۳ کروموزوم (۳و۲٪) جهش 35delG را 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 ۴۲ مشاهده شد. این امر نشان دهنده میزان شیوع پایین این جهش نسبت به گزارش های انجام شده در کشورهای غربی است (۲۲و۲۳و۲۴).

این نتایج نشان می دهد که در جمعیت ما احتمالا ژن‌های دیگری عامل ایجاد ARNSD می باشد. بنابراین با توجه به اینکه جمعیت ایرانی ترکیبی از قبایل مختلف است. با بررسی آنها می توان 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 ریاض الحسینی، مهدیه نجات، خدیجه جلالوند، دکتر ریچارد اسمیت، کارلا نیشیمیورا و دکتر حسین نجم آبادی :وفور نسبی جهش (35delG) در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان غیرسندرومی جسمی مغلوب استان کرمان:مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره ۱۱شماره:۳ از صفحه ۱۳۶ تا ۱۴۰ (۱۳۸۳).

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,

1- Heraditary Hearing Loss

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.

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.

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.

Screening of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss for GJB2 mutations

Khoshayeen A. (M.D.)

Pour fatemi F. (M.D.)

Kahrizi K. (Ph.D.)
Assist Prof of University of Welfare and Rehabilitation Sciences

Riazalhosseini Y. (M.Sc.)
Mohseni M. (M.Sc.)
Bazazzadegan N. (M.Sc.)
Nikzat N. (M.Sc.)

Najmabadi H. (Ph.D.)
Associate Prof of University of Welfare and Rehabilitation Sciences

Abstract

Introduction: Hereditary Hearing loss (HHL) affects one in 1000-2000 newborns and more than 50% of these cases, the loss has a genetic basis. About 70% of HHL is non-syndromic with autosomal recessive forms accounting for ~85% of the genetic load. To date, more than 100 locus estimated for this kind of deafness. Different genes have been reported to be involved, but mutations in the connexin 26 gene (Cx26) have been established as the basis of autosomal recessive non-syndromic hearing loss.

Materials & Methods: The aim of this project is to study the prevalence of connexin 26 mutations by using Amplification Refractory Mutation System ARMS/ PCR for detection of 35delG and then we analyzed all samples excluding 35delG homozygote by DHPLC and Direct Sequencing.

Finding: We screened 76 chromosomes (38 patient) for GJB2 mutations. Thirty two (42%) carry GJB2 mutations including 35delG, W24X, R32H, R127H, -3170G>A. Among them, 35delG has the highest frequency (84%). Polymorphism V153I was found in three chromosomes.

Conclusion: According to our results, other loci and genes may be the major responsible for nonsyndromic deafness in this population.

Key word : GJB2 / CX26 / Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss